

Protein-vermittelte Peptidverknüpfung**

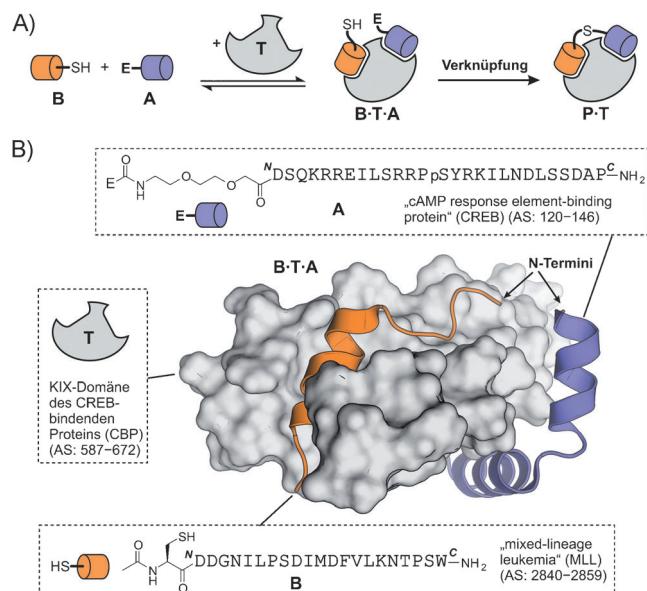
Nicolas Brauckhoff, Gernot Hahne, Johannes T.-H. Yeh und Tom N. Grossmann*

Abstract: Molekulare Template binden spezifisch Reaktanten und erhöhen somit deren effektive Konzentration, was zur Beschleunigung von chemischen Reaktionen führen kann. Dieses Konzept wurde bereits erfolgreich auf einige Fragestellungen vor allem aus dem Bereich der Nukleinsäure-vermittelten Chemie angewendet. Wir präsentieren die erste Protein-vermittelte Reaktion, welche die N-terminale Verknüpfung zweier Peptide ermöglicht. In Anwesenheit des Proteintemplats wurde die Verknüpfungsreaktion um mehr als drei Größenordnungen beschleunigt. Die Templat-vermittelten Reaktionen verlaufen hochselektiv und wurden erfolgreich für die kovalente Markierung eines Zielproteins direkt im Zelllysat verwendet.

Die Steuerung der Selektivität und Geschwindigkeit chemischer Reaktionen steht im besonderen Fokus der naturwissenschaftlichen Forschung. In der klassischen Synthesechemie wird eine effektive Produktbildung durch den Einsatz relativ hoher Eduktkonzentrationen erreicht. Ein grundlegend anderer Ansatz wird in biologischen Systemen realisiert, in denen eine Vielzahl potentiell reaktiver Verbindungen in sehr geringen Konzentrationen vorliegt. In diesem Fall werden die Reaktanten spezifisch von Biomakromolekülen erkannt, welche die gewünschte chemische Transformation vermitteln. Solche Makromoleküle wirken als Template, indem sie die entsprechenden Reaktionspartner binden und so deren effektive Konzentration erhöhen. Sind die entsprechenden funktionellen Gruppen korrekt ausgerichtet, so kann das Templat eine spezifische und effiziente Produktbildung bewirken. Dies erfolgt schon bei Konzentrationen, bei denen nicht Templat-vermittelte Reaktionen nur sehr lang-

sam ablaufen.^[1] Das Konzept Templat-induzierter Reaktionen wurde bereits auf eine Reihe chemischer Fragestellungen angewendet. Beispiele beinhalten die Selbstreplikation von Nukleinsäuren^[2] und Peptiden,^[3] den Aufbau dynamisch-kombinatorischer^[4] oder DNA-kodierter Substanzbibliotheken^[5] sowie den Nachweis von Nukleinsäuren^[6] und Proteinen.^[7] Die biokompatible Modifikation von Proteinen ist ein weiteres attraktives Feld für die Verwendung Templat-vermittelter Reaktionen. Bisher wird dieser Forschungsbereich von bioorthogonalen Reaktionen,^[8] enzymatischen Transformationen^[8a] und Ligand-vermittelten chemischen Reaktionen dominiert.^[9] Es wurden jedoch schon Templat-vermittelte Reaktionen beschrieben, welche Peptid- und Foldameretemplate zur Verknüpfung von Peptiden verwenden,^[10] oder Nukleinsäuretemplate nutzen, um Peptidfragmente zu ligieren.^[11] Bisher wurden diese Ansätze jedoch noch nicht innerhalb komplexer biologischer Systeme und für die Markierung ganzer Proteine verwendet.

Unser Ziel war die Konzipierung einer Templat-vermittelten Peptidverknüpfung (Abbildung 1 A), die selektive Reaktionen innerhalb einer biologischen Matrix erlaubt. Mit



[*] N. Brauckhoff, Dr. G. Hahne, Dr. T. N. Grossmann
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: tom.grossmann@cgc.mpg.de

Dr. J. T. H. Yeh
Department of Genetics, Harvard Medical School
77 Avenue Louis Pasteur, Boston MA 02115 (USA)

Dr. G. Hahne, Dr. T. N. Grossmann
Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] T.N.G. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Emmy Noether-Programm GR3592/2-1) für die finanzielle Unterstützung. Diese Arbeiten wurden durch AstraZeneca, Bayer CropScience, Bayer HealthCare, Boehringer Ingelheim, Merck KGaA und die Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Wir danken Sascha Genth für die Unterstützung der Peptidfestphasensynthese und Dr. Christian Hedberg für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201400681> zu finden.

dem Wissen um die außergewöhnlichen Oberflächenerkennungseigenschaften von Proteinen, entschieden wir uns eine Proteindomäne zu suchen, die in der Lage ist, gleichzeitig zwei verschiedene Peptidsequenzen zu binden und somit als Templat zu fungieren. Die KIX-Domäne (**T**, grau) des CBP (CREB-bindendes Protein)^[12] wurde diesbezüglich als möglicher Kandidat validiert (Abbildung 1B). Diese Domäne bindet diverse kurze Peptidsequenzen verschiedener Interaktionspartner. Als Ligandenpaar wählten wir dabei Peptid **A** (blau), ein Fragment von CREB (cAMP response element binding protein, AS 120–146)^[13] und Peptid **B** (orange), das der KIX-bindenden Domäne von MLL (mixed lineage leukemia, AS 2840–2859) entspricht.^[13] All diese Proteine sind an der Transkription eukaryotischer Zellen beteiligt und sollten somit nicht mit dem von uns verwendeten prokaryotischen Expressionssystem interferieren. Eine publizierte NMR-Struktur des trimeren Komplexes **B**·**T**·**A** (Abbildung 1B, PDB 2LXT)^[13] diente als Ausgangspunkt für unseren Designprozess.

Zu Beginn wurde die Affinität des Proteintemplats **T** zu Fluorescein-markierten Varianten der Peptide **A** und **B** mittels Fluoreszenzpolarisation (FP) untersucht. Protein **T** wurde dafür mittels heterologer Expression aus *Escherichia coli* gewonnen (Abbildung S5). Die Peptide wurden nach dem Protokoll der Fmoc-basierten Peptidfestphasensynthese hergestellt. Ihre Identität und Reinheit konnte mittels HPLC in Kombination mit Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS, Tabelle S1) verifiziert werden. Die FP-Messungen zeigten eine sehr schnelle Komplexbildung (<5 min) und lieferten Dissoziationskonstanten (K_d) im Bereich von 0.1 μM (Abbildung S6), was uns für Templat-vermittelte Reaktionen als hinreichend erschien.^[14] Um eine schnelle Reaktion am Templat zu gewährleisten, ist die korrekte Orientierung der funktionellen Gruppen von entscheidender Bedeutung. Die Auswertung der NMR-Struktur zeigt, dass sich die N-Termini beider Peptide in räumlicher Nähe befinden (Abbildung 1B). Basierend auf diesem Befund entschieden wir uns, eine Verknüpfungsreaktion der N-Termini anzustreben. Peptid **B** wurde zu diesem Zweck mit einem N-terminal acetylierten Cystein modifiziert, wodurch eine nukleophile Thiolfunktion eingeführt wird. Peptid **A** trägt dagegen eine Thiol-selektive, elektrophile Gruppe (**E**), welche über einen Polyethylenlykohol(PEG)-Linker N-terminal angehängt wurde (Abbildung 1B).

Anfänglich wurden verschiedene Elektrophile hinsichtlich ihrer Eignung getestet. Dazu gehörten ein Maleimid (**A1**), welches für seine hohe Reaktivität mit Thiolen bekannt ist, zwei Acrylamide (**A2** und **A3**) sowie ein Chloracetamid (**A4**) (Abbildung 2A). Ein Fluoracetamidderivat (**A5**) diente als Negativkontrolle, da keine Reaktion dieser Verbindung mit Thiolen unter den angestrebten Bedingungen zu erwarten ist. Die Peptide wurden an fester Phase aufgebaut und final, nach Kupplung eines PEG-Linkers, mit der entsprechenden elektrophilen Gruppe modifiziert (Abbildung S1). Um zunächst die allgemeine Reaktivität der elektrophilen Peptide (**A1**–**A5**) zu evaluieren, wurden diese bei pH 7.4 und 30°C in einer gepufferten Lösung mit hohen Konzentrationen des wasserlöslichen Tripeptids Glutathion (**G-SH**, 10 mM) umgesetzt. Die Produktbildung bei diesen Templat-unabhängigen

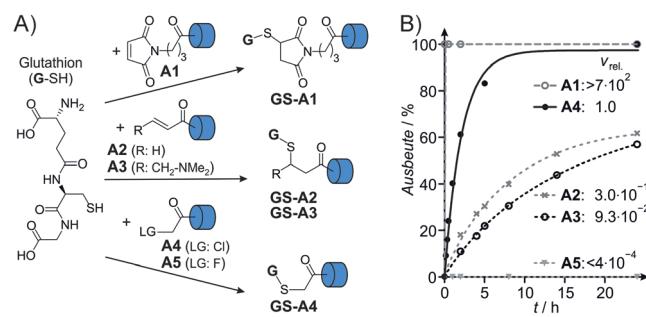


Abbildung 2. A) Templat-unabhängige Reaktionen von Glutathion (**G-SH**) mit Elektrophil-modifizierten Peptiden **A1**–**A5**. B) Auftragung mittels HPLC bestimmter Produktausbeuten inklusive relativer Anfangsgeschwindigkeiten ($v_{\text{rel.}}$). Peptide **A1**–**A5** (150 μM) wurden mit Glutathion (**G-SH**, 10 mM) in Puffer (20 mM Na_2PO_4 , 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, pH 7.4) bei 30°C umgesetzt. Die Anfangsgeschwindigkeit von **A4** diente als Referenzpunkt zur Berechnung der relativen Anfangsgeschwindigkeiten der restlichen Peptide (**A1**–**A5**) (Abbildung S8).

Reaktionen und die entsprechenden Anfangsgeschwindigkeiten (v) wurden mittels HPLC bestimmt (Abbildung S8). Das Chloracetamid-modifizierte Peptid **A4** zeigte dabei eine relative hohe Reaktivität und wurde als Referenz zur Berechnung von relativen Anfangsgeschwindigkeiten ($v_{\text{rel.}}$, Abbildung 2B) verwendet. Wie erwartet erwies sich Maleimid-derivat **A1**, mit einer quantitativen Produktbildung nach nur 10 s ($v_{\text{rel.}} > 7 \times 10^2$), als reaktivstes Peptid. Im Vergleich zu **A4** zeigten die zwei Acrylamidvarianten **A2** und **A3** eine 6.7- bzw. 11-fach verminderte Reaktivität. Die mit Fluoracetamid modifizierte Negativkontrolle **A5** zeigte unter den verwendeten Bedingungen wie erwartet keinen Umsatz ($v_{\text{rel.}} < 4 \times 10^{-4}$).

Die FP-Messungen zeigten eine sehr schnelle Bindung der Peptidliganden **A** und **B** an das Proteintemplet **T**. Daher gingen wir davon aus, dass die chemische Verknüpfung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Templat-vermittelten Reaktion sei. Um einen effizienten Umsatz am Templat zu gewährleisten, entschieden wir uns für eine schnelle Verknüpfungsreaktion. Da Maleimide bekanntlich bereits bei niedrigen Konzentrationen und ohne Templat-vermittlung sehr schnell mit Thiolen reagieren,^[15] wählten wir das Chloracetamid **A4**, welches die zweithöchste Reaktivität unter den getesteten Derivaten zeigte. Die Verknüpfung von Peptid **A4** mit dem Cystein-haltigen Peptid **B** (je 20 μM) bei 30°C und pH 7.4 wurde mittels HPLC ausgewertet. Nach 3 h in Abwesenheit von Templat **T** konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden (Abbildung 3A, oben). Dagegen wurde nach gleicher Reaktionszeit in Anwesenheit von Templat **T** eine deutliche Abnahme der Signale von **A4** und **B** sowie die Bildung eines neuen Signals beobachtet (Abbildung 3A, unten). Dieses neue Signal konnte unter mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie dem Produkt **P4** zugewiesen werden (Abbildung S12). Für eine genauere Untersuchung der Reaktionen wurden kinetische Messungen der Templat-vermittelten und der Templat-unabhängigen Verknüpfung bei drei pH-Werten (7.4, 8.4 und 9.4; Abbildung 3B) durchgeführt. In Einklang mit der zunehmenden Nukleophilie der Thiolgruppe konnte eine Reaktionsbe-

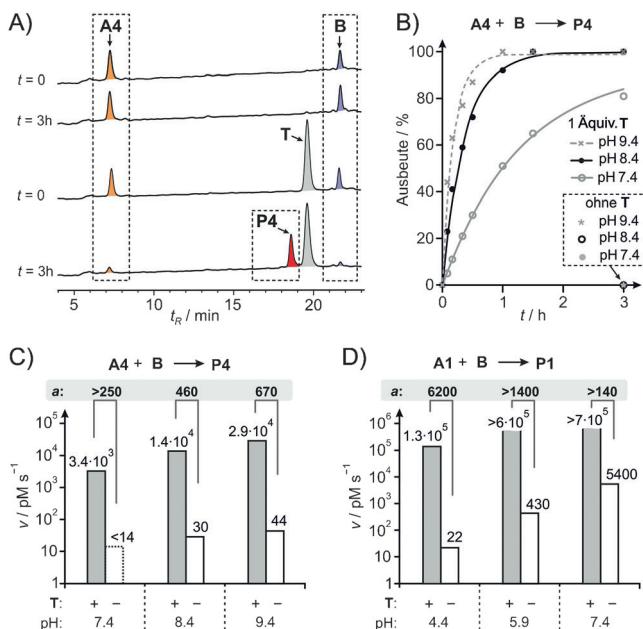


Abbildung 3. A) HPLC-Spuren der Verknüpfungsreaktionen bei pH 7.4 zwischen **A4** (orange) und **B** (blau) in Abwesenheit (oben) und Gegenwart von **T** (unten, grau). Produktbildung (**P4**, rot) wurde nach 3 h in Gegenwart von **T** beobachtet. B) Reaktionskinetik (**A4 + B → P4**) bei verschiedenen pH-Werten (7.4, 8.4 und 9.4). C) Logarithmische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten v [pm s^{-1}] der Verknüpfung zwischen **A4** und **B**. Die Reaktionsbeschleunigung ($a = v(+T)/v(-T)$) ist für jeden pH-Wert gegeben (Reaktionen wurden in Puffer (20 mM Na_2PO_4 , 20 μM Tris(2-carboxyethyl)phosphin) bei 30°C mit 20 μM **A4**, **B** mit bzw. ohne **T** durchgeführt). Details sind den Abbildungen S10 und S11 zu entnehmen. D) Gleiche Auftragung wie in (C) für die Verknüpfung von **A1** und **B** (Reaktionen wurden in gepufferter Lösung (20 mM Na_2PO_4 , 5 μM Tris(2-carboxyethyl)phosphin) bei 0°C mit 5 μM **A1**, 5.75 μM **B** mit bzw. ohne 5 μM **T** durchgeführt). Details sind den Abbildungen S13 und S14 zu entnehmen.

schleunigung mit steigendem pH-Wert beobachtet werden ($v = 3.4 \times 10^3 < 14 \times 10^3 < 30 \times 10^3 \text{ pm s}^{-1}$). Bemerkenswerterweise konnten wir nach 3 h bei keinem der getesteten pH-Werte eine Produktbildung in Abwesenheit des Templat **T** nachweisen (Abbildung 3B).

Um die Anfangsgeschwindigkeit der Hintergrundreaktionen (ohne Templat **T**) bestimmen zu können, wurden die Reaktionszeiten auf 24 h erweitert. Auf diese Weise konnten bei pH 8.4 und 9.4 geringe Produktausbeuten (13 % und 19 %) bestimmt werden, was die Ermittlung von Anfangsgeschwindigkeiten ($v = 30$ und 44 pm s^{-1}) ermöglichte. Bei pH 7.4 war es auch nach 24 h nicht möglich, die Bildung von Produkt nachzuweisen. Zieht man allerdings die Nachweissgrenze der HPLC in Betracht, so konnte die maximale Anfangsgeschwindigkeit auf 14 pm s^{-1} beschränkt werden (Abbildung S11). Abbildung 3C fasst alle v -Werte für die Verknüpfungsreaktionen der Peptide **A4** und **B** zusammen. Zudem ist die resultierende Reaktionsbeschleunigung (a), welche sich aus dem Quotienten der Templat-vermittelten und der Templat-unabhängigen Geschwindigkeiten ergibt, angegeben. Dabei werden die Verknüpfungsreaktionen in Gegenwart von Templat um den Faktor 250 bis 670 (abhängig vom pH) beschleunigt (Abbildung 3C).

Die Tatsache, dass eine Erhöhung des pH-Werts zu schnelleren Templat-vermittelten Reaktionen führt (Abbildung 3C), deutet darauf hin, dass wie erwartet die Verknüpfungsreaktion (und nicht die Bildung des Komplexes) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Aus diesem Grund entschieden wir uns, das zu Beginn erwähnte, hochreaktive Maleimid-modifizierte Peptid **A1** für eine Proteintemplat-vermittelte Reaktionsstudie zu verwenden. Wohlwissend, dass Maleimide sehr schnell mit Thiolen bei Raumtemperatur und neutralem pH reagieren, wurde die Reaktionstemperatur auf 0°C herabgesetzt. Zusätzlich wurden drei pH-Werte im sauren bis neutralen Bereich (4.4, 5.9 und 7.4) getestet, und die Peptidkonzentration von **A1** wurde auf 5 μM (ursprünglich 20 μM) verringert. Bei ansonsten gleichem Protokoll wurden die Anfangsgeschwindigkeiten für die Verknüpfung von Peptid **A1** mit Peptid **B** bestimmt (Abbildung 3D). In allen drei Fällen wurden für die Templat-unabhängigen Reaktionen deutliche Anfangsgeschwindigkeiten beobachtet ($v = 22$ –5400 pm s^{-1}). Im Vergleich dazu wurden die Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktionen jedoch überproportional beschleunigt. So wurden bei den pH-Werten 5.9 und 7.4 bereits nach 5 s mehr als 60 % Produktbildung beobachtet, was den linearen Anfangsbereich überschreitet. Aus diesem Grund kann lediglich eine untere Grenze für die Anfangsgeschwindigkeit angegeben werden ($v > 6 \times 10^5 \text{ pm s}^{-1}$, Abbildung S14). Daraus ergeben sich Beschleunigungsfaktoren von > 140 (pH 7.4) und > 1400 (pH 5.9). Bei pH 4.4 war die Templat-vermittelte Reaktion langsam genug, um die Anfangsgeschwindigkeit ($v = 1.3 \times 10^5 \text{ pm s}^{-1}$) zu bestimmen, was auch die Ermittlung eines Beschleunigungsfaktors von 6200 erlaubte. Dieser Wert übersteigt alle Reaktionsbeschleunigungen, die bisher für Templat-vermittelte Peptidverknüpfungen berichtet wurden ($a = 81$ –1800).^[10,11] Dies ist in Anbetracht der Tatsache, dass in dieser Studie keinerlei Optimierungen hinsichtlich der Linkerlänge und Peptidaffinitäten unternommen wurden, bemerkenswert.

Nachdem wir die Templat-vermittelten Reaktionen unter sehr definierten Bedingungen validiert hatten, interessierten wir uns für deren Anwendbarkeit innerhalb komplexer Systeme, wie z. B. als Methode zur selektiven Markierung eines Zielproteins in Zelllysaten. Um Reaktionen unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) zu ermöglichen, entschieden wir uns für die Verwendung einer Fluorescein-markierten Variante des Chloracetamid-modifizierten Peptids **A4*** (Abbildung 4A). Als Zielprotein wurde das humane HSP70 (Hitzeschockprotein 70) gewählt, das aus 641 Aminosäuren besteht. Um HSP70 für die Verknüpfungsreaktion zu markieren, wurde es N- bzw. C-terminal mit Peptid **B** fusioniert (**B-HSP** bzw. **HSP-B**, Abbildung 4A). Beide Fusionproteine wurden heterolog in *E. coli* exprimiert. Für initiale Studien wurden die aufgereinigten Varianten **B-HSP** und **HSP-B** verwendet (Abbildung S7), welche in Gegenwart von Templat **T** und markiertem Peptid **A4*** (je 20 μM) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese analysiert und das nun kovalent mit Fluorescein markierte Ligationsprodukt mit einem Fluoreszenzdetektor visualisiert (Abbildung 4B und C, Coomassie-gefärbte Gele in Abbildung S16). Dabei zeigt sich in Gegenwart von Tem-

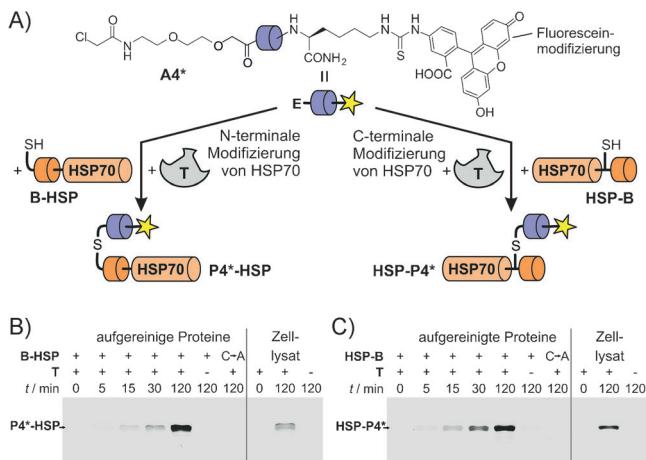


Abbildung 4. A) Proteintemplat-vermittelte chemische Modifikation von HSP70 mittels Fluorescein-markiertem elektrophilen Peptid (**A4***). B) Markierungsreaktionen mit N-terminal modifiziertem HSP70 (**B-HSP**) ausgewertet mittels SDS-Gelelektrophorese und Fluoreszenzdetektor. C) Analoge Reaktionen mit C-terminal modifiziertem HSP70 (**HSP-B**). Reaktionen wurden bei 30 °C in Puffer (20 mM Na₂PO₄, 5 μM Tris(2-carboxyethyl)phosphin, pH 7.4) mit je 20 μM **A4*** und **T** durchgeführt. Als Kontrolle dienten entsprechende HSP70-Fusionsproteinmutanten, in denen das nukleophile Cystein durch ein inertes Alanin (C—A) ersetzt wurde.

plat **T** eine deutliche zeitabhängige Zunahme der Signalintensität ($t_{\max} = 120$ min), was die Bildung des Verknüpfungsprodukts (**P4*-HSP** und **HSP-P4***) und somit die erfolgreiche Markierung des Zielproteins belegt. Wie erwartet wurde kein Signal in Abwesenheit von Templat **T** beobachtet. HSP70 besitzt eine Vielzahl exponierter nukleophiler Gruppen, unter denen sich auch ein Cysteinrest^[16] befindet. Um zu überprüfen, ob auch diese Gruppen an der Templat-vermittelten Reaktion beteiligt sind, wurden zwei weitere HSP70-Fusionsproteine erstellt. In diesen Konstrukten wurde der Cysteinrest in Sequenz **B** durch einen inerten Alaninrest ersetzt (**B-HSP(C→A)** und **HSP-B(C→A)**). Die Inkubation dieser mutierten Proteine mit Templat **T** und markiertem Peptid **A4*** für 120 min lieferte kein detektierbares Signal (Abbildung 4B und C). Dies bestätigt das Cystein aus **B** als den kovalent modifizierten Rest innerhalb der Templat-vermittelten Verknüpfungsreaktion. Schließlich testeten wir die Effizienz der Markierungsreaktion direkt im Lysat von *E. coli*-Zellen, welche das Zielprotein **B-HSP** bzw. **HSP-B** heterolog exprimieren (Abbildung 4B und C). Nach 120 min konnte erneut ausschließlich in Anwesenheit von Templat **T** und **A4*** eine Signalbande für das entsprechende Verknüpfungsprodukt (**P4*-HSP** und **HSP-P4***) beobachtet werden.

Wir berichten hier das erste Beispiel einer Proteintemplat-vermittelten N-terminalen Verknüpfung zweier Peptidfragmente. Es wurden eine enzymatisch inaktive Proteindomäne (KIX-Domäne von CBP) als Templat **T** und zwei Peptidliganden (**A** und **B**) als potentielle Reaktanten ausgewählt. Die Peptide wurden N-terminal mit einer nukleophilen Thiolfunktion bzw. mit einer elektrophilen Gruppe modifiziert. In den Templat-vermittelten Reaktionen kamen Chloracetamid(**A4**)- und Maleimid(**A1**)-modifizierte Peptide zum Einsatz. Alle untersuchten Reaktionen zeigten sehr hohe

Templat-induzierte Reaktionsbeschleunigungen ($a > 140$), wobei im Fall des Maleimid-modifizierten Peptids **A1** ($a = 6200$) alle bisher berichteten Beschleunigungen für Templat-vermittelte Peptidverknüpfungen ($a = 81$ – 1800) deutlich übertrffen werden konnten.^[10,11] Um die Effektivität und Selektivität der Proteintemplat-vermittelten Verknüpfungsreaktion weiter zu testen, verwendeten wir dieses Ligationsystem erfolgreich zur Markierung eines Proteins direkt im zellulären Lysat. Mit diesem Beispiel erweitern wir den Ansatz der Templat-vermittelten Reaktionen, welche bisher von Nukleinsäure-Templaten dominiert wurden, um Protein-templat.^[1] In Anbetracht der verfügbaren biomolekularen Werkzeuge zur Evolution von Proteinen und zur Generierung neuer Peptidliganden kann das hier vorgestellte Prinzip von Proteintemplat-vermittelten Reaktionen zu neuen Ansätzen für die Manipulation und den Nachweis von Proteinen innerhalb komplexer biologischer Systeme führen.

Eingegangen am 21. Januar 2014

Online veröffentlicht am 18. März 2014

Stichwörter: Bioorthogonale Reaktionen ·

Festphasenpeptidsynthese · Peptidverknüpfung · Proteinmodifizierung · Templat-vermittelte Reaktion

- [1] K. Gorska, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6956–6980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6820–6843.
- [2] a) G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 932–934; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 932–935; b) W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, *327*, 346–347.
- [3] a) D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525–528; b) K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1017–1024; c) S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10559–10560; d) B. Rubinov, N. Wagner, H. Rapaport, G. Ashkenasy, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6811–6814; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6683–6686.
- [4] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, et al., *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711.
- [5] R. E. Kleiner, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5707–5717.
- [6] a) A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775–3789; b) T. N. Grossmann, A. Strohbach, O. Seitz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2185–2192.
- [7] K. K. Sadhu, T. Eierhoff, W. Romer, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20013–20016.
- [8] a) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074; b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; c) M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 475–484.
- [9] a) M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52; b) C. J. Krusemark, P. J. Belshaw, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2201–2204; c) S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341–343; d) S. S. Gallagher, J. E. Sable, M. P. Sheetz, V. W. Cornish, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 547–556; e) Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4182–4200; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106.
- [10] a) K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706–709; b) R. R. Araghi, B. Koksch, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3544–3546.

- [11] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4993–4997.
- [12] N. Vo, R. H. Goodman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13505–13508.
- [13] S. Brüchweiler, R. Konrat, M. Tollinger, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1600–1610.
- [14] Nukleinsäure-vermittelte Reaktionen zeigen, dass die Konzentration der Liganden über den Werten für die Dissoziationskonstanten der entsprechenden Komplexe liegen sollte (z. B. T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723–6730).
-
- Da wir den Einsatz mikromolarer Ligandkonzentrationen planten, war davon auszugehen, dass die beobachteten Dissoziationskonstanten ($\approx 0.1 \mu\text{M}$) eine effiziente Komplexbildung erlauben.
- [15] D. S. Wilbur, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 433–470.
- [16] a) R. Kityk, J. Kopp, I. Sinning, M. P. Mayer, *Mol. Cell* **2012**, *48*, 863–874; b) X. C. Gao, C. J. Zhou, Z. R. Zhou, M. Wu, et al., *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6044–6052.