
Die Staudinger-Ligation

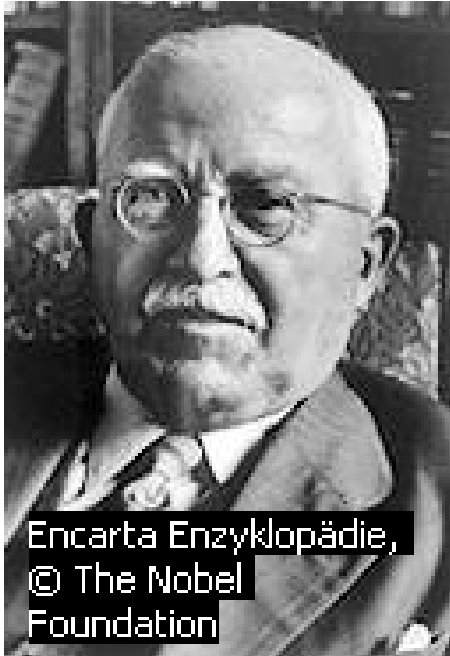
-ein Geschenk für die chemische
Biologie

Von C. Erger, M. Marek, T. Hein, K. Reinsberg

Inhalt

- Staudinger – Reaktion
- Staudinger – Ligation
- Anwendungen
 - Peptidligation
 - Synthese von Biokonjugaten
 - Metabolisches Zell-Engineering

Hermann Staudinger (1881 – 1965)



- Oxalylchlorid, Ozonisierung, Autoxidation, aliphatische Diazoverbindungen, Explosionen, Pyrethrin, synthetische Pfeffer- und Kaffeearomen, Arbeiten über Makromoleküle, organische Kolloide
- Staudinger Index
- 1953 Nobelpreis in Chemie für die Entdeckungen in der makrolekularen Chemie

Die Problematik

- Verknüpfung zweier molekularer Einheiten
- Komplexe biologische Systeme
- Vielzahl von funktionellen Gruppen
- Funktionalität der biologischen Systeme hängt von äußeren Parametern ab
(pH-Wert, Temperatur,...)

Ziel der Synthese

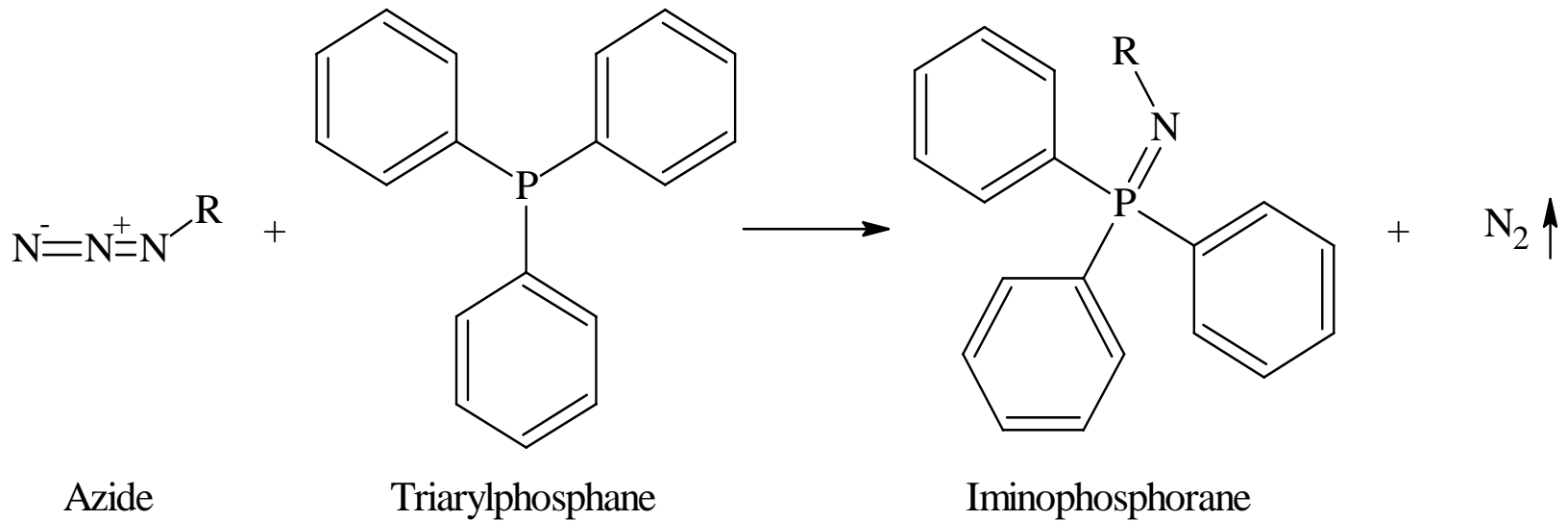
- Nur zwei funktionelle Gruppen sollen miteinander reagieren, die wechselseitig selektiv sind
- Möglichst in wässrigem Milieu
- Tolerieren von anderen funktionellen Gruppen bzw. Vermeidung von Schutzgruppen

Vorteile der Azidogruppe

- Fast kein natürliches Vorkommen in Molekülen (Bioorthogonalität)
- Hohe Nukleophilie, aber trotzdem eine hohe Selektivität
- Kleines Volumen

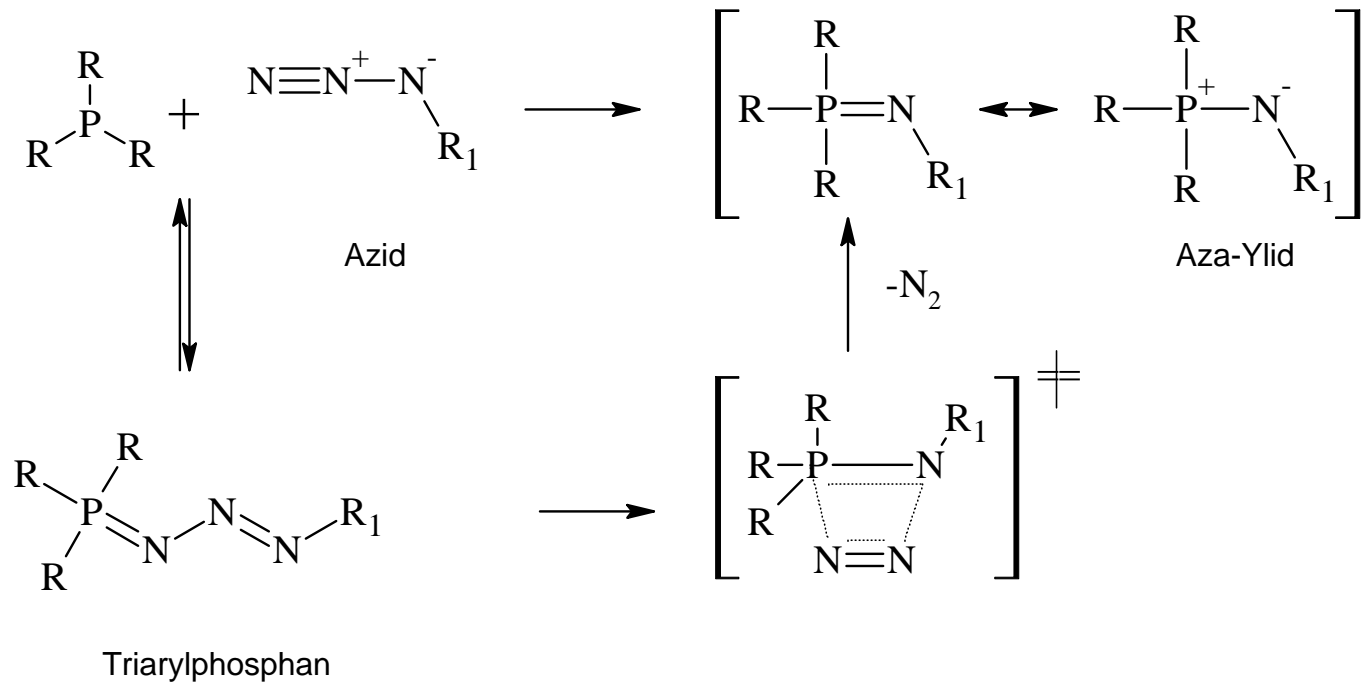
Die Staudinger Reaktion

Staudinger Reaktion



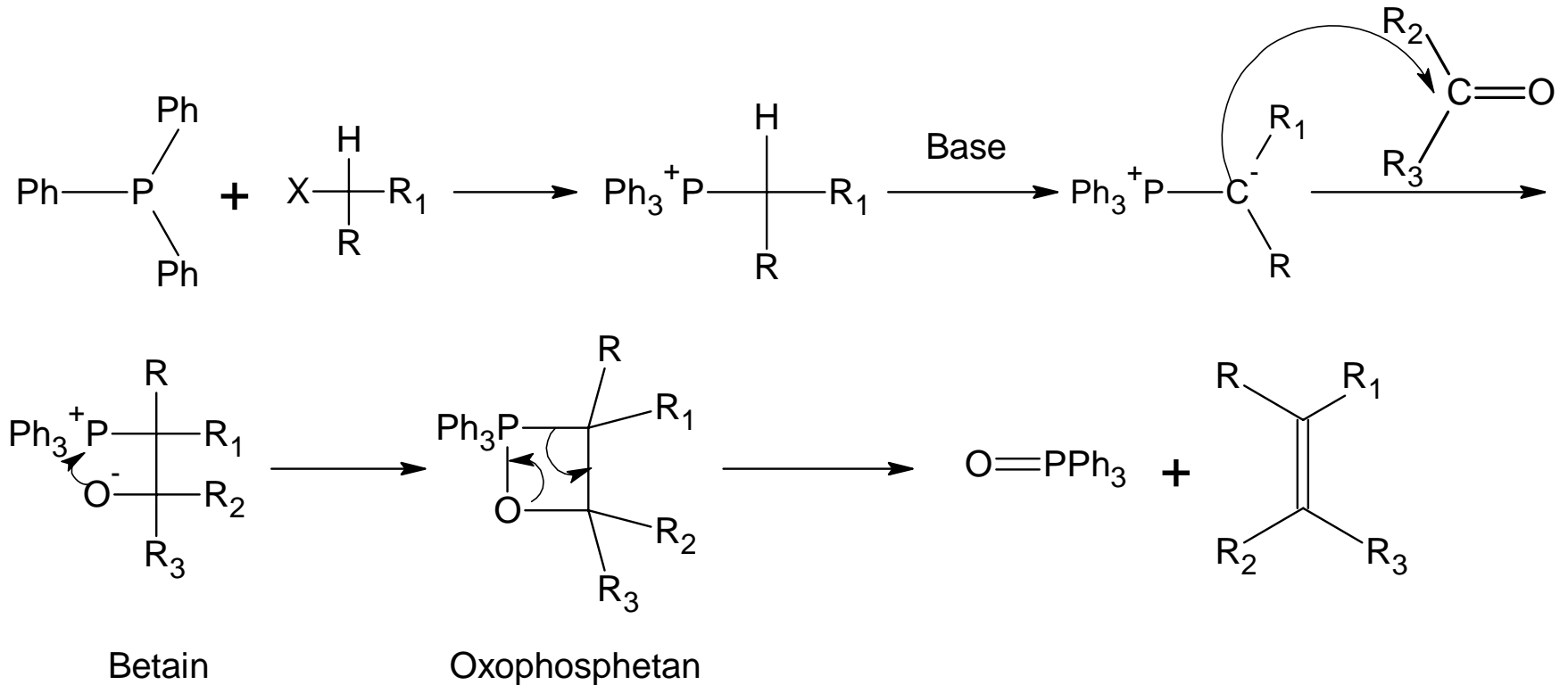
M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3168-3178

Mechanismus

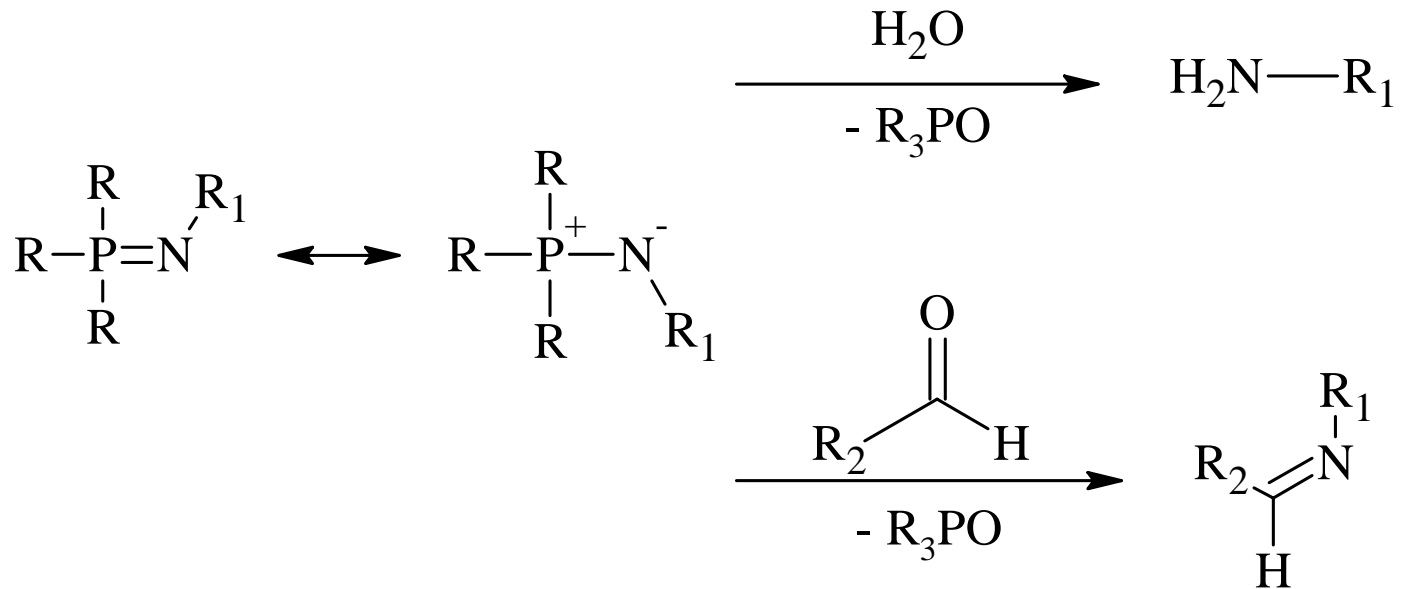


M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3168-3178

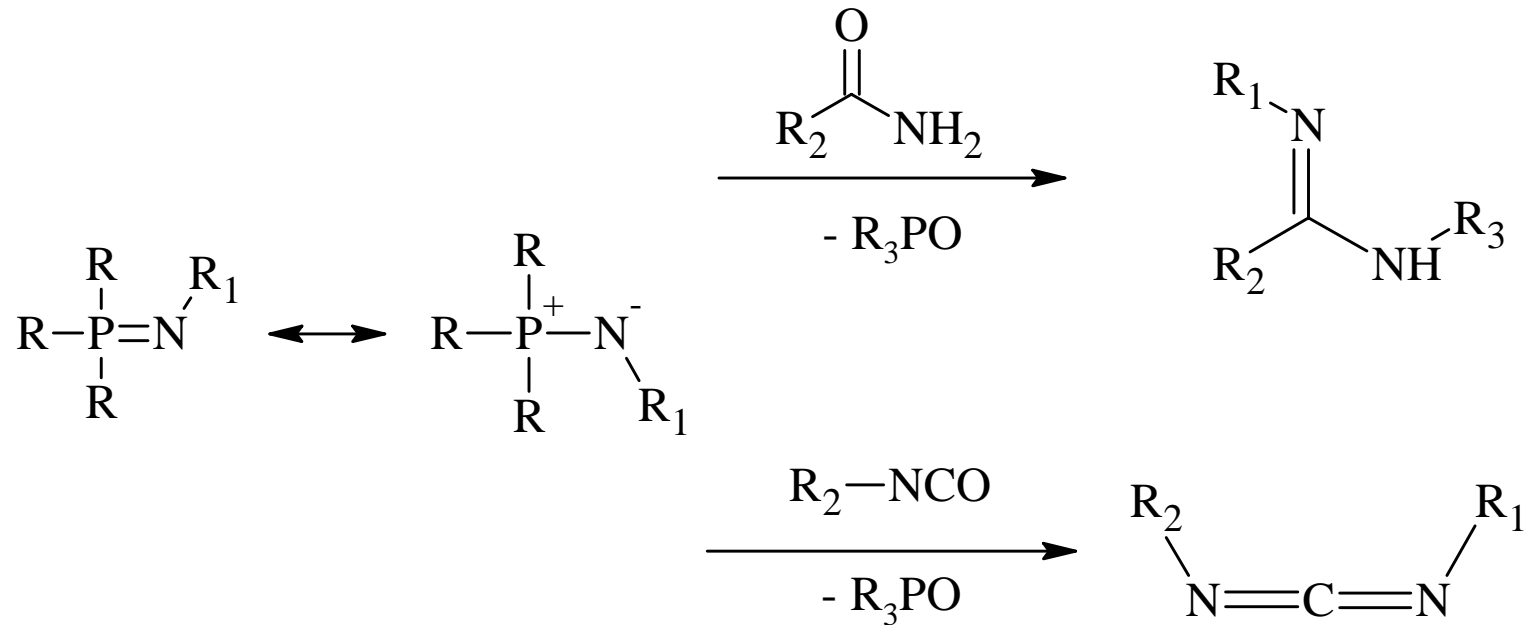
Wittig-Reaktion



Reaktionsvarianten (1)



Reaktionsvarianten (2)



Die Staudinger-Ligation

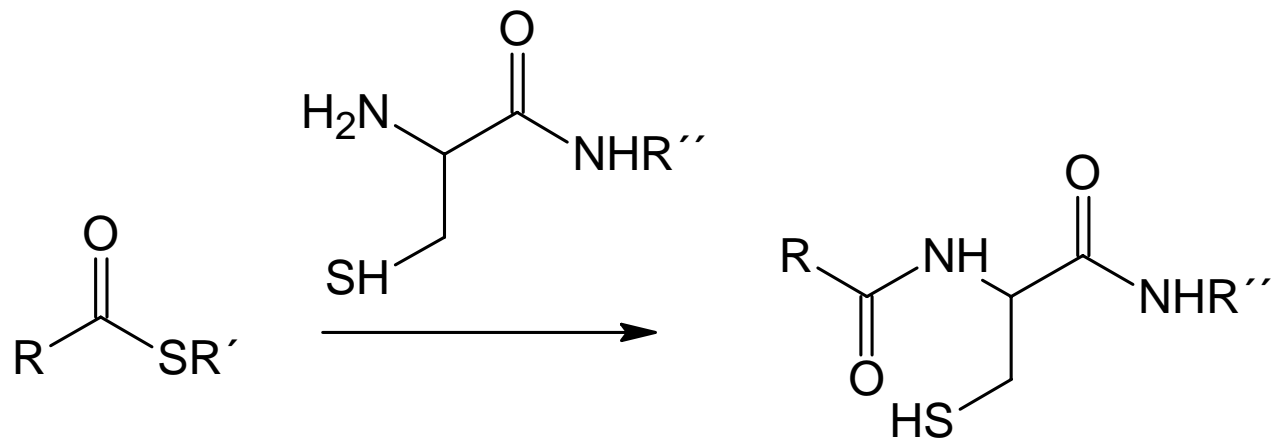
Übersicht

- Chemoselektive Ligationsmethoden
- Native chemische Ligation
- Nichtspurlose Staudinger-Ligation

Chemoselektive Ligationsreaktion

Kupplung von zwei ausschließlich miteinander reagierenden funktionellen Gruppen in wässriger Umgebung

Native chemische Ligation

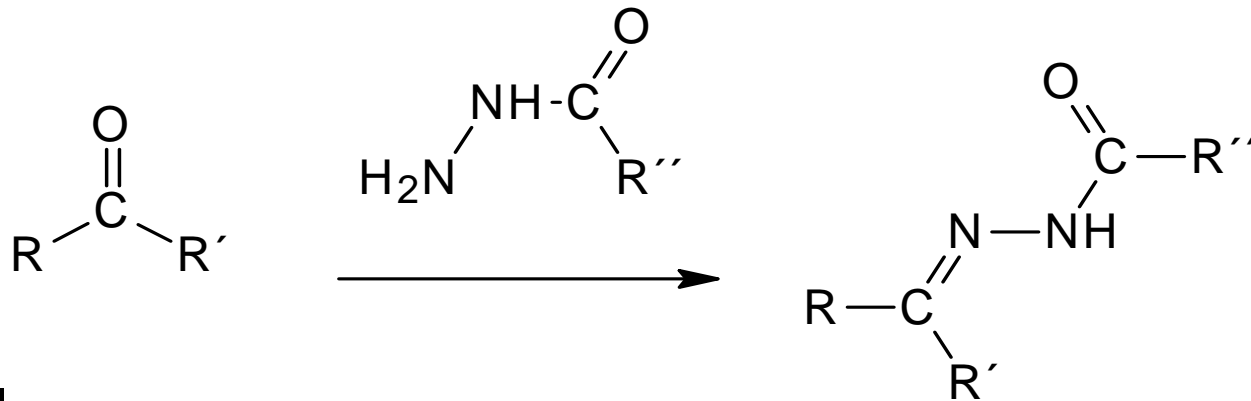


B. Nilsson, L. Kiessling, R. Raines, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939-1941

Arbeit von Bertozzi

- **Ziel:**
Verständnis der Kommunikation von Zellen untereinander und mit der sie umgebenden Matrix
- **Methode:**
Anbringen einer Sonde an einer Zelloberfläche durch chemoselektive Ligationsreaktionen

Hydrazonligation



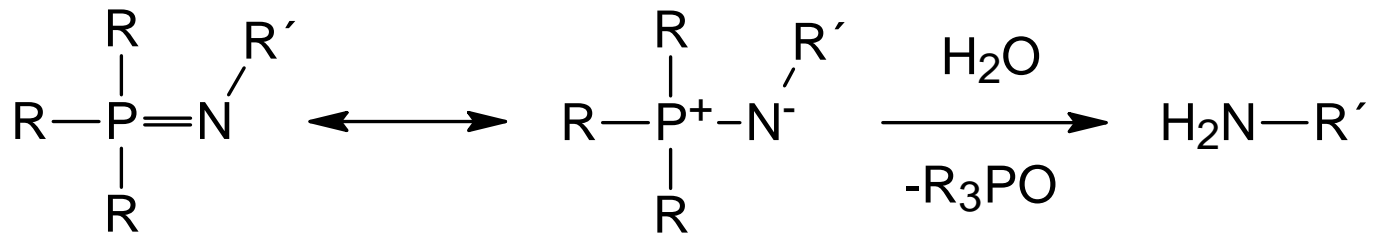
Probleme:

- Limitierung der Länge und des sterischen Anspruchs der eingeführten Substituenten
- Reaktivitätsmaximum bei zu niedrigem pH (6.5)

H. Hang, C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727-736

Staudinger-Reaktion

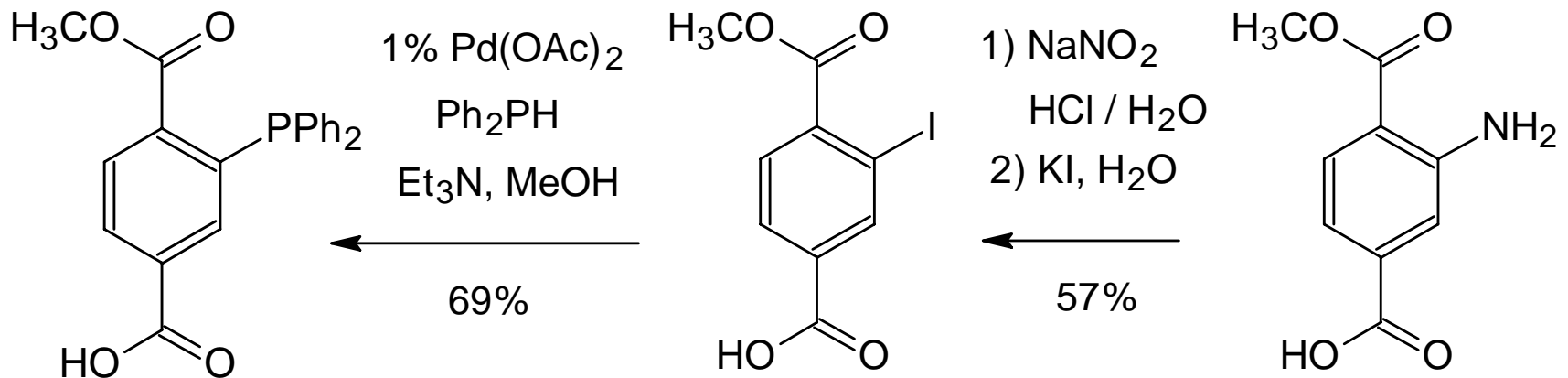
Zur Erinnerung: Hydrolyse in wässriger Lösung



M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3168-3178

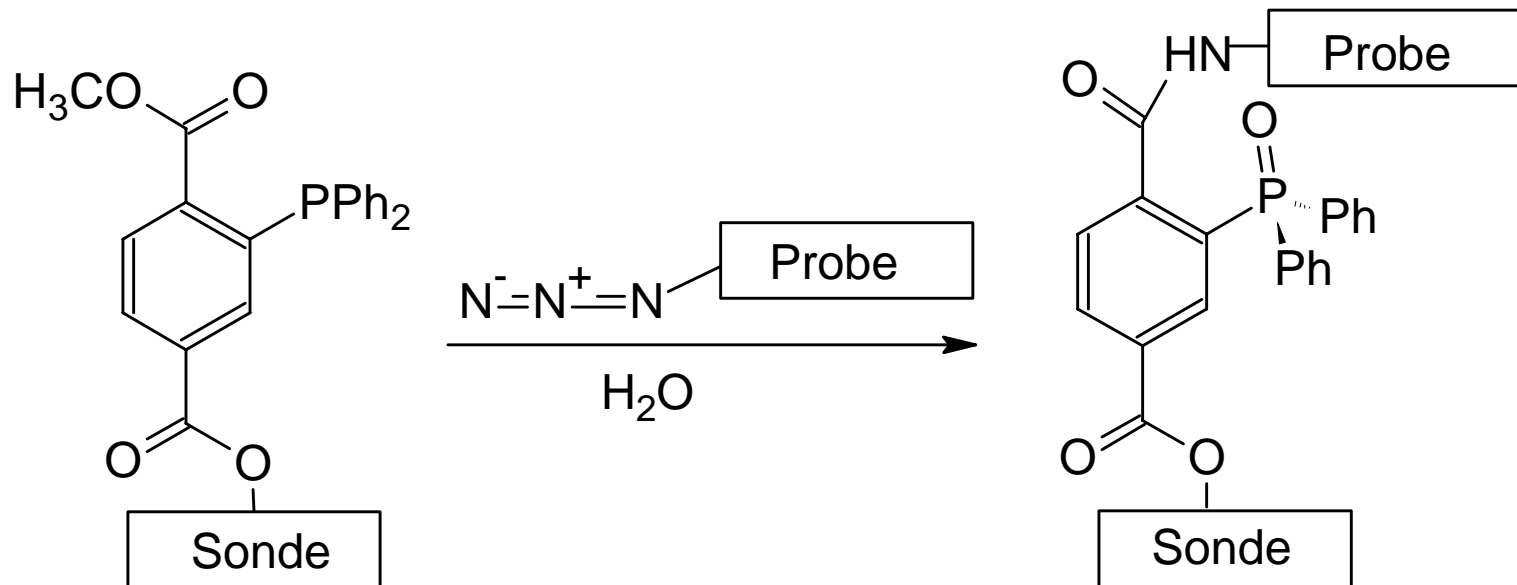
Lösung des Problems

Einführung einer elektrophilen Falle in den Liganden



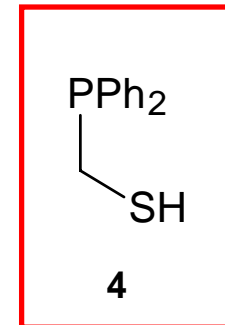
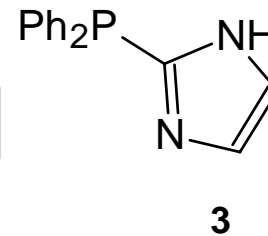
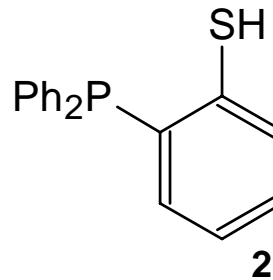
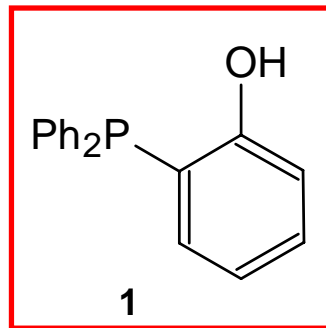
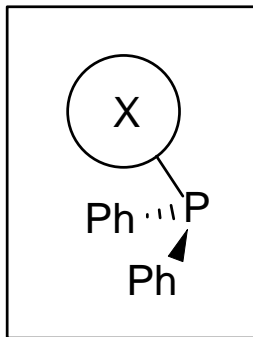
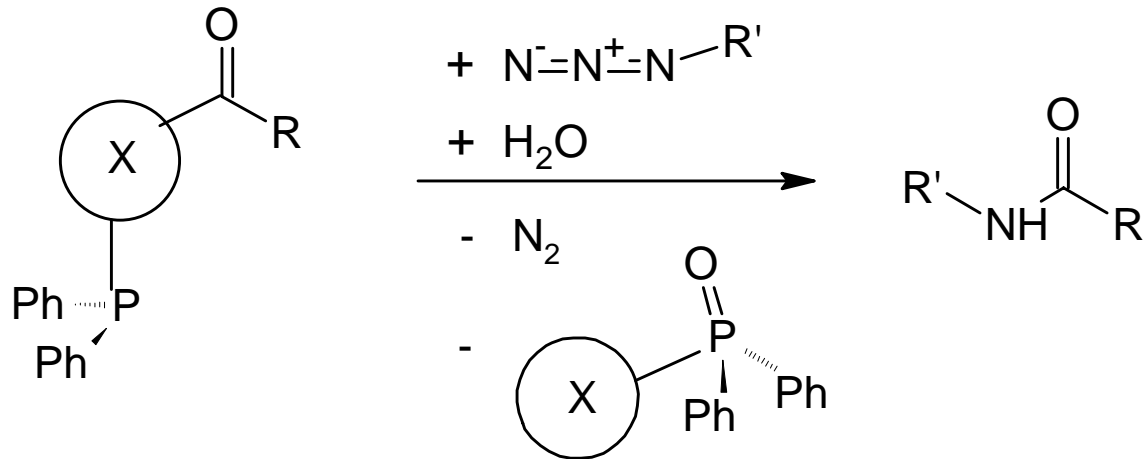
→ intramolekulare Cyclisierung

Nichtspurlose Staudinger-Ligation



M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3168-3178

Spurlose Staudinger-Ligation

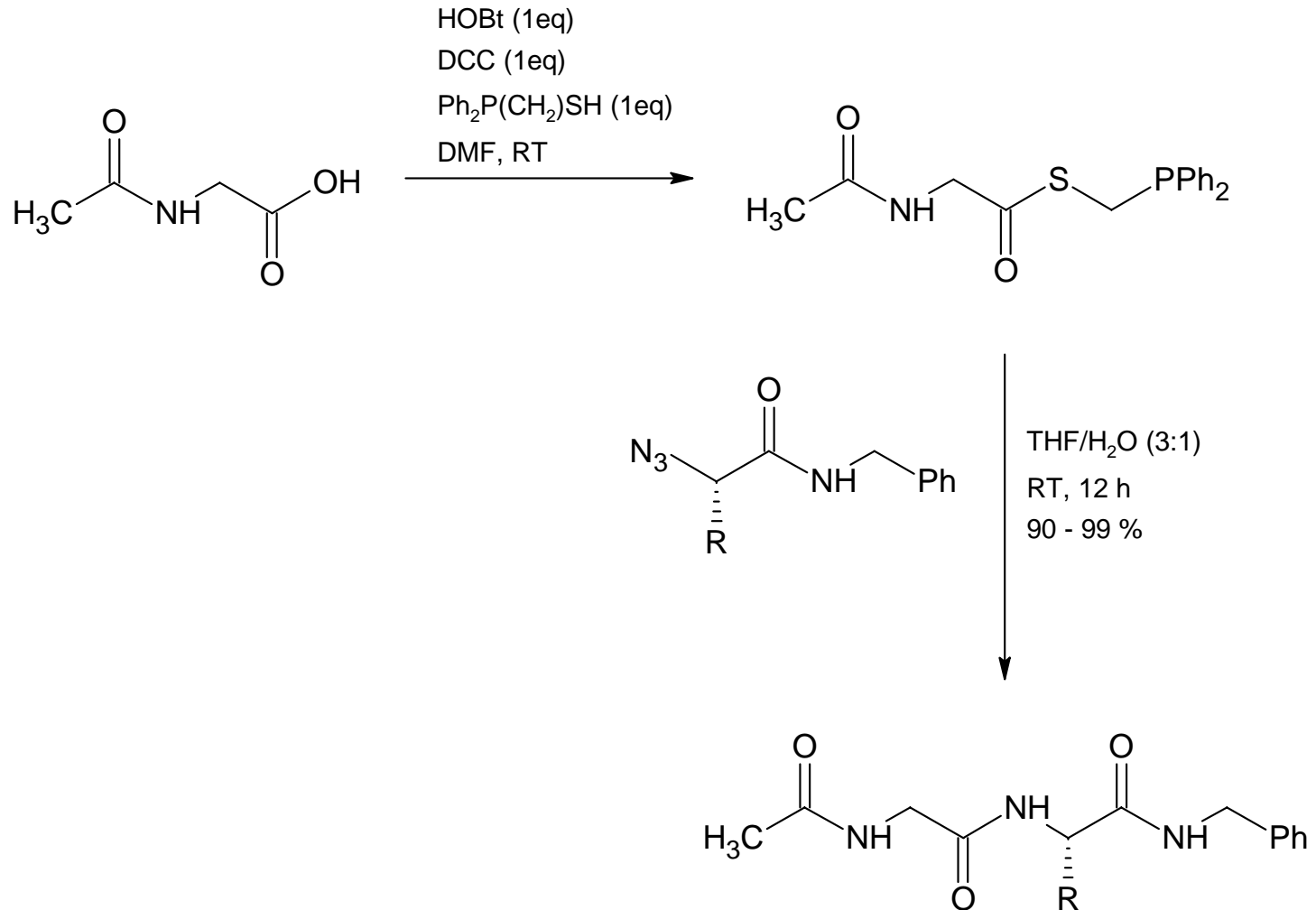


M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3168-3178

Anwendungen

1. Peptidligation

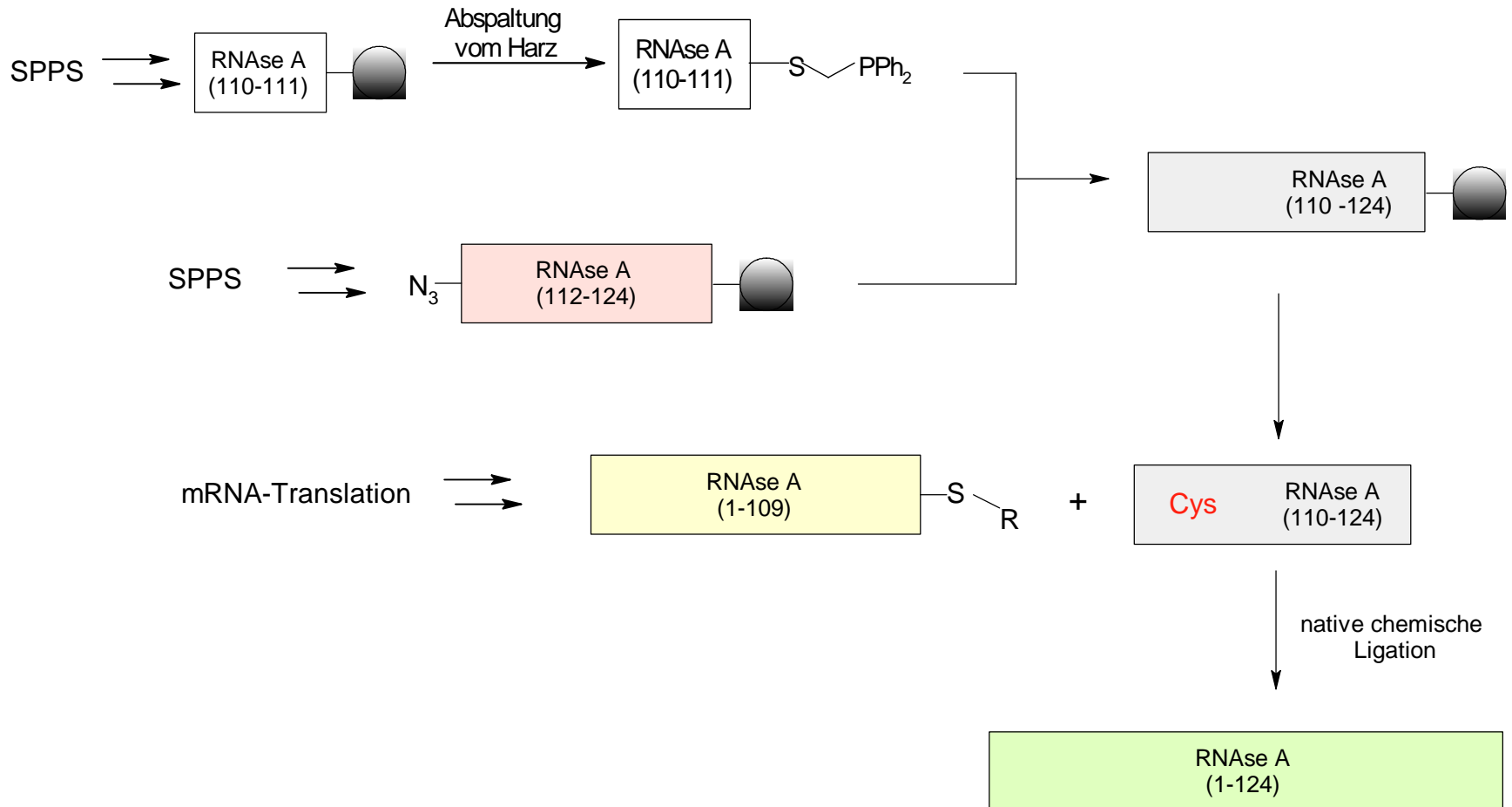
Peptidbildung



Totalsynthese von Proteinen

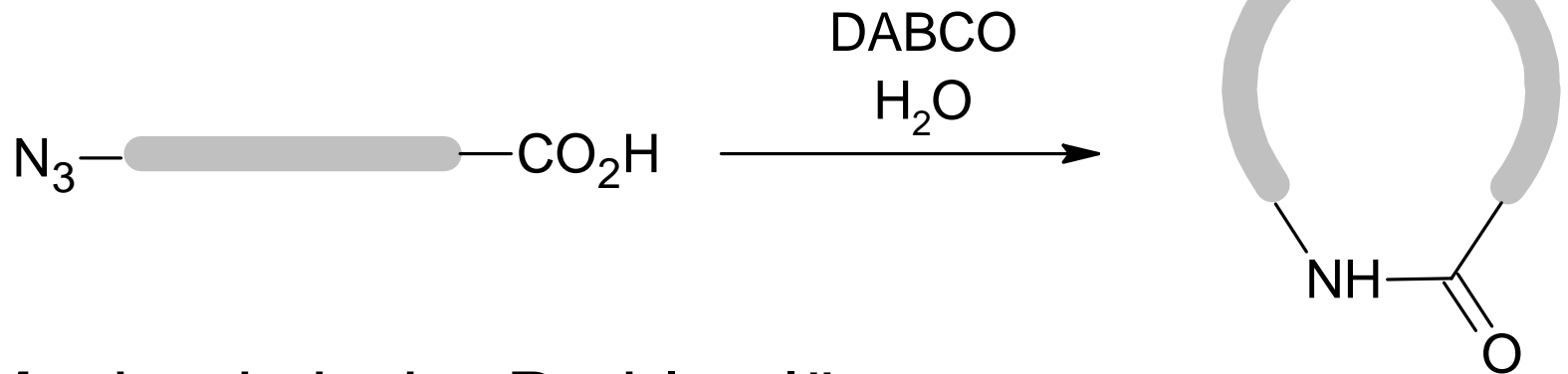
- Herstellung kürzerer Peptidfragmente durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS)
 - Kombination der Fragmente zu fertigen Proteinen mit chemoselektiven Ligationmethoden
- mildeste Möglichkeit, die keine bestimmte Funktionalität der AS-Reste erfordert:
Staudinger-Ligation

Totalsynthese des Proteins RNase A



Herstellung mittelgroßer Lactame

Synthese mittlerer Ringe: entropisch ungünstig



Mechanistische Problemlösung:

Darstellung großer Ringe mit anschließender intramolekularer Ringverkleinerung

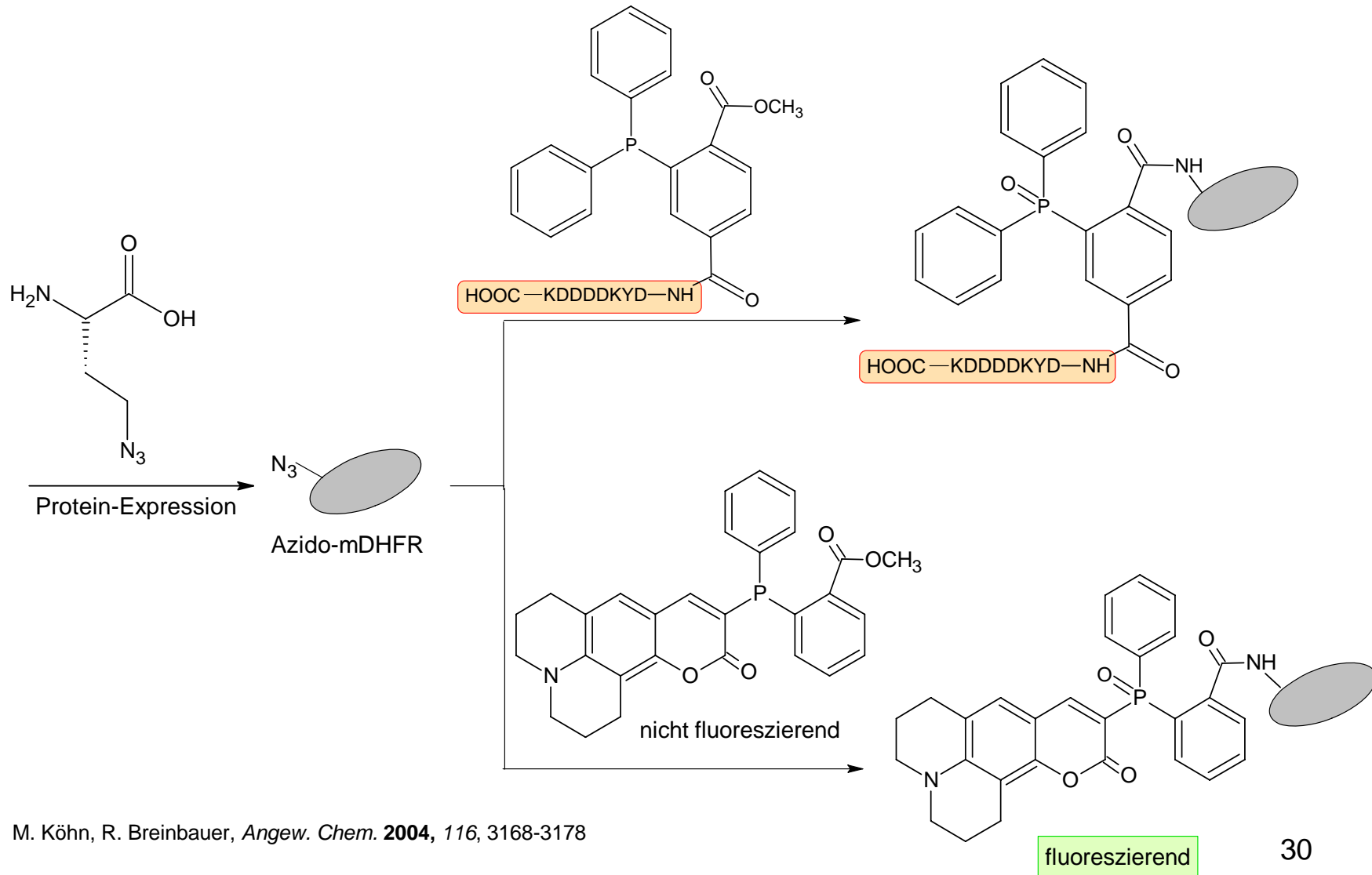
Anwendungen

Synthese von Biokonjugaten

Biokonjugate

Reportergruppen (z.B. Farbstoffe oder andere Erkennungsmotive) werden mit biologischen Proben bzw. Biopolymeren verknüpft

Markierung von Proteinen



Anwendungen

Metabolisches Zell-Engineering

Metabolisches Zellengineering

- Untersuchung an der lebenden Zelle oder einzelner Kompartimente
- Inkubation / Substratvorlage
- Metabolisierung
- Nachweis der Produkte

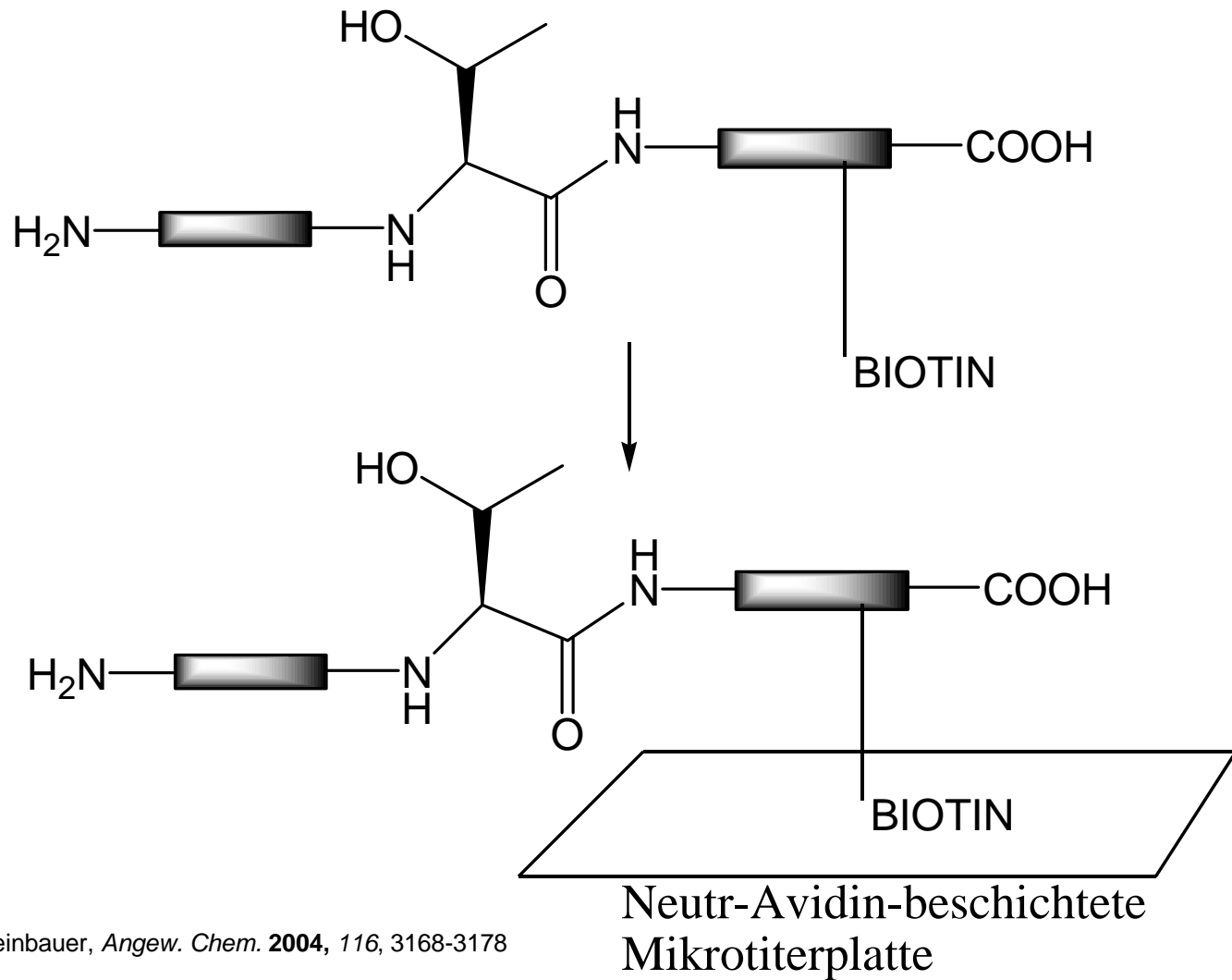
Glykosyltransferasen

- Polypeptid- Glykosyltransferasen
 - 24 Enzymisoformen
 - Substratabhängigkeit

Durchführung

- Substrat abfangen
- Proteinglykosylierung
- Anbindung des Flag-Peptids
- Nachweis mit HRP

1. Substrate abfangen

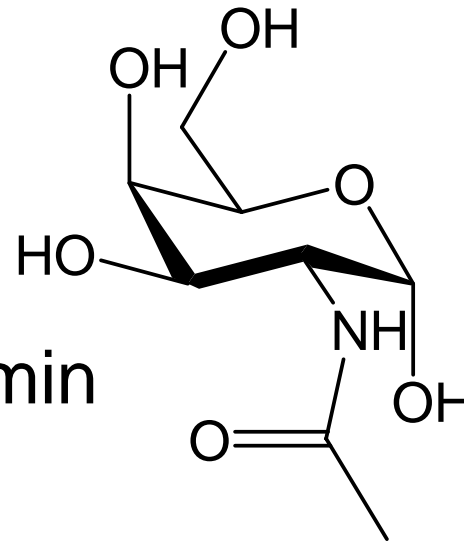


2. Proteinglykosylierung

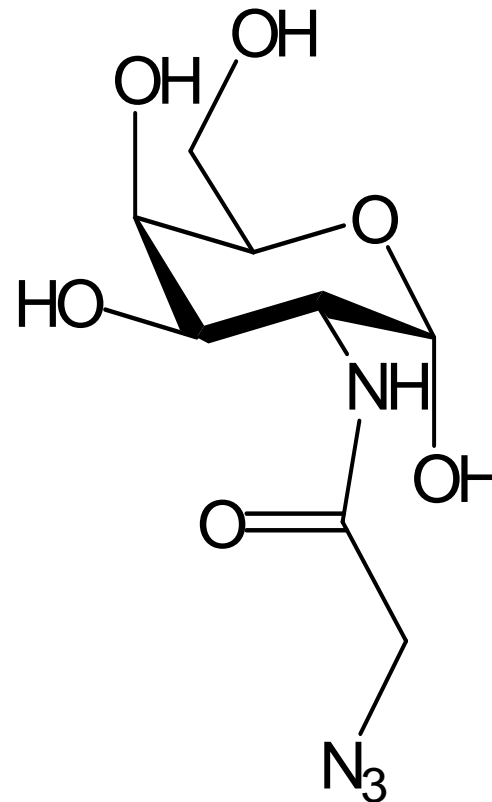
- O-Glykosylierung an Serin oder Threonin

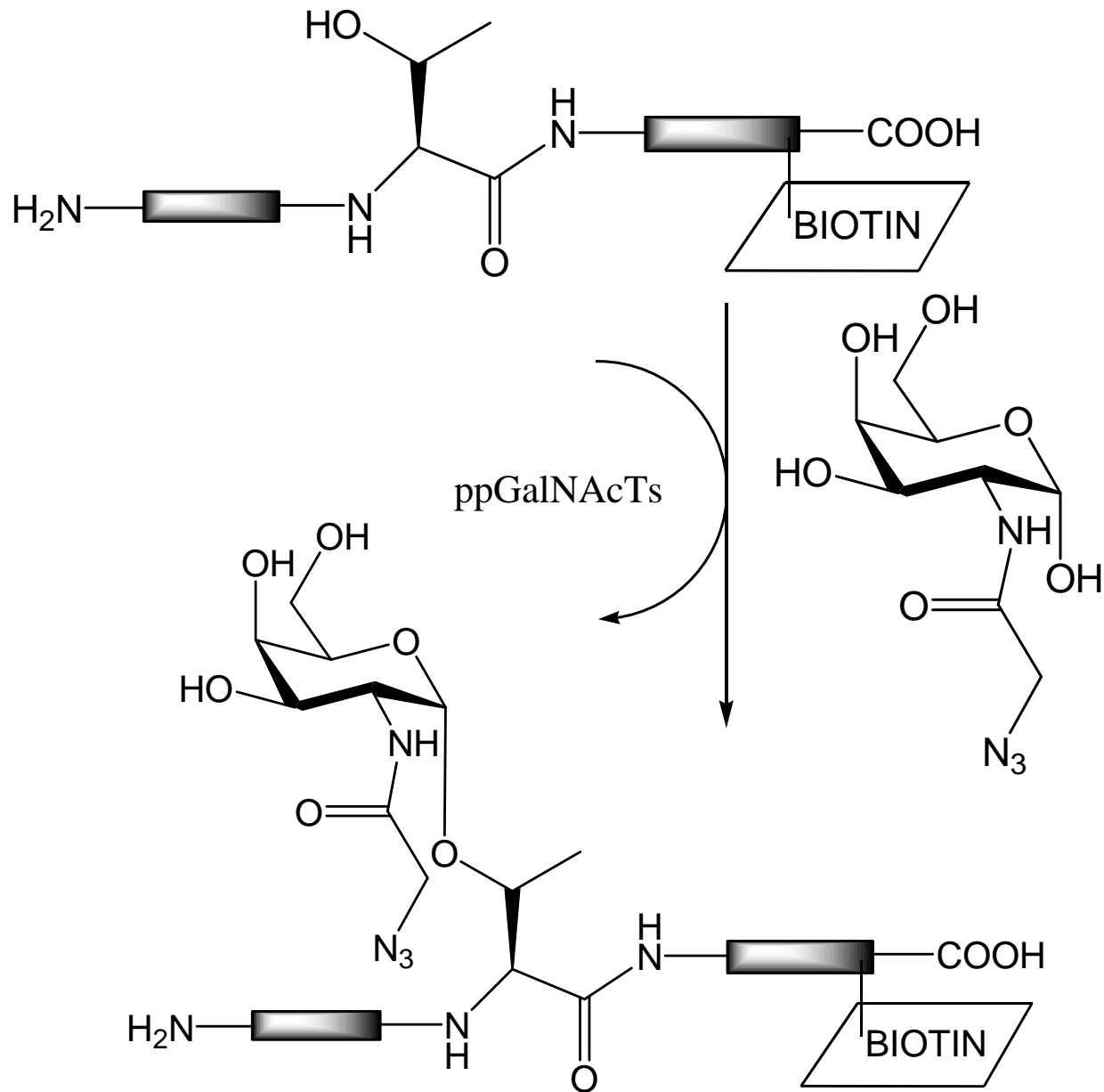
- Erster Baustein:

UDP-N-Acetylgalactosamin
(UDP-GalNAc)

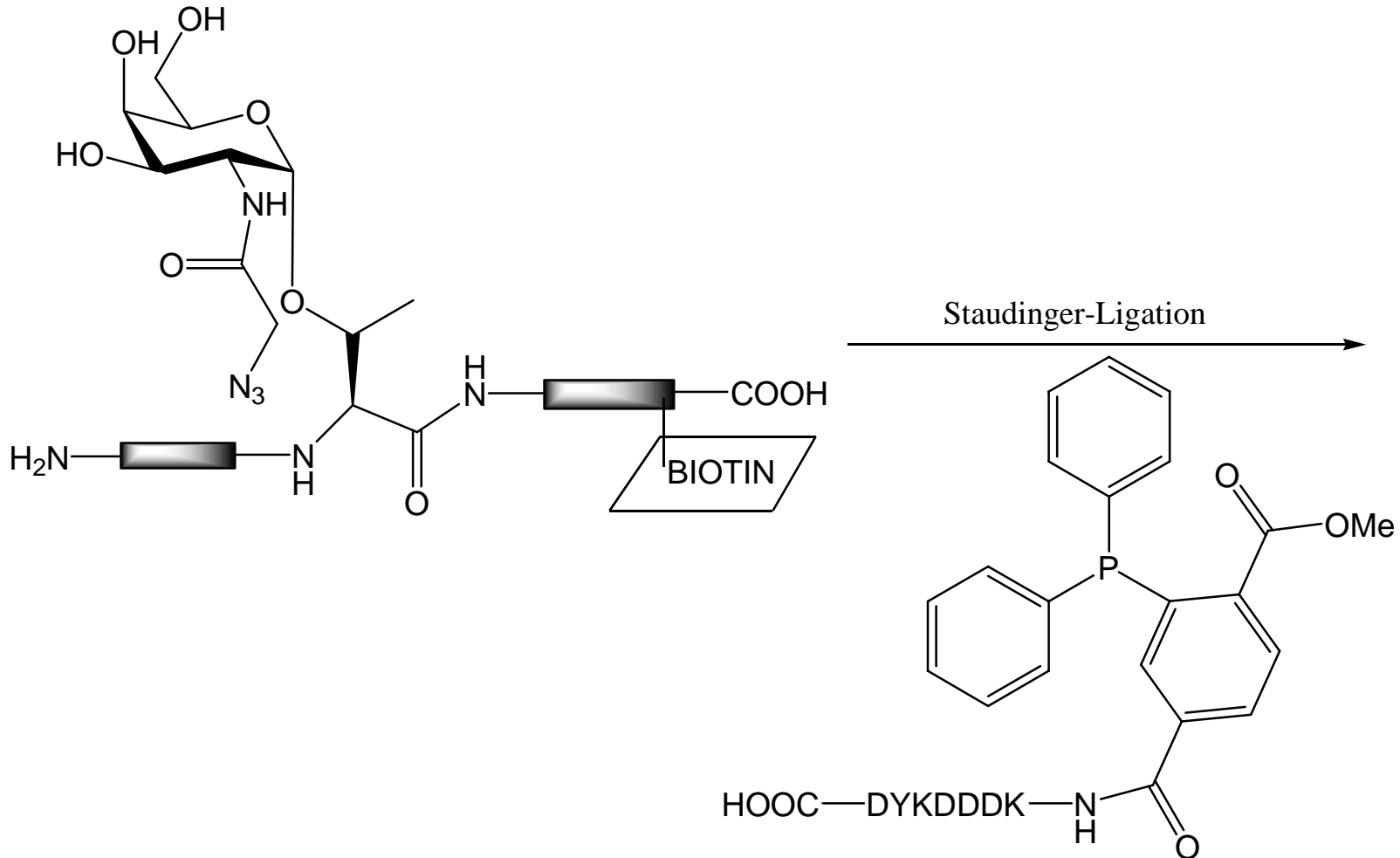


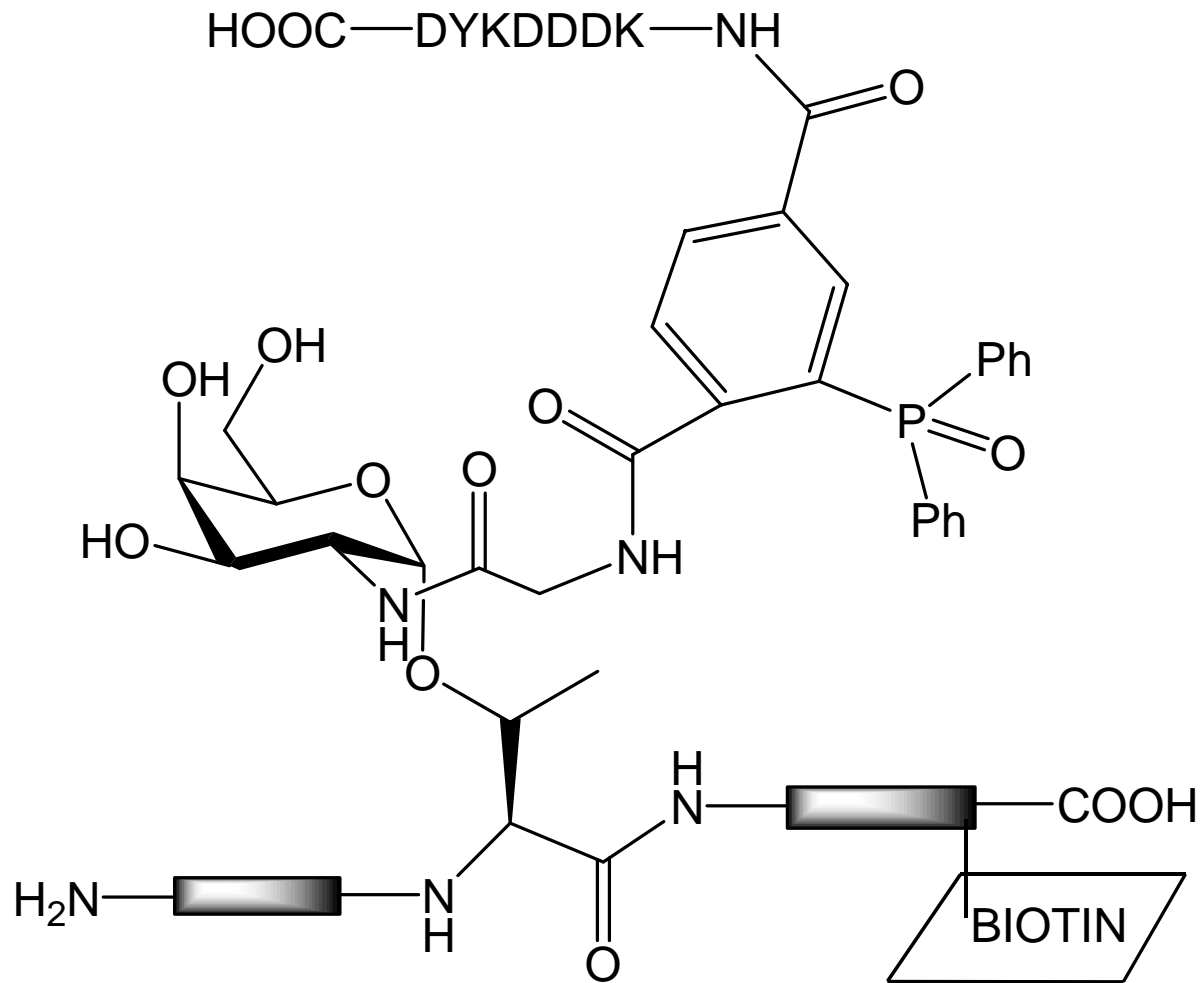
- Austausch gegen
UDP-N-Azido-
Acetylgalactosamin
(UDP-GalNAz)



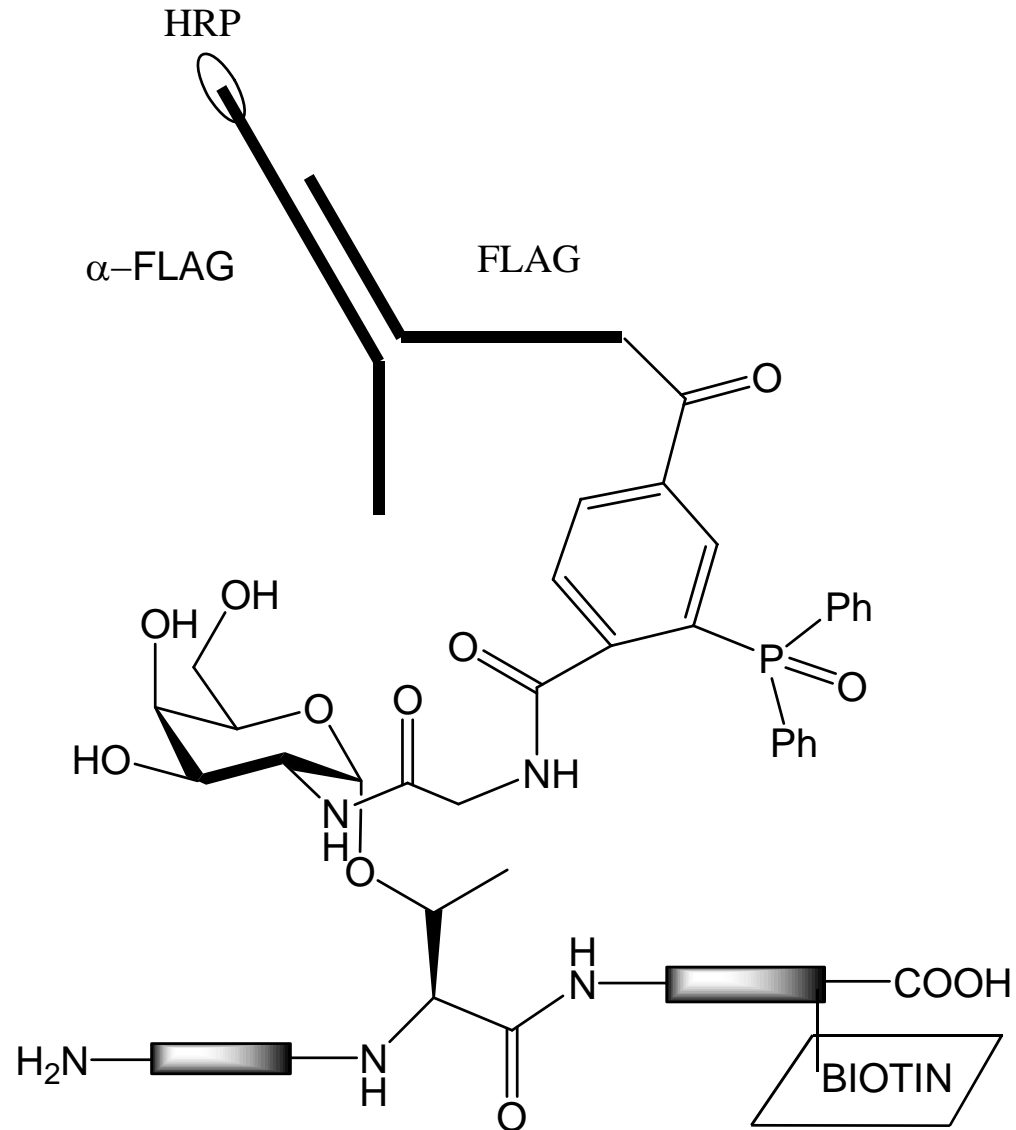


3. Anbindung des Flag-Peptids



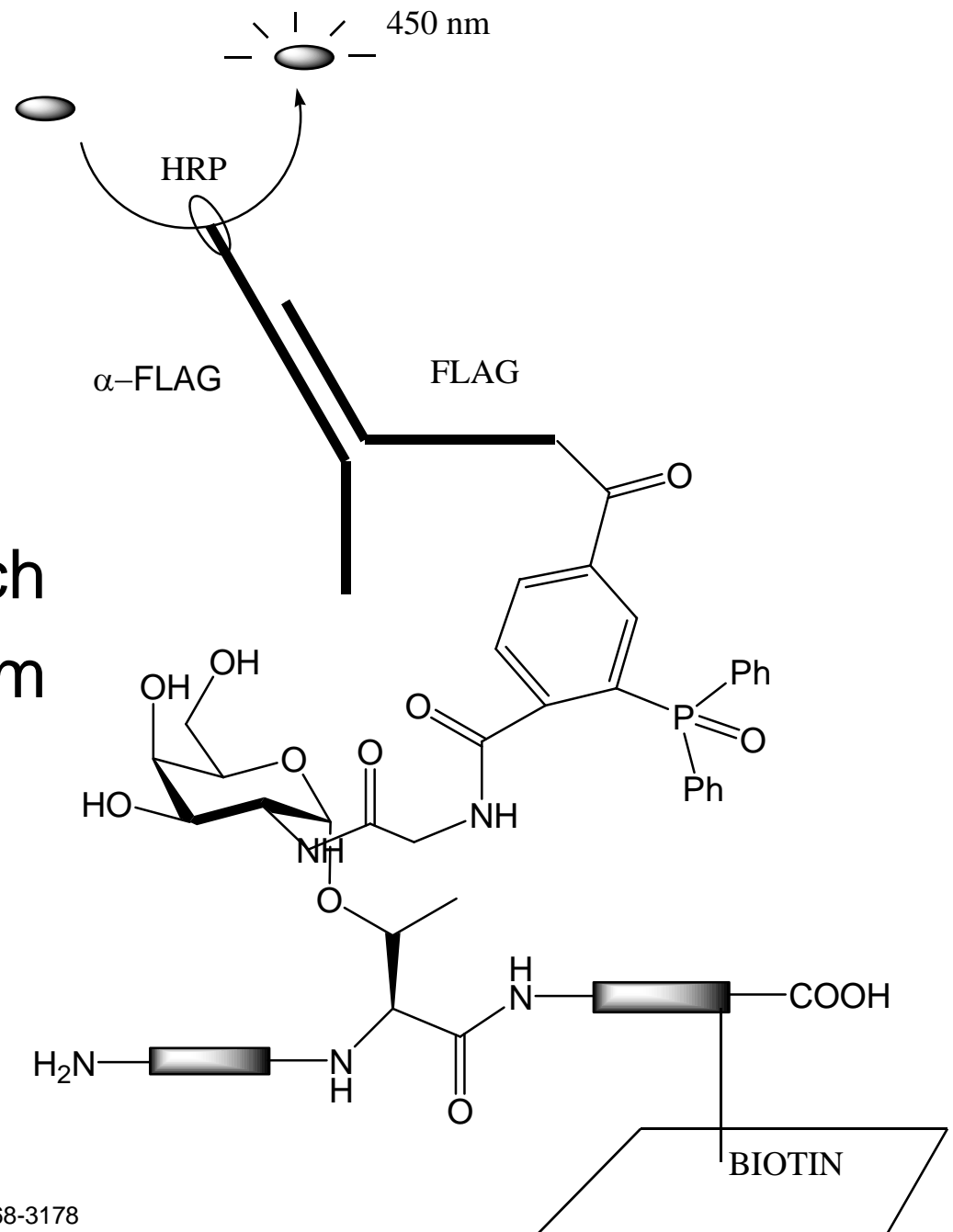


Flag-Erkennung



4. Nachweis

Quantifizierung durch
Strahlung bei 450 nm



Anwendungsmöglichkeiten

- Erkennung von Substratspezifität
 - Auch in der lebender Zelle
- Analyse von Mechanismen und Strukturen
- Indirekte Charakterisierung von Krankheiten oder Defekten

Überblick

- Staudinger Reaktion (wittiganalog, mild)
- Staudinger-Ligation (chemoselektiv, keine bestimmte Funktionalität)
- Anwendungen:
 - Peptidligation (Proteinsynthese)
 - Biokonjugate (Markierung von Biomolekülen)
 - Metabolisches Zell-Engineering (Verständnis von biologischen Abläufen in Zellen)