

# Von der chemischen Mutagenese zur Postexpressions-Mutagenese: eine 50 Jahre währende Odyssee

Tom H. Wright, M. Robert J. Vallée und Benjamin G. Davis\*

Aminosäuren · Mutagenese · Peptide · Proteinmodifikationen · Synthetische Biologie

**Die ortsspezifische (Gen-)Mutagenese ist das wichtigste Verfahren zur Umwandlung eines Protein-Aminosäurerestes in einen anderen. Bis vor kurzem war diese Strategie auf die zwanzig Standardamino-säuren beschränkt. Die ständige Weiterentwicklung der Stopp-Codon-Suppression und verwandter Techniken zum Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren hat den Zugang zu nichtkanonischen Aminosäuren erweitert, indem der Spielraum des Translationsapparates vergrößert wurde. Weil die genetischen Veränderungen jedoch von der Translation abhängen, bleibt die Diversität der einbaubaren Aminosäurereste begrenzt. Wir beschreiben hier einen anderen Ansatz, die Postexpressions-Mutagenese, die an den funktionalen Biomolekülen selbst angreift. Aus dem Blickwinkel der Retrosynthese beleuchten wir die Aussichten auf neue Strategien der Proteinmodifizierung, -veränderung und -konstruktion, mit deren Hilfe die Proteinwissenschaft die Einschränkungen des „Translationsfilters“ hinter sich lassen und sich zu einer echten synthetischen Biologie weiterentwickeln kann.**

## 1. Einleitung

Die detaillierte mechanistische Untersuchung von Proteinfunktionen auf Ebene der einzelnen Aminosäurereste erfordert Methoden, mit denen eine Aminosäure-Seitenkette in eine andere umgewandelt werden kann und mit denen sich Proteine aufbauen lassen, die solche präzisen Veränderungen enthalten. Bis heute ist die wesentliche Methode dafür die ortsgerechte Mutagenese.<sup>[1]</sup> Mutagenese auf Genebene gründet sich auf das zentrale Dogma von Francis Crick, das den gerichteten Informationsfluss in biologischen Makromolekülen von der DNA zum Protein hin beschreibt.<sup>[2]</sup> Bei dieser Art der Mutagenese wird die Information auf Nucle-

otidebene verändert; damit wird am Ende des Prozesses eine veränderte Proteinsequenz, also eine Änderung am funktionalen Biomolekül, generiert. Durch die Suppression bestimmter Codons<sup>[3]</sup> mit tRNAs, die nichtnatürliche Aminosäuren tragen, können solche nichtkanonischen Aminosäuren an einer spezifischen

Position eines Proteins eingeführt werden, beispielsweise, indem man dort ein Stopp-Codon einfügt,<sup>[4]</sup> vorausgesetzt, man kann ein entsp

rechendes tRNA-tRNA-Synthetase-Paar herstellen.<sup>[5]</sup> Dieser interessante Ansatz ist bei einigen Strukturmotiven, die von den entsprechenden biosynthetischen Systemen (also Synthetasen, Ribosomen) problemlos akzeptiert werden, überraschend wirkungsvoll. Eine Einschränkung einer solchen (Stopp-)Codon-Suppression ist jedoch die fehlende chemische Diversität der Seitenketten jenseits der Varianten, die mit der aktuellen Technologie eingebaut werden können. Dies ist Ausdruck der in der Evolution entstandenen Stringenz der Aminosäure-tRNA-Synthetase-Proteine. Die meisten Aminosäuren, die bislang eingebaut wurden, ähneln Lysin- oder Tyrosin-Derivaten (bei Verwendung eines Stoppcodons) oder Methionin-Derivaten (bei Verwendung des Methionincodons). Dies spiegelt die natürlichen Vorlieben der am meisten verwendeten Synthetasen wider.<sup>[3]</sup> Vor allem gibt es keine Veröffentlichungen über den direkten Einbau bestimmter Reste, die für weite Teile aktueller biologischer Forschungen von zentraler Bedeutung sind. Dazu gehören die Methyllderivate von Lysin, Glutamin und Arginin, die vielfach mit epigenetischen Phänomenen oder glycosylierten Aminosäuren im Zusammenhang stehen. Es wurden zwar einige

[\*] T. H. Wright, Dr. M. R. J. Vallée, Prof. B. G. Davis  
Department of Chemistry, University of Oxford, Chemistry Research Laboratory  
Mansfield Road, OX1 3TA (Vereinigtes Königreich)  
E-Mail: ben.davis@chem.ox.ac.uk  
Homepage: <http://users.ox.ac.uk/~dplb0149>

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

elegante indirekte Strategien angewendet,<sup>[6]</sup> aber die Schwierigkeiten bei der Entwicklung einer Synthetase, die entweder die Veränderung einer einzelnen Methylgruppe erkennt und nur den modifizierten Rest umsetzt oder die eine Seitenkette mit auch nur einem einzelnen Zuckerrest bindet (ganz zu schweigen von den größeren komplexen Strukturen, die in der Glycobiologie vorkommen), sind entmutigend. Trotz dieser Einschränkungen wird der Erfolg dieser Techniken durch die tagtägliche Anwendung in ungezählten Labors weltweit illustriert.

In mancher Hinsicht sind solche Ansätze, die von der Nucleotidebene ausgehen (Expression durch Transkription und nachfolgende Translation), grundsätzlich sehr umständlich, um das zu erhalten, was man eigentlich möchte: eine Veränderung in einer spezifischen Seitenkette auf Proteinebene. Prinzipiell könnte man mit einem Verfahren zur posttranslationalen oder Postexpressions-Mutagenese diese Transformation auf direktem Wege, auf der Proteinebene selbst, erreichen. Eine solche Methode wäre auch nicht durch das evolutionäre „Filter“ des Translationsapparates eingeengt und würde den positionsspezifischen Einbau jeder gewünschten natürlichen oder künstlich entworfenen Seitenkette direkt in die Biomoleküle (Proteine und sogar Zucker und Lipide) ermöglichen, die eine biologische Funktion ausüben.

Auch in der Natur ist die posttranslationale Modifizierung (PTM) der zentrale Mechanismus, durch den die Diversität der Protein-Seitenketten über diejenige der proteinogenen Aminosäuren hinaus ausgeweitet wird. Chemisch einfache Modifikationen, wie Methylierungen, und komplexere Strukturen, wie Zuckeranhänge an Glycoproteinen, haben tiefgreifende Konsequenzen für alle biologischen Prozesse. Die biochemische Untersuchung der PTM wurde durch das Fehlen allgemein einsetzbarer und robuster Methoden zur selektiven Einführung der Modifikationen im Protein behindert. Die posttranslational modifizierten Seitenketten stellen eine spezielle Herausforderung für die genetische Mutagenese dar. Eine Alternative zu einer erweiterten Mutagenese könnte von der natürlichen Synthesestrategie der PTM inspiriert werden (Schema 1, Entknüpfung I) und könnte dazu dienen, Proteine direkt, ohne genetische Mutation, im Reagenzglas und letztlich auch im Zellinneren und in Organismen zu modifizieren.

Einige Biochemiker arbeiteten in den späteren 1960er Jahren – vor der Revolutionierung der Biotechnologie durch die Molekularbiologie und vor dem Hintergrund der mehr Aufmerksamkeit heischenden Peptidsynthese – ohne großes Aufsehen an einem präparativen Ansatz zur Mutagenese als einem wertvollen Hilfsmittel, um Proteinfunktionen zu untersuchen. Diese Arbeiten, die in der ersten Umwandlung einer Aminosäure in eine andere durch chemische Veränderung ihrer Seitenkette (von Ser nach Cys) resultierten,<sup>[7]</sup> demonstrierten ein Schlüsselprinzip. Auf diesem Wege wurde ein leistungsfähiges Konzept für eine allgemeinere Methode etabliert, das direkt auf Biomoleküle angewendet werden konnte. Dieser Ansatz ermöglichte die ersten Punktmutationen (ortsspezifisch im Protein) in einem Enzym überhaupt, einfach mithilfe chemischer Synthese. Polder und Bender nannten es „simulierte Mutationen“ und beschrieben eine



Thomas Wright erhielt 2012 seinen B.Sc. (Hons) in chemischen und biologischen Wissenschaften von der University of Auckland in der Gruppe von Prof. Margaret Brimble. Dazu entwickelte er die Thiol-En-Chemie für die Synthese von Lipopeptiden als Impfstoffkandidaten weiter. 2013 begann der seinen D.Phil. bei Prof. Benjamin G. Davis an der University of Oxford, wo er zurzeit neue Reaktionen für die chemische Mutagenese von Proteinen entwickelt.



M. Robert J. Vallée studierte Chemie an der Universität Hamburg, wo er seine Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Paul Margaretha schrieb. 2013 wurde er von der Freien Universität Berlin für seine Arbeiten bei Prof. Christian P. R. Hackenberger promoviert. 2014 wechselte er zur University of Oxford als Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Benjamin G. Davis. Dort arbeitete er an verschiedenen Projekten, von denen sich eines mit der chemischen Mutagenese von Proteinen befasste.

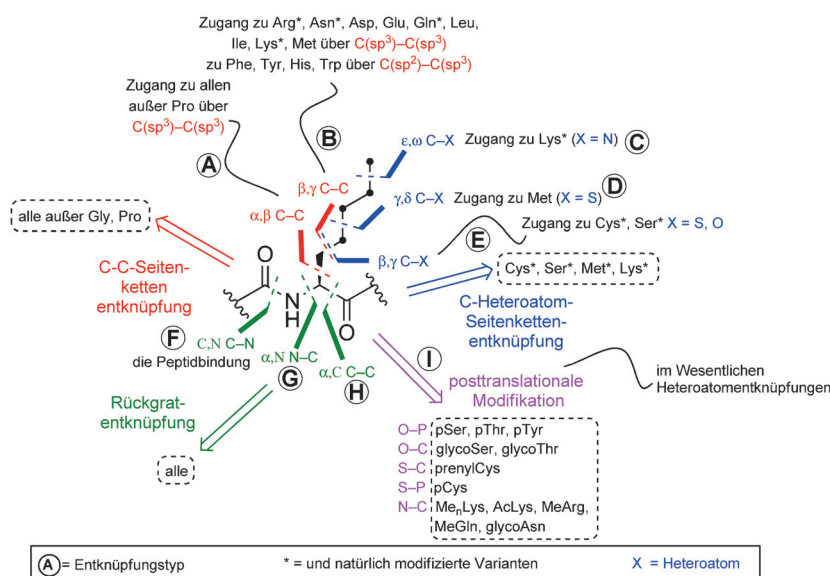


Benjamin G. Davis erhielt seinen B.A. (1993) und seinen D.Phil. (1996) von der University of Oxford, wo er bei Prof. George Fleet Kohlenhydrate studierte. Nach Aufenthalt an der University of Toronto und der University of Durham kehrte er 2001 nach Oxford zurück, wo er 2005 zum Professor ernannt wurde. Er befasst sich mit dem chemischen Verständnis und der Nutzung biomolekularer Funktionen insbesondere von Kohlenhydraten und Proteinen. Er ist Herausgeber der *Current Opinion in Chemical Biology* und Senior Editor der *ACS Central Science*. Er wurde 2015 in die Royal Society gewählt.

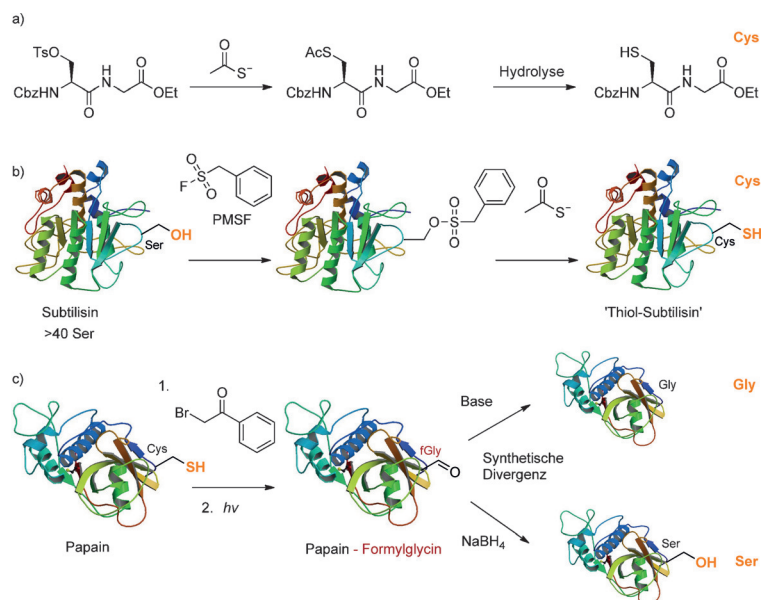
hypothetische Methode: „...by chemical or enzymatic means it is possible to substitute one amino acid of the protein molecule by another, simulating the effect of mutation.“<sup>[7b]</sup>

## 2. Die frühen Jahre: $\beta$ , $\gamma$ -Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungsknüpfung

Die Wurzeln des Konzepts einer chemischen Mutagenese lassen sich zu einer Veröffentlichung von Wilchek et al. aus dem Jahr 1965 zurückverfolgen, in der beschrieben wurde, wie Serinreste in Polypeptiden quantitativ in Cysteinreste umgewandelt wurden (Schema 2a).<sup>[7a]</sup> Serin-Tosylierung und anschließende  $S_N2$ -Substitution ermöglichen die Synthese von Cystein (Reaktion mit Thioacetat und nachfolgende Hydrolyse) und von nichtnatürlichen Analoga (Reaktion mit anderen Thiol-Nucleophilen); dies verdeutlicht die Vorteile des chemischen Ansatzes für die schnelle Diversifizierung von Seitenketten-Strukturen. Der enorme strategische Sprung in dieser Arbeit kann durch einfache Retrosynthese einer generischen Polypeptidstruktur erklärt werden. Damals war (und ist nach Meinung mancher noch immer) die wich-



**Schema 1.** Retrosynthese der Proteinkonstruktion.



**Schema 2.** Wegweisende Beispiele einer  $\beta,\gamma$ -Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungsknüpfung.

tigste Entknüpfung der Proteinsynthese die Peptidbindung (Schema 1, Entknüpfung F; siehe auch Schema 3). Diese Entknüpfung spiegelt nicht nur die wichtigste natürliche Synthesemethode wider (Aminosäureester + Peptidamin = Amid), sondern auch chemische Methoden über andere aktivierte Carboxyderivate von Aminosäuren.<sup>[8]</sup> Wilchek et al. (Schema 1, Entknüpfung E) äußerten die Ansicht, dass sich auch andere Entknüpfungen als nützlich erweisen und zusätzliche Flexibilität bei der Synthese von Proteinen schaffen sollten.<sup>[7a]</sup>

Ausgehend von dieser frühen Arbeit veröffentlichten die Gruppen von Koshland und Bender unabhängig voneinander 1966 die chemische Transformation einer spezifischen Aminosäure-Seitenkette in eine andere in einem intakten Protein,

also die erste Punktmutation überhaupt (Schema 2b).<sup>[7b,c]</sup> In beiden Publikationen wurde die chemische Umwandlung von Serin im aktiven Zentrum von Subtilisin in einen Cysteinrest beschrieben. Zum Vergleich: Die erste Mutation eines Proteins durch eine ortsspezifische Mutagenese der DNA gelang erst 1978.<sup>[9]</sup> Durch Sulfonylierung des im aktiven Zentrum befindlichen Serins mit Phenylmethansulfonylfluorid entstand eine geeignete Abgangsgruppe, die durch Thioacetat ersetzt werden konnte. Die anschließende Hydrolyse der Acetylgruppe erfolgte vermutlich durch die inhärente Enzymaktivität. Auf diesem Wege konnte ein Thiol-Subtilisin hergestellt werden, das im aktiven Zentrum einen Cysteinrest anstelle des Serins als Nucleophil trägt. Das gewünschte Cys



tein wurde durch Aminosäureanalyse und kolorimetrische Titration nachgewiesen.

Ein vielversprechender Aspekt fehlte in diesen frühen Arbeiten: das Element der synthetischen Divergenz ausgehend von einer geeigneten Vorstufe. Die Arbeit von Clark und Lowe<sup>[10]</sup> über chemische Mutationen von Papain lieferte das erste Beispiel von mutationsbasierter Divergenz bei der Umwandlung von Aminosäure-Seitenketten; aus einer gemeinsamen Cys-Vorstufe wurden Gly und Ser generiert (Schema 2c). Das nucleophile Cystein in Papain wurde chemisch über die Zwischenstufe Formylglycin umgesetzt. Formylglycin wurde interessanterweise ebenfalls als nützlicher Rest erkannt, und zwar als natürliche PTM (enzymatisch aus Cys oder Ser erhältlich), die eine Sulfatester-Hydrolyse im aktiven Zentrum von Typ-I-Sulfatasen vermittelt und eine ungewöhnlich reaktive Aldehydmarkierung für die weitere Modifizierung darstellt.<sup>[11]</sup> Die chemische Mutation von Papain durch Clark und Lowe begann mit der selektiven Alkylierung des reaktiven Cys im aktiven Zentrum mit Phenacylbromid. Durch wiederholte Photolyse wurde das Phenacylgehemmte Protein in das gewünschte Thioaldehyd-Produkt umgesetzt. Der Thioaldehyd hydrolysierte langsam unter Bildung von Formylglycin und der Freisetzung von Schwefelwasserstoff. Aus Formylglycin entstand durch Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> Serin, während sich bei einer verlängerten Inkubation bei pH 9.0 in einer Retroaldolreaktion Glycin bildete.<sup>[10]</sup>

Diese Arbeiten waren zweifellos vorausschauend, wobei angemerkt werden sollte, dass die chemischen Reaktionen der Gruppen von Koshland, Bender und Lowe die gesteigerte Nucleophilie der im aktiven Zentrum von Subtilisin (Ser) und Papain (Cys) befindlichen Nucleophile nutzten. Dieser Ansatz illustriert zwei Eigenschaften – Chemo- und Regioselektivität –, aus deren Zusammenspiel präparativer Nutzen gezogen werden kann. Auch wenn dies eine wirksame Strategie zur Erzielung von Regioselektivität ist, ermöglicht ihre notwendigerweise begrenzte Bandbreite (ein einzelner Rest im aktiven Zentrum bestimmter Enzyme) keine allgemeingültige Lösung mit uneingeschränkter Kontrolle der Mutationsposition.<sup>[12]</sup>

### 3. Retrosynthese der Proteinmodifikation

Um die frühen Strategien chemischer Mutageneseansätze allgemein anwenden zu können (den ersten Ansätzen fehlte die allgemeine Zugänglichkeit aller Seitenketten, und zuweilen waren harsche Reaktionsbedingungen erforderlich), half die Anwendung retrosynthetischer Logik. Dies ist ein bequemes Hilfsmittel, mit dem man den manchmal subjektiven Einschränkungen bei der Reaktionsgestaltung entkommen kann,<sup>[13]</sup> denn es hilft, weitere Entknüpfungen und damit weitere Synthons zu identifizieren. Bei Analyse der frühen Arbeiten über chemische Mutagenese im vorigen Abschnitt sehen wir, dass die Entknüpfungen vom Typ E (Schema 1) in beiden Fällen elektrophile Proteinsynthons an der C $\beta$ -Position, verknüpft mit geeigneten X $\gamma$ -Nucleophilen, liefern. Die Vorstufen-Kandidaten, die die Syntheseäquivalente solcher Synthons sind, werden meistens „Tags“ genannt.

Wir haben den Begriff des „tag-and-modify“<sup>[14]</sup> verwendet, um zu verdeutlichen, wie nach unserer Meinung eine generelle Entknüpfungsstrategie auf breiterer Basis entwickelt werden kann. Eine solche Analyse hilft auch oft, für die Strategieentwicklung nützliche Ähnlichkeiten zwischen dem chemischen Verhalten scheinbar unterschiedlicher Proteine aufzudecken. Während z.B. andere tag-and-modify-Reaktionen mit C $\beta$ -Elektrophilen inzwischen ausführlicher in Proteinen untersucht worden sind (z. B. mit C $\beta$ -Se $\gamma$  als neuem Nucleophil<sup>[15]</sup> oder Dha als C $\beta$ -Elektrophil für S $\gamma$ <sup>[16]</sup> und Se $\gamma$ <sup>[17]</sup>), ist das Potenzial eines C $\beta$ -Nucleophils zur Reaktion mit einem elektrophilen Heteroatom (bei einer Entknüpfung umgekehrter Polarität) noch nicht beschrieben worden. In diesem Kurzaufsatz möchten wir die mögliche Allgemeingültigkeit künftiger Entknüpfungen (und möglicher noch nicht verwirklichter Reaktionen) weiter ausloten. Es mag verwundern, aber bislang sind die Hilfsmittel der Retrosynthese kaum systematisch auf die Proteinchemie angewendet worden; zumindest gibt es dazu kaum Veröffentlichungen. Wir glauben, dass eine solche Analyse die Herausforderungen und Chancen der chemischen Proteinmodifizierung verdeutlichen wird. Untersucht man ein allgemein formuliertes Peptidrückgrat, sind zwei breit definierte Entknüpfungen sofort offensichtlich (Schema 1): das Amidrückgrat (Entknüpfungen F–H) und die Anknüpfungspunkte der Seitenketten (Entknüpfungen A–E und I).

#### 3.1. Heteroatom-Kohlenstoff-Entknüpfungen der Seitenketten: weitere Entwicklungen

In der Natur werden die beiden Amidrückgrat- und Seitenketten-Entknüpfungsstellen (Schema 1, Entknüpfungen F und I) genutzt und verknüpft, und zwar im Wesentlichen allein durch Bildung einer Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung. So werden sowohl in der Natur als auch in den frühen Arbeiten zur chemischen Mutagenese die natürlichen Polaritäten sowie ein oft gemachter Fingerzeig bezüglich der Reaktivität genutzt.<sup>[18]</sup> Diese Polarität kann auch Vorteile für die Chemo- und Regioselektivität bieten: Es können passende Selektivitäten entstehen, die sich in einem Meer konkurrierender funktioneller Gruppen als wertvolle Orientierungen erweisen<sup>[19]</sup> und die auch in der Natur (oder sogar in einem einzelnen Biomolekül) vorkommen. Die Absicht, Kohlenstoff-Heteroatom-Kupplungschemie zu nutzen, begünstigt die Konzentration auf die natürliche Nucleophilie der Thiolgruppen des Cysteins<sup>[20]</sup> in vielen Biokonjugationen (und auch in der natürlichen PTM). Die Entwicklung der ortsspezifischen Mutagenese erweiterte daher die allgemeine Anwendbarkeit (Ortsspezifität, Regioselektivität) der chemischen Proteinmodifizierung, indem natürliche Reste mit besonderer Reaktivität (wie Cystein) flexibel an vorherbestimmten Stellen eingeführt werden können. Heute ist die sequenzielle Durchführung einer genetischen Mutagenese (zur Einführung oder Positionierung eines reaktiven Cysteinrestes) und einer nachfolgenden spezifischen Reaktion an einem Thiol als Nucleophil (zur Modifizierung der Cystein-Seitenkette in der gewünschten Weise) die meistverwendete aller präparativen Verfahren zur Proteinmodifizierung abgesehen von der un-

selektiven Lysin-Konjugation. In der Natur ist Cystein selbst Ziel diverser PTMs, von denen einige durch eine direkte Reaktion des  $\text{S}\gamma$ -Nucleophils mit einem  $\text{C}\delta$ -Elektrophil umsetzbar sind (z.B. Prenylierung),<sup>[21]</sup> viele jedoch auch nicht (z.B. Phosphorylierung).<sup>[22]</sup>

Die Nachahmung einer Seitenkettenstruktur des Modifizierungsziels (z.B. einer posttranslationalen Proteinmodifikation) wird in der Proteinforschung oft eingesetzt, wenn der eigentliche gewünschte Rest den bekannten chemischen Methoden nicht zugänglich ist. Auch bei diesem Ansatz erfolgte oft eine Heteroatom-Kohlenstoffatom-Bindungsknüpfung, um thia-Xxx-Analoga wie thia-Lysin,<sup>[23]</sup> thia-Arg<sup>[24]</sup> oder sogar thia-homo-Glu<sup>[25]</sup> zu bilden; dies ermöglicht manchmal einzigartige mechanistische Einblicke (z.B. bezüglich des  $\text{pK}_\text{a}$ -Werts oder der Geometrie), die über diejenigen auf Grundlage der eingeschränkten Palette der klassischen Mutagenese hinausgehen. In einigen Fällen wurden die Spuren von Cys, die nach der nativen chemischen Ligation (NCL; siehe unten) übrig waren, genutzt,<sup>[25b]</sup> und sogar der Nachahmungsgrad wurde untersucht.<sup>[26]</sup> Eine sorgfältige Kontrolle der Reaktionsbedingungen wird sich als notwendig erweisen, um unbeabsichtigte Überreaktionen an anderen als den Cys-Resten (z.B. His, Met<sup>[27]</sup>) zu vermeiden.

Eine solche Nachahmung der Seitenketten ist nicht auf Cystein als Nucleophil beschränkt. Das gleiche Prinzip der Nutzung einer inhärenten Polarität liegt auch der Konversion von Lys zu Homoarginin mit Isoharnstoffderivaten durch Reaktion eines  $\text{N}\omega$ -Nucleophils mit einem  $\text{C}\omega$ -Elektrophil zugrunde,<sup>[28]</sup> die man als beinahe chemische Mutagenese ansehen kann. Diese nichtnatürliche Entknüpfung hat große Ähnlichkeit mit natürlichen Entknüpfungen (z.B. Lysinacylierung).

Auch wenn die Retrosynthese von C-X-Bindungen (und allen weiteren Bindungen) in der Theorie drei verschiedene Synthons bei diesem Entknüpfungstyp zulässt (zwei heterolytische – positiv-negativ und umgekehrt – und eine homolytische), konzentrieren sich die meisten Ansätze bislang auf geladene Synthons mit natürlicher Polarität.<sup>[29]</sup> Eine wichtige Ausnahme ist die Thiol-En- (genauer Thiyl-En-)Chemie, die das einzelne Elektron eines Thiylradikals für eine Alkylierung mit Somophilen<sup>[\*]</sup> wie terminalen Alkenen nutzt. In diesem System ermöglichen die inhärenten Einflüsse der Polarität (elektrophiles Thiyl) eine Regioselektivität (terminale Thiylisierung), aber anders als bei heterolytischen Entknüpfungen diktiert sie nicht die Art der Entknüpfung an sich.<sup>[30]</sup> Diese Eigenschaft ermöglicht so eine Entknüpfung nicht nur zu einem typischerweise reaktionsträgen Doppelbindungs- $\text{C}\delta$ -Somophil,<sup>[30]</sup> sondern stellt außerdem ein seltenes Beispiel einer Entknüpfung vom Typ C dar (Schema 1). Die Einführung eines *N*-Acetyl-thia-Lysins als Acetyllysin-Analogon (mithilfe eines  $\text{S}\gamma$ -Radikals), das durch direkte Alkylierung mit einem  $\text{S}\gamma$ -Nucleophil nicht zugänglich ist,<sup>[31]</sup> nutzt auch die veränderten Selektivitäten von Radikalen in der Proteinchemie. Eine interessante aktuelle Veröffentlichung aus der Gruppe von Payne weist auf das Potenzial von

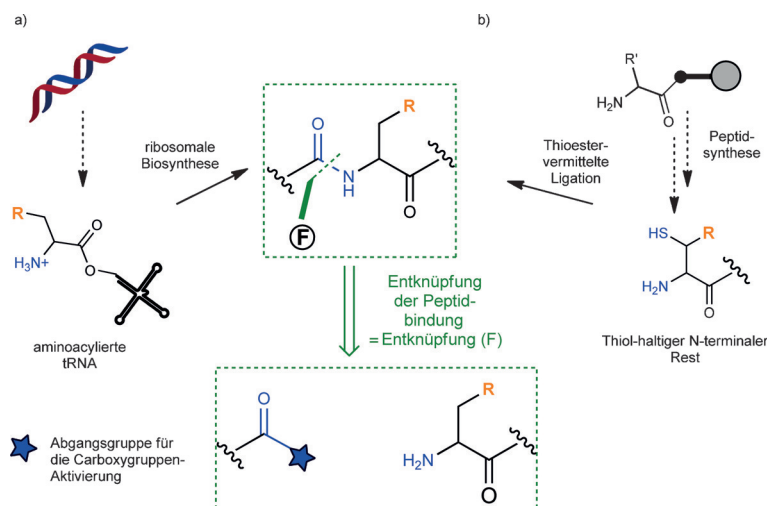
C-Radikalen für die Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungsknüpfung bei der Proteinmodifizierung hin.<sup>[32]</sup> Die Erzeugung eines Alanyl-Radikals an einem Peptidsubstrat durch Deselenierung eines präparativ eingeführten Selenocysteins und das anschließende Abfangen mit einem Überschuss an Oxone eröffnen den Zugang zu Ser durch ein  $\text{C}\beta$ -Radikal und ein  $\text{O}\gamma$ -Somophil. Diese Reaktion ermöglicht einen alternativen homolytischen Weg zu den Entknüpfungen vom Typ E (Schema 1).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Reaktionen, oft formale Cycloadditionen, die Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungsknüpfungen sind, für die Proteinmodifizierung entwickelt; sie waren vielfach vom Konzept der Klick-Chemie inspiriert.<sup>[18]</sup> Eine Reihe von Zielen hat das Design dieser Reaktionen beeinflusst, und oft war das „Markieren“ der beherrschende Aspekt der präparativen Proteinforschung in der chemischen Biologie. Der Einsatz von untereinander selektiven, kompatiblen Reagentienpaaren mit schneller Kinetik für die Knüpfung der Heteroatombindung hat sich zu einer nützlichen Lösung für diese Anwendung entwickelt. Die eingeschränkte Variabilität der durch einen solchen Ansatz erhältlichen natürlichen Strukturen macht es jedoch erforderlich, weitere Entknüpfungen zu untersuchen, zum Zugang zu Strukturen zu erhalten, die auf nützlichere Weise diejenigen imitieren, die Funktion rekapitulieren.

### 3.2. Entknüpfungen an der Amidbindung: Stand der Technik und Aussichten

Das Ribosom, für viele die bemerkenswerteste und nützlichste biologische Maschine, beruht auf der Entknüpfung F der Amidbindung (Schema 3). Im Zentrum des Ribosoms wird die Kondensationsreaktion eines Aminosäureesters mit einem Amin verstärkt und kontrolliert. Künstlich entworfene Prozesse zur Proteinmanipulation auf Translationsebene (Stoppcodon-Suppression, auxotropher Einbau usw.) zielen daher auf die Amidbindungs-Entknüpfung und müssen bei der Umsetzung alle assoziierten biosynthetischen Stringenzen berücksichtigen. Die Zuverlässigkeit des Systems, das für die fehlerfreie Proteinsynthese und damit die zellulären Funktionen verantwortlich ist, bringt für ein solches Verfahren allerdings starke Einschränkungen mit sich, die auf die während der Evolution herausgebildete Stringenz des Ribosoms und der assoziierten Aminosäure/tRNA-Synthetasen zurückgehen. Während zellfreie Systeme und solche mit inaktivierten oder veränderten Korrekturmechanismen von einer größeren Plastizität profitieren können, ist die Stringenz bei direkten cotranslationalen Verfahren zum Einbau künstlicher Aminosäuren immer spürbar. Dennoch wurden einige sehr hilfreiche PTM-Beispiele (nitro-Tyr,<sup>[33]</sup> sulfo-Tyr,<sup>[34]</sup> verschiedene acylierte Lys,<sup>[35]</sup> phospho-Ser)<sup>[36]</sup> umgesetzt, indem die vorhandenen Plastizitäten und/oder Selektivitäten genutzt wurden. Im besten Falle können diese erfolgreichen Einbausysteme natürlich von der gleichen Stringenz der Translation als Mechanismus von Selektivität und Qualitätskontrolle profitieren; weniger stringente Systeme mit größerer Plastizität dagegen sind oft auch Quelle unerwünschter Ableseungenauigkeiten.<sup>[37]</sup>

[\*] „Somophil“ (oder „SOMO-phil“) verwenden wir hier zur Beschreibung chemischer Spezies mit Affinität für „offenschalige“ freie Radikalspezies, die einfach besetzte MOs aufweisen (SOMOs).



**Schema 3.** Trennung der Peptidbindung zum Einfügen einer beliebigen Aminosäure. Als dominierende Verfahren der (chemischen oder biosynthetischen) Proteinsynthese sind strategische Methoden zur Schaffung von Fragmenten weit verbreitet. Hier sind zwei prinzipiell verschiedene Methoden zur Erzeugung einer gewünschten Aminosäure dargestellt; beide nutzen das nucleophile C-terminale synthetische Fragment, das durch die Trennung F entsteht: a) eine „beladene“ tRNA, wie sie während der ribosomalen Biosynthese vom N- zum C-Terminus eingesetzt wird (und daher auch vom Ribosom akzeptiert werden muss); b) ein C-terminales Peptidfragment, das eine Thiol-Hilfsgruppe trägt, die an einer Thioester-vermittelten nativen chemischen Ligation mit einem geeignet aktivierten N-terminalen Carboxy-Donorfragment beteiligt sein kann.

Daneben kann man mit der Stoppcodon-Suppression eine Modifikation als Basis für eine spätere chemische Umsetzung „einschuggeln“. Unter diesem Blickwinkel ergeben sich Möglichkeiten für eine synthetische Divergenz durch die Einführung von Resten, die als Vorstufen für verschiedenste Modifikationen wirken können. So kann beispielsweise *p*-Borphenylalanin chemisch nach der Expression in Phenylalanin oder Tyrosin umgewandelt werden.<sup>[38]</sup>

Die biokatalytische Manipulation von Amidien ist natürlich nicht auf die ribosomale Katalyse beschränkt: Mit proteolytischer Aktivität und ihrer Umkehrung kann im Prinzip Ähnliches erreicht werden. Eine solche Serie enzymatischer Reaktionen wurde tatsächlich als verallgemeinerte Methode zum Umwandeln einer einzelnen Aminosäurevorstufe in eine Reihe unterschiedlicher Seitenketten vorgeschlagen.<sup>[39]</sup> So lässt sich in dem Trypsininhibitor aus Sojabohne ein Arg zu einem Lys durch Inkubation mit Trypsin (das selektiv die Arg64-Ile65-Peptidbindung spaltet) mutieren; die anschließende Zugabe eines Überschusses einer freien Aminosäure und der Einsatz von Carboxypeptidase B als Katalysator (oder Rückgriff auf eine chemische Aktivierung) ermöglicht die Ligation von freiem Lys an den C-Terminus des N-terminalen Fragments. Chemische Verfahren erweitern das Auswahlpektrum auf alle geeignet aktivierten Aminosäuren, allerdings um den Preis der Gefährdung der Selektivität.

Diese und andere proteasekatalysierte Ligationen<sup>[40]</sup> wie enzymatische Mutationen können als Vorläufer von aktuellen chemischen Proteinligationsverfahren angesehen werden, da sie direkt das Rückgrat des Proteins durch „Schneiden und Einfügen“ verändern. Die kreative Anwendung eines solchen Ansatzes, unterstützt durch eine rasche Weiterentwicklung der Ligationstechniken, hat ein erhebliches Potenzial für neue Verfahren der chemischen Mutagenese. Die native chemische Ligation (NCL; Schema 3b)<sup>[8c]</sup> ist vielleicht das herausragende Beispiel für chemische Herangehensweisen an die

Proteinsynthese (und damit den Einbau von Modifikationen). Hier lohnt sich eine Betrachtung einiger zentraler Eigenschaften, die den Erfolg der Reaktion bedingen, als mögliche Leitlinien für künftige Reaktionen auf Basis anderer Entknüpfungen. Unter diesen ist die Kombination zweier chemischer Erkennungsereignisse – nämlich zunächst das Einfangen durch ein freies Thiol und dann der nucleophile Angriff des N-terminalen Amins – der Grund für die auffallende Selektivität der Reaktion. So könnten sich Doppelmotive (wenn man sie in einer großen Zahl von Reaktionen geeigneter Produktivität findet) als nützlich erweisen.

Die ungewöhnliche Eignung dieses Doppelmotivs hat aber auch zur Folge, dass trotz mehr als dreißigjähriger Forschung die NCL typischerweise auf dieser Reaktivität (einschließlich Variationen mit homologen oder veränderten Thiolen/Selenolen usw.) beruht. In der Praxis ist die Strategie daher hauptsächlich auf eine Entknüpfung Xaa-Cys oder Xaa-Ala im Proteinrückgrat beschränkt, obwohl zahlreiche chalkogenabsplattende Varianten der behandelten Thiol-/Selenol-Aminosäuren prinzipiell auch andere Entknüpfungen ermöglichen.<sup>[41]</sup> Das Haupthindernis für die Ausweitung dieses Ansatzes liegt in der Abhängigkeit von dem Doppelmotiv, also der Erfordernis für einen N-terminalen Thiolpeptidrest und einen C-terminalen Thioester eines zweiten Peptids, was präparativ anspruchsvoll sein kann. Während für die Peptidsynthese viele neue Thiol-Aminosäurebausteine entwickelt wurden, sind nur wenige kommerziell erhältlich, und die Synthesen scheinen schwierig (trotz ständiger Verbesserungen). Die Umwandlung von Cystein in Alanin durch Desulfurierung ist momentan die einzige Erweiterung der Originalvorschrift, die bereits oft auf Proteinsubstrate angewendet wurde.<sup>[41]</sup> Auch die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL),<sup>[42]</sup> eine der nützlichsten Anwendungen der NCL für die Untersuchung mittlerer bis großer Proteine, bleibt auf Xaa-Cys- und Xaa-Ala-Entknüp-

fungen beschränkt, wenn sie mit einem exprimierten C-terminalen Fragment ausgeführt wird. Neue Ligationen jenseits von Cys (z. B. bei Met<sup>[43]</sup>) und neue Methoden, um Cys-Reste nach der Ligation in andere natürliche Reste umzuwandeln (z. B. vergleichbar mit früheren Methoden, um Seitenketten unter Nutzung anderer Entknüpfungen, wie in Schema 1 gezeigt, nachzubilden<sup>[25b]</sup>) würden daher die Reichweite der Ligungsstrategien enorm vergrößern. Auch Beispiele, in denen nach der Synthese eine N-terminale Thiol/Selenol-Hilfsgruppe eingefügt wird, sind beachtenswert,<sup>[44]</sup> denn auch sie können sich für rekombinante Proteine eignen und so den Zugang zum C-terminalen Partnerfragment im Rahmen der EPL-Methodik erweitern.

### 3.3. Perspektiven der chemischen Mutagenese: übersehene Entknüpfungen

Bei der Vorstellung der aktuellen Methoden wurden in diesem Kurzaufsatz nur wenige der möglichen, in Schema 1 gezeigten Entknüpfungen gestreift, insbesondere die Entknüpfungen E, F und I. Die übrigen bleiben weitgehend unberücksichtigt, oder es gibt nur selten Beispiele dafür. Bis jetzt beschränkt sich die Modifizierung von Seitenketten hauptsächlich auf Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen und wird durch den enormen Bedarf an Markierungsreaktionen mit schneller Kinetik für Anwendungen wie Fluoreszenzmarkierungen in Zellen getrieben. Bei solchen Anwendungen, bei denen die Bindung eines Markers zentral ist, sind die genaue Natur der Bindung an die Seitenkette, die modifiziert wird, und entsprechend die exakte Struktur des entstehenden Produkts nicht notwendigerweise von Interesse. Eine Kohlenstoff-Heteroatom-Reaktion wird daher bevorzugt, denn sie ist schnell und einfach durchzuführen. Eine vielleicht noch größere Einschränkung ist, dass gegenwärtig nur wenige Kohlenstoff-Kohlenstoff-Kupplungen zur Verfügung stehen, die mit Proteinen verträglich sind und in wässrigem Medium durchgeführt werden können. Der chemische Aufbau der kohlenstoffreichen nativen Aminosäure-Seitenketten in situ sowie der meisten ihrer posttranslational modifizierten Varianten auf eine Zielstruktur-orientierte Weise erfordert Entknüpfungen an Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (z. B. die Entknüpfungen A oder B in Schema 1).

Die C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Entknüpfung (A) liefert ein glycinartiges Fragment als proteinassoziiertes Synthon. Bislang wurden noch keine Reaktionen zur Funktionalisierung von Glycin in Proteinen veröffentlicht. In der Peptidchemie ist die Glycinmodifikation allerdings gut etabliert; es gibt Verfahren mit Glycinkationen, -anionen/-enolaten und -radikalen einschließlich asymmetrischer Varianten. Allerdings sind nur wenige der veröffentlichten Reaktionen mild genug, um einfach auf Proteine übertragbar zu sein: Die meisten erfordern organische Lösungsmittel, starke Basen oder erhöhte Temperaturen jenseits derer, die in Wasser oder mit Proteinen möglich sind. Da außerdem Glycin eine der häufigsten Aminosäuren in Proteinen ist, ist die Chance für ortsspezifische Modifikationen zumindest teilweise eine reine Frage der Statistik des Reaktionsverlaufs und/oder der Selektivität. (Dieses Problem taucht im Übrigen auch oft bei der Modifi-

zierung von Lys auf.) In diesem Zusammenhang kann die Funktionalisierung an N-terminalen Glycinresten oder ein Sequon-basierter Ansatz zur Positionierung eines Metallkatalysators oder eines aktivierenden Reagens die erforderliche Chemo Selektivität sicherstellen.

Die C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub>-Entknüpfung (B) resultiert in der Betrachtung eines Fragments vom Alanin-Typ. Alanin selbst kann möglicherweise durch selektive C<sub>sp<sup>3</sup></sub>-H-Aktivierung modifiziert werden. Dies würde wahrscheinlich auch die Identifizierung oder den Entwurf einer Polypeptidsequenz erfordern, um die Metallkoordination und die spezifische C-H-Aktivierung zu erleichtern. Neuere Arbeiten über palladiumkatalysierte Transformationen, z. B. Suzuki-Miyaura-Kupplungen,<sup>[45]</sup> haben gezeigt, dass übergangsmetallkatalysierte Reaktionen für die Proteinmodifizierung nutzbar sind; weitere Anwendungen dieser wirksamen Metallkatalysatoren sind zu erwarten, auch wenn sich die C-C-Bindungsknüpfung zum Aufbau und zur Veränderung nichtaromatischer Seitenketten wahrscheinlich als anspruchsvoller erweisen wird als die Beispiele, die bislang für C<sub>sp<sup>2</sup></sub>-C<sub>sp<sup>2</sup></sub>-Kupplungen vorgestellt worden sind.

Forschungen über C-C-Verknüpfungen auf Basis eines solchen Ansatzes sollten mit Nachdruck vorangetrieben werden, um den vollen Umfang der möglichen retrosynthetischen Wege aus neuen und bestehenden Fragmenten als Syntheseäquivalente zu nutzen. Während die C<sub>sp<sup>3</sup></sub>-C<sub>sp<sup>3</sup></sub>-Bindung einen nützlichen direkten Zugang liefern würde, könnten Verfahren wie die Metathese einen denkbaren indirekten Zugang über die C<sub>sp<sup>2</sup></sub>=C<sub>sp<sup>2</sup></sub>-Bindung und das Überführen funktionaler Gruppen ineinander (d. h. hier: Reduktion) eröffnen, um dieselbe Entknüpfung auszunutzen. Effiziente Kreuzmetathesen an Proteinen haben bislang chalkogenvermittelte Relaiseffekte genutzt<sup>[17,46]</sup> (und damit Zugang zu längeren Seitenketten geschaffen), es sind aber auch Mehrfach-Relaismethoden z. B. für die C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub>-Entknüpfung (B) denkbar.

Sind einmal Syntheseverfahren für diese C-C-Entknüpfungen verfügbar, wird sich eine verlockende Möglichkeit (unter vielen) bieten. Durch Aufbauen des Kohlenstoffgerüsts, das die Aminosäureseitenketten bestimmt, wird es möglich sein, nicht nur viele natürliche Aminosäuren, sondern auch ihre modifizierten Varianten glatt zu synthetisieren. Die PTM von Proteinen mithilfe von Writer-Enzymen lässt sich funktional auf chemische Art nachvollziehen. Dazu können z. B. thia-Analoga entweder von methyliertem Lys<sup>[22,23d]</sup> oder GlcNAcyliertem<sup>[22,47]</sup> oder phosphoryliertem Ser<sup>[48]</sup> dienen. Natürliche (z. B. C-C-)Verknüpfungen würden sich naturgetreu durch „Markieren und Modifizieren“ (tag-and-modify) nachahmen lassen, wobei eine funktionelle Gruppe spezifischer Reaktivität (das „Synthon-Tag“) in das Protein eingeführt und anschließend durch eine selektive chemische Funktionalisierung modifiziert wird. Dadurch lässt sich nicht nur die gewünschte Aminosäure-Seitenkette, sondern auch jede gewünschte Modifikation dieser Seitenkette einführen. Zur Erzeugung vieler Varianten an einer Stelle ausgehend von einer einzigen Markierung oder einem Synthon in einem Protein können dann allgemein einsetzbare Methoden entwickelt werden. Die präparativen Anforderungen an jede Methode, die auf die Entknüpfungen A und B (Schema 1) hinzielt, sind beträchtlich und haben alle ihren



eigenen Reiz. Jedes Verfahren, gleich ob für Entknüpfung A oder B, wird mit mehreren Herausforderungen konfrontiert werden: 1) ausreichende Reaktivität in wässrigem/biologischem Milieu; 2) selektive Bindungsknüpfung; 3) hinreichend milde Reaktionsbedingungen, die die Funktionen von Protein und Modifikationen im Verlauf der Reaktion nicht beeinträchtigen. Viele bekannte Reaktionen, die man sich vorstellen kann, scheitern hier. Die Antwort auf diese Herausforderungen wird wahrscheinlich zur gleichen Zeit in der Entwicklung völlig neuer Reaktionen und im Anpassen teilweise vergessener Ansätze bestehen (wie in diesem Kurzaufsatz illustriert).

#### 4. Schlussfolgerungen

Die chemische Mutagenese wartet auf eine Wiederentdeckung. Die sprunghafte Zunahme des Interesses an einer chemischen Proteinmodifizierung, verbunden mit einer schnellen Verfügbarkeit von Ansätzen zur Ligation und zur Bildung von Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen, lässt darauf schließen, dass das Gebiet reif für eine neue Herausforderung ist. Die natürliche PTM ist eine der herausragenden Aufgaben der Proteinmodifizierung, deren Lösung mit den aktuell verfügbaren zielorientierten Methoden in zentralen Punkten noch nicht möglich ist. So scheint eine effiziente Einführung sehr kleiner Modifikationen (wie die Monomethylierung von Lys) ebenso wie die sehr großer Modifikationen (wie die GlcNAcylierung von Ser) nicht durch Eingriffe in die Translationsmaschinerie erreichbar zu sein. Dieses Feld bietet reichlich Möglichkeiten zur Entdeckung neuer Syntheseverfahren zur mechanistischen Analyse der Biologie. Wir hoffen, dass die etwas vereinfachenden (aber dennoch sehr informativen) Retrosynthesen, die hier vorgeschlagen wurden, verdeutlichen, wie viele Möglichkeiten noch un bearbeitet sind, und möchten ausdrücklich zur Erforschung neuer Methoden ermutigen.

Der Nutzen solcher Synthesemethoden und ihrer Produkte ist sofort einsichtig: Nicht nur die Herstellung einer neuen Generation künstlicher Protein-Wirkstoffe,<sup>[49]</sup> sondern auch der Aufbau einer lebendigen und langlebigen assoziierten chemischen Industrie lässt sich ohne großes Risiko vorhersagen, im Unterschied zur derzeitigen chemischen Industrie, die noch die strategischen Kennzeichen der Kohlen teerverarbeitung trägt. Auch wenn die Diskussion um die synthetische Biologie momentan noch durch die Anwendung indirekter Methoden ausgehend von Nucleotiden bestimmt wird, kann man nach unserer Auffassung erst dann von einer wahren synthetischen Biologie sprechen, wenn sich die Vision einer chemischen Mutagenese erfüllt hat und wir die funktionalen Moleküle des Lebens (Proteine, Zucker, Lipide) flexibel umprogrammieren können und so mit der Entwicklung der synthetischen Chemie im letzten Jahrhundert gleichziehen können.

#### Danksagungen

T.W. wird von der Rutherford Foundation gefördert. M.R.J.V. wird durch Projekte der EPSRC gefördert (EP/I500200/1 und EP/K503769/1). B.G.D. ist Preisträger eines Royal Society Wolfson Research Merit Award.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 5896–5903  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 5994–6002

- [1] G. Winter, A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. Zoller, M. Smith, *Nature* **1982**, 299, 756–758.
- [2] F. Crick, *Nature* **1970**, 227, 561–563.
- [3] A. Dumas, L. Lercher, C. D. Spicer, B. G. Davis, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 50–69.
- [4] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, 292, 498–500.
- [5] a) J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9026–9027; b) S. K. Blight, R. C. Larue, A. Mahapatra, D. G. Longstaff, E. Chang, G. Zhao, P. T. Kang, K. B. Church-Church, M. K. Chan, J. A. Krzycki, *Nature* **2004**, 431, 333–335.
- [6] a) D. P. Nguyen, M. M. Garcia Alai, P. B. Kapadnis, H. Neumann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14194–14195; b) H.-w. Ai, J. W. Lee, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5506–5508; c) D. Groff, P. R. Chen, F. B. Peters, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1066–1068; d) D. P. Nguyen, M. M. G. Alai, S. Virdee, J. W. Chin, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 1072–1076.
- [7] a) C. Zioudrou, M. Wilchek, A. Patchornik, *Biochemistry* **1965**, 4, 1811–1822; b) L. Polgar, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3153–3154; c) K. E. Neet, D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, 56, 1606–1611.
- [8] a) V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3115–3121; b) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154; c) P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [9] C. A. Hutchison, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 6551–6560.
- [10] P. I. Clark, G. Lowe, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 84, 293–299.
- [11] M. J. Appel, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 72–84.
- [12] Im Prinzip ließen sich beide Reaktionstypen auch in einem allgemeineren Ansatz verwenden, wenn die Reaktivität für Ser- oder Cys-Reste auch außerhalb des aktiven Zentrums ausreichen würde. Leider ist die Cys-Alkylierung mit  $\alpha$ -Halogen-carbonylverbindungen oft unselektiv (His und Lys konkurrieren als Nucleophile), und die Ser-Sulfonylierung ist zu schwach für nichtaktiviertes Ser.
- [13] a) R. Robinson, *The Structural Relations of Natural Products*, **1955**; b) E. J. Corey, X.-M. Cheng, *The Logic of Chemical Synthesis*, Wiley, New York, **1995**.
- [14] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 730–741.
- [15] Z. P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4513–4514.
- [16] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5052–5053.
- [17] Y. A. Lin, O. Boutureira, L. Lercher, B. Bhushan, R. S. Paton, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 12156–12159.
- [18] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056–2075.
- [19] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7108–7133.
- [20] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 630–640.
- [21] M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3176–3177.



- [22] J. M. Chalker, L. Lercher, N. R. Rose, C. J. Schofield, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1835–1839; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1871–1875.
- [23] a) H. Lindley, *Nature* **1956**, *178*, 647–648; b) J. M. Messmore, D. N. Fuchs, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8057–8060; c) L. M. Gloss, J. F. Kirsch, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3990–3998; d) M. D. Simon, F. Chu, L. R. Racki, C. C. de la Cruz, A. L. Burlingame, B. Panning, G. J. Narlikar, K. M. Shokat, *Cell* **2007**, *128*, 1003–1012.
- [24] D. D. Le, A. T. Cortesi, S. A. Myers, A. L. Burlingame, D. G. Fujimori, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2879–2882.
- [25] a) M. Lukac, R. J. Collier, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6146–6149; b) G. G. Kochendoerfer, S.-Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. H. Kent, J. A. Bradburne, *Science* **2003**, *299*, 884–887.
- [26] a) G. Jia, W. Wang, H. Li, Z. Mao, G. Cai, J. Sun, H. Wu, M. Xu, P. Yang, W. Yuan, S. Chen, B. Zhu, *Cell Res.* **2009**, *19*, 1217–1220; b) D. Seeliger, S. Soeroes, R. Klingberg, D. Schwarzer, H. Grubmüller, W. Fischle, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 150–154.
- [27] C. E. Hopkins, P. B. O'Connor, K. N. Allen, C. E. Costello, D. R. Tolan, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1591–1599.
- [28] W. L. Hughes, H. A. Saroff, A. L. Carney, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2476–2480.
- [29] D. Seebach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 239–258; *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 259–278.
- [30] N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7798–7802; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7938–7942.
- [31] F. Li, A. Allahverdi, R. Yang, G. B. J. Lua, X. Zhang, Y. Cao, N. Korolev, L. Nordenskiöld, C.-F. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9611–9614; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9785–9788.
- [32] L. R. Malins, N. J. Mitchell, S. McGowan, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12716–12721; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12907–12912.
- [33] H. Neumann, J. L. Hazen, J. Weinstein, R. A. Mehl, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4028–4033.
- [34] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1436–1440.
- [35] a) H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 232–234; b) C. H. Kim, M. Kang, H. J. Kim, A. Chatterjee, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7246–7249; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7358–7361; c) H. Xiao, W. Xuan, S. Shao, T. Liu, P. G. Schultz, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1599–1603; d) B. J. Wilkins, L. E. Hahn, S. Heitmüller, H. Frauendorf, O. Valerius, G. H. Braus, H. Neumann, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 939–944.
- [36] a) C. M. Zhang, C. Liu, S. Slater, Y. M. Hou, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 507–514; b) S. Lee, S. Oh, A. Yang, J. Kim, D. Söll, D. Lee, H.-S. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5771–5775; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5883–5887; c) D. T. Rogerson, A. Sachdeva, K. Wang, T. Haq, A. Kazlauskaitė, S. M. Hancock, N. Huguenin-Dezot, M. M. K. Muqit, A. M. Fry, R. Bayliss, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 496–503.
- [37] H. R. Aerni, M. A. Shifman, S. Rogulina, P. O'Donoghue, J. Rinehart, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e8.
- [38] E. Brustad, M. L. Bushey, J. W. Lee, D. Groff, W. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8220–8223; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8344–8347.
- [39] a) R. W. Sealock, M. Laskowski, *Biochemistry* **1969**, *8*, 3703–3710; b) H. R. Wenzel, H. Tschesche, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 295–296; *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 292–293.
- [40] a) V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1437–1449; *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1440–1452; b) A. Goswami, S. G. Van Lanen, *Mol. BioSyst.* **2015**, *11*, 338–353.
- [41] P. E. Dawson, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 862–867.
- [42] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [43] T. Tanaka, A. M. Wagner, J. B. Warner, Y. J. Wang, E. J. Petersson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6210–6213; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6330–6333.
- [44] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 260–266.
- [45] J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347.
- [46] Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, G. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642–9643.
- [47] L. Lercher, R. Raj, N. A. Patel, J. Price, S. Mohammed, C. V. Robinson, C. J. Schofield, B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7978.
- [48] K. P. Chooi, S. R. G. Galan, R. Raj, J. McCullagh, S. Mohammed, L. H. Jones, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1698–1701.
- [49] B. G. Davis in *Biotherapeutics: Recent Developments using Chemical Biology* (Hrsg.: L. H. Jones, A. J. McKnight), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2013**, S. 130–144.

Eingegangen am 5. Oktober 2015,  
veränderte Fassung am 2. Januar 2016  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich