

## Signalamplifizierung über allosterische Katalyse

Lei Zhu und Eric V. Anslyn\*

### Stichwörter:

Allosterie · Homogene Katalyse · Immunassays ·

Sensoren · Signalamplifizierung

*In diesem Kurzaufsatz fassen wir eine Reihe neuerer Studien über Bio- und Chemosensoren im Rahmen einer einzigen Signalübertragungsstrategie zusammen: der Signalamplifizierung über allosterische Katalyse (SAAC). Die SAAC-Strategie imitiert biologische Signaltransduktionsprozesse, bei denen die molekulare Erkennung zwischen einem externen Signal und einem Proteinrezeptor allosterisch in eine katalytisch verstärkte chemische Information (normalerweise sekundäre Botenstoffe) umgewandelt wird. Dazu werden modifizierte allosterische Enzyme, Ribozyme oder regulierbare organische Katalysatoren eingesetzt. Die wesentlichen Faktoren, die zu hoher Empfindlichkeit und Spezifität in den SAAC-Strategien führen, werden analysiert. Diese frühen Studien eröffnen einen neuen Zugang zu Nachweisverfahren, in denen molekulare Erkennung und Katalyse miteinander gekoppelt werden können.*

### 1. Einleitung

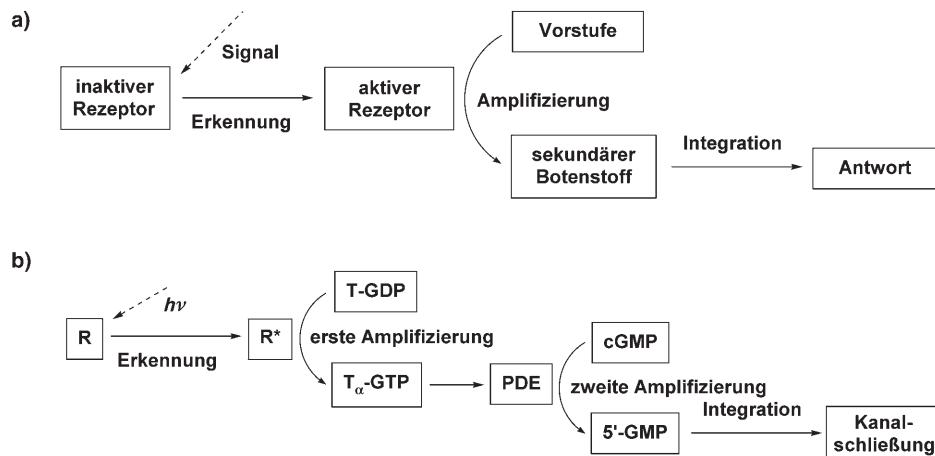
Das Gebiet der Messtechnik umfasst allgemein alle Methoden, mit denen unbekannte Informationen (Identität, Quantität, Chiralität, Reaktivität usw.) in chemischen oder biologischen Proben in messbare Signale umgewandelt werden können. Diese Signale können durch vielfältige Transduktionsverfahren erzeugt werden, wobei die unbekannte Information in optische,<sup>[1-4]</sup> elektrische,<sup>[5-7]</sup> oder mechanische<sup>[8]</sup> Anzeigewerte überführt wird. Um z. B. die Empfindlichkeit einer optischen Messung zu verbessern, nutzen herkömmliche Verfahren die Erhöhung des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) in einem colorimetrischen Assay oder die Erhöhung der Quantenausbeute ( $\phi$ ) in einem Fluoreszenzassay.<sup>[9,10]</sup>

Bei der Entwicklung hoch empfindlicher und selektiver Messverfahren kann auch die Natur die Inspiration liefern.<sup>[11]</sup> Biologische Systeme erkennen externe Signale (z. B. Photonen) oder Stimulanzien (z. B. Hormone) und reagieren auf diese über eine Folge von Signaltransduktionsprozessen, wobei das ursprüngliche Signal über wohlorganisierte kata-

lytische Reaktionen in eine amplifizierte chemische Information übertragen wird. Solche Prozesse können entweder allosterisch verlaufen, wenn die Aufnahme des externen Signals fern vom aktiven Zentrum stattfindet, oder intrasterisch, wenn die Wechselwirkung mit einem externen Signal direkt die Struktur am katalytischen Zentrum verändert.<sup>[12]</sup> Bei einer typischen biologischen Signalerkennung (Schema 1a) wird das externe Signal („first messenger“) durch seine Wechselwirkung mit spezifischen, membrangebundenen Rezeptoren erkannt. Dieses Erkennungseignis wird amplifiziert, indem eine Kaskade katalytischer Reaktionen ausgelöst wird, die wiederum eine große Zahl sekundärer Botenstoffe („second messengers“) erzeugt. Um die Integration des ursprünglichen, externen Signals abzuschließen, kommunizieren die sekundären Botenstoffe mit anderen Proteinen (oft ebenfalls über katalytische Reaktionen), wobei die amplifizierte chemische Information in (häufig elektrische) Signale überführt wird, die vom Zentralnervensystem verarbeitet werden können. Eine derartige Strategie bezeichnen wir als Signalamplifizierung über allosterische Katalyse (signal amplification via allosteric catalysis, SAAC).

Als Beispiel wollen wir die Übertragung visueller Signale beim Wirbeltier betrachten. Hier werden Photonen durch Photorezeptoren, das sind Transmembranproteine wie Rhodopsin (R), in Retinazellen aufgefangen (Schema 1b).<sup>[13]</sup> Ein Photon wird zunächst von 11-cis-Retinal, dem Cofaktor von Rhodopsin, absorbiert, wodurch 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal isomerisiert. Diese Isomerisierung verändert die Rhodopsinstruktur und führt zur allosterischen katalytischen Aktivierung des intrazellulären Proteins Transducin (T-GDP), das die erste Stufe der Signalamplifizierung abschließt. Das aktivierte Transducin ( $T_{\alpha}$ -GTP) schaltet das

[\*] L. Zhu, E. V. Anslyn  
Department of Chemistry and Biochemistry  
The University of Texas at Austin  
Austin, TX 78712 (USA)  
Fax: (+1) 512-471-7791  
E-mail: anslyn@ccwf.cc.utexas.edu

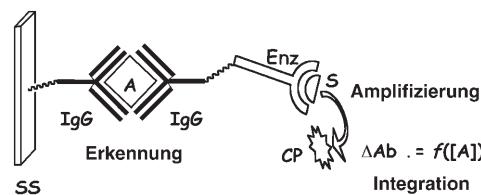


**Schema 1.** a) Allgemeiner biologischer Signaltransduktionsweg. b) Typische visuelle Signalübertragung beim Wirbeltier. R = Rhodopsin, R\* = aktivierte Rhodopsin, T = Transducin, PDE = Phosphodiesterase, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat.

Enzym Phosphodiesterase (PDE) an, indem es dessen Inhibitoruntereinheit freisetzt. PDE setzt nun den Signalamplifizierungsvorgang fort, indem es mit außergewöhnlichem Umsatz ( $4200\text{ s}^{-1}$ ) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu 5'-GMP hydrolysiert. Diese Hydrolyse bewirkt die Schließung cGMP-gesteuerter kationenspezifischer Kanäle. Wenn eine ausreichende Zahl an Kanälen geschlossen ist, wird die Membran hyperpolarisiert. Dadurch wird ein Nervensignal erzeugt, das sich durch das Nervensystem ausbreitet, bevor es schließlich durch das Gehirn aufgearbeitet und analysiert wird. Ein einziges Photon, das von einer Retinazelle absorbiert wird, kann so durch eine Kaskade katalytischer Reaktionen zu einer Membranhyperpolarisation von etwa 1 mV verstärkt werden. Dieses Aktionspotential wird von den Synapsen aufgenommen und vom Zentralnervensystem verarbeitet.

Die Signalamplifizierung durch Katalyse wurde in der Biochemie und klinischen Chemie erstmals vor drei Jahrzehnten zum Nachweis und zur Messung von Stoffen in biologischen Flüssigkeiten eingesetzt.<sup>[14]</sup> Es wurden Enzymimmunassays (EIAs) entwickelt: Ein Antigen oder Antikörper wird durch ein Enzym markiert, um eine Katalyse-getriebene Signalamplifizierung zu erzielen.<sup>[15-17]</sup> Ein bemerkenswertes Beispiel für ein klinisch erfolgreiches EIA ist der enzymge-

bundene Immunassay (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, Abbildung 1).<sup>[18]</sup>

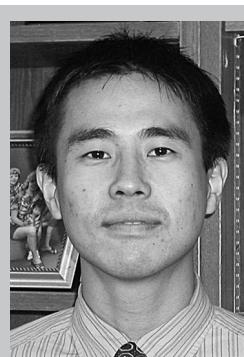


**Abbildung 1.** ELISA: schematische Darstellung. SS = fester Träger, IgG = analytikspezifischer Antikörper, A = Analyt, Enz = Enzym, S = Substrat, CP = colorimetrisches Produkt. Die Absorbanz von CP ( $\Delta\text{Abs}$ ) ist eine Funktion der Analytkonzentration ( $[A]$ ).

ELISA – obwohl selbst keine allosterische Methode – inspirierte sicher viele der hier diskutierten allosterischen Strategien. Im ELISA-Test wird der Analyt (A) zunächst durch einen analytikspezifischen Antikörper (IgG) abgefangen, der an einer festen Oberfläche immobilisiert ist. Ein zweiter, enzymgebundener Antikörper kuppelt über ein anderes Epitop an den jetzt oberflächengebundenen Analyten – oder wird von diesem rekrutiert. Schließlich wird ein chromogenes



Eric V. Anslyn promovierte 1987 in Chemie am California Institute of Technology bei R. Grubbs und ging anschließend als Postdoc an die Columbia University zu R. Breslow. 1989 wurde er Assistant Professor für Chemie an der University of Texas in Austin. 1994 wurde er zum Associate Professor und 1997 zum Full Professor berufen. Seit 1998 ist er Associate Editor beim Journal of the American Chemical Society und seit 2004 Norman Hackerman Professor of Chemistry. Seine Forschung umfasst physikalische und (bio)organische Chemie. Er untersucht synthetische Rezeptoren für die Katalyse und Sensoranwendungen.



Lei Zhu wurde 1975 in Nanjing, China, geboren. 1997 erhielt er den BSc in Chemie an der Peking University und wechselte dann an die New York University zu James Canary. Nach seiner Dissertation kam er 2003 als Postdoc in die Arbeitsgruppe von Eric Anslyn an der University of Texas in Austin. Während der letzten zwei Jahre entwickelte er Messtechniken, die auf Indikatorverdrängungsassays und auf katalytischen Signalamplifizierungsmethoden beruhen. Im August 2005 wurde er Assistant Professor im Department of Chemistry and Biochemistry an der Florida State University.

Substrat (S) des Enzyms (Enz) zugegeben, sodass die Farbe des Produkts (CP) der enzymkatalysierten Reaktion, auch als Indikatorreaktion bezeichnet,<sup>[19]</sup> mit der Menge des Analyten korreliert. Obwohl der heterogene ELISA-Test zwischen jeder Bindungsreaktion ausgiebige Waschschritte erfordert und nur Analyten mit mehreren Epitopen dafür geeignet sind, erfreut er sich wegen seiner allgemeinen Verwendbarkeit und der voneinander unabhängigen Detektions- und Signalamplifizierungsstufen (günstig für das modulare Design von Messverfahren) noch großen Zuspruchs.

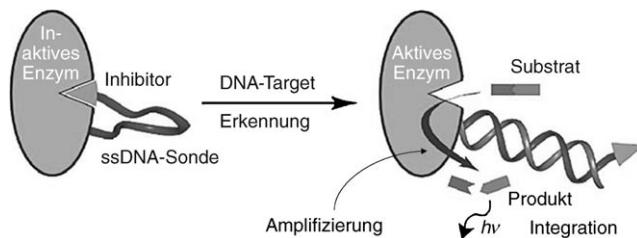
Im ELISA-Test werden Signalerkennung, Amplifizierung und Integration getrennt durch ausgiebige Waschschritte vollzogen. Das stufenweise Vorgehen hat gewisse Vorteile: Das Design ist modular, da alle Schritte unabhängig voneinander ausgeführt werden können. Der Anwendungsbereich wird jedoch durch dieses oft zeitraubende und mühsame Analyseverfahren eingeschränkt.<sup>[20]</sup> Das von einem Organismus verwendete Detektionsschema in Echtzeit ist deutlich überlegen: Es umfasst eine empfindliche, durch ein externes Signal aktivierte allosterische katalytische Reaktionskaskade und verbindet Signalerkennung, Amplifizierung und Integration zu einem homogenen, autonomen Transduktionsvorgang. Zwar entstanden schon kurz nach der Entwicklung der Enzymimmunachweistechnik auch homogene EIAs,<sup>[21]</sup> die den biologischen Signaltransduktionsprozessen mit allosterischen Eigenschaften ähnlicher sind, aber die SAAC-Strategie wurde erst seit kurzem auch außerhalb des Gebiets der Immunchemie eingesetzt. Großen Auftrieb erhielt die SAAC-Strategie durch die Erfindung der Polymerasenkettreaktion (polymerase chain reaction, PCR).<sup>[22]</sup> PCR und ihre Varianten sind heute unentbehrliche Methoden zur Amplifizierung und Detektion spezifischer DNA-Sequenzen.<sup>[23,24]</sup> Die Entwicklung von EIA-Varianten wird ebenfalls noch aktiv weiterbetrieben, wie jüngere Beispiele zeigen,<sup>[25–31]</sup> darunter die Immun-PCR-Technik, die das Leistungsvermögen von PCR und EIA in sich vereint.<sup>[32,33]</sup>

Neben den Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen sind noch andere Muster der molekularen Erkennung erforscht worden, um diese mit Katalysereaktionen zu kombinieren und auf diese Weise ultraempfindliche Nachweismethoden zu entwickeln. In den folgenden Abschnitten werden neuere bio-<sup>[34]</sup> und chemosensorische Beispiele, die der SAAC-Strategie folgen, diskutiert. Dieser Kurzaufsatzz konzentriert sich auf Strategien zur Signalamplifizierung, die auf analytaktivierten, d.h. allosterischen katalytischen Vorgängen beruhen. Viele andere kreative Sensoranwendungen, bei denen die Analyten selbst als Katalysator für die Signalamplifizierung fungieren, werden nicht besprochen.<sup>[35–38]</sup> Diese Techniken sind den herkömmlichen kinetischen Methoden der chemischen Analyse zuzuordnen.<sup>[19]</sup>

## 2. Signalamplifizierung über Biokatalyse

2003 berichtete Ghadiris Arbeitsgruppe, dass eine intrastatisch regulierte Protease<sup>[39]</sup> zu einem Signalamplifizierungsmodul für die sequenzspezifische DNA-Detektion modifiziert wurde.<sup>[40]</sup> Eine Zink-Metalloprotease – neutrale Protease von *B. cereus* (CNP) – wurde als Basis für den

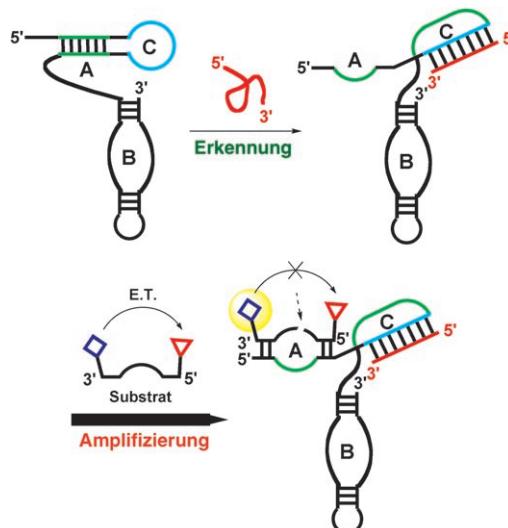
katalytischen Signalamplifizierungsschritt gewählt. Dieses Enzym kann durch einen Phosphoramidat-basierten Inhibitor, der ein Analogon des Übergangszustands darstellt, wirksam inaktiviert werden.<sup>[41]</sup> Die Allosterie wurde in dieses Enzym eingeführt, indem ein Konjugat aus einer Einzelstrang-DNA(ssDNA)-Sonde und einem Phosphoramidat-inhibitor mit einer CNP-Mutante verknüpft wurde (Schema 2). Diese CNP-Mutante enthielt anstelle des Glu151-Rests, der in der nativen Struktur auf der Oberfläche exprimiert ist, einen Cysteinrest als kovalenten Bindungsanker.



**Schema 2.** Detektionsschema für sequenzspezifische DNA-Moleküle mit einer modifizierten allosterischen Protease als katalysierendes Signalamplifizierungsmodul. Bearbeitet nach Lit. [40].

War keine komplementäre DNA-Sequenz (das Target) vorhanden, dann konnte die Inhibitoreinheit infolge der Flexibilität der ssDNA-Sonde das aktive Zentrum der CNP-Mutante erreichen,<sup>[42]</sup> wodurch war das Enzym inaktiviert wurde (Schema 2). War ein DNA-Target vorhanden und wurde es durch Anlagerung an die komplementäre ssDNA-Sonde erkannt, dann verursachte die Bildung einer starren Doplexstruktur die Ablösung der Phosphoramidat-Inhibitor-einheit vom aktiven Zentrum. Das Enzym wurde damit „angeschaltet“ und konnte ein fluorogenes Peptidsubstrat<sup>[43]</sup> in ein fluoreszierendes Produkt überführen. In diesem Stadium war die Detektion eines DNA-Analyten mittels Katalyse durch ein allosterisches, durch den Analyten aktivierte Enzym in eine amplifizierte chemische Information übertragen worden. Als Folge konnten 100 pm DNA-Targets innerhalb von drei Minuten nachgewiesen werden. Die Spezifität dieses Assays wurde dabei durch die Komplementarität von Target- und Sondensequenz bestimmt.

Neben den allosterischen Enzymen sind allosterische Ribozyme („Aptazyme“)<sup>[44–46]</sup> Beispiele für SAAC-Strategien in der Biosensorik. So wurde ein induzierbares Haarnadel-ribozym (iHP-let7), das als allosterisches Enzym ein spezifisches RNA-Substrat spaltet, für den Nachweis des microRNA(miRNA)-Strangs let-7 von *Drosophila melanogaster* entworfen.<sup>[47]</sup> In Abwesenheit des miRNA-Analyten wurde die Substraterkennungsdomäne (A) des Ribozyms durch Bildung einer Stammschleifenstruktur mit der allosterischen C-Domäne physikalisch blockiert (Schema 3). Die Sequenz der Schleife in der C-Domäne war als Sonde für die miRNA-Zielsequenz entworfen. Durch komplementäre Paarung der miRNA mit der Schleifensequenz (Domäne C) wurde die Stammstruktur aufgebrochen. Dadurch war die A-Domäne zugänglich, sodass die fluorogenen Substrate angelagert und gespalten werden konnten. Da das Substrat an seinem 3'- und 5'-Ende mit einem Fluorophor bzw. einem Löscher modifi-

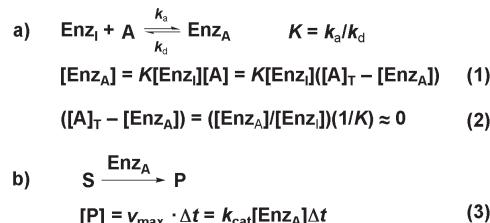


**Schema 3.** Reaktion des Haarnadelribozyms iHP-let7 als Antwort auf miRNA let-7 (roter Strang). Blaues Quadrat: Fluorophor; rotes Dreieck: Löscher; E.T.: Energietransfer. Bearbeitet nach Lit. [47].

ziert war, lieferte die Spaltung fluoreszierende Produkte, weil dabei der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET)<sup>[48]</sup> innerhalb der intakten Substrate unterbrochen wurde. Es wurde ein Fluoreszenzsignal erzeugt, dessen Intensität mit der Konzentration der miRNA-Targets korrelierte. Diese Methode zeigte wegen ihrer Leistungsfähigkeit bei der katalytischen Signalamplifizierung eine höhere Nachweisempfindlichkeit für spezifische miRNA-Sequenzen als die herkömmlichen Techniken mit solchen fluorogenen Substraten („molecular beacons“).<sup>[49,50]</sup>

### 3. Der Amplifizierungsfaktor

Beim Entwurf einer SAAC-Strategie müssen mehrere kinetische und thermodynamische Aspekte berücksichtigt werden. In erster Linie sollte die Geschwindigkeit der Indikatorreaktion vernachlässigbar sein, wenn das Enzym oder der Katalysator in Abwesenheit des Analyten inaktiviert ist. Ist dies sichergestellt, besteht die weitere SAAC-Strategie aus zwei chemischen Stufen: erstens aus der Bildung eines aktivierte Katalysators ( $\text{Enz}_A$ ), die von einem Analyten (A) durch ein kompetitives Gleichgewicht ausgelöst wird (Schema 4a); zweitens aus der katalytischen Indikatorreaktion, die ein amplifiziertes, messbares Signal erzeugt ( $[P]$ , Schema 4b). Die Katalysatorgesamtkonzentration ( $[\text{Enz}]_T$ ) sollte bedeutend größer sein als die wahrscheinliche maximale Analytkonzentration ( $[A]_T$ ), sodass keine Enzymsättigung erreicht wird. Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung zwischen den inaktiven ( $\text{Enz}_I$ ) und den aktiven Katalysatoren ( $\text{Enz}_A$ ) sollte sehr viel höher sein als die Geschwindigkeit der Indikatorreaktion ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ,  $K_M$  = Michaelis-Konstante), sodass das amplifizierte übertragene Signal ( $[P]$ ) zuverlässig mit der Analytkonzentration ( $[A]_T = f([P])$ ) korreliert werden kann. Anders ausgedrückt: Der katalytische Schritt sollte geschwindigkeitsbestimmend sein. Im Idealfall sollte das



**Schema 4.** Zwei chemische Schritte der katalytischen Amplifizierungsstrategie.  $\text{Enz}_I$ : inaktives Enzym; A: Analyt;  $\text{Enz}_A$ : aktivierte Enzym.  $[\text{Enz}] + [\text{Enz}_I] = [\text{Enz}]_T$  (Enzymgesamtkonzentration);  $K (k_a/k_d)$ : Gleichgewichtskonstante;  $[A]_T$ : Analytgesamtkonzentration; S: Substrat; P: Produkt;  $v_{\text{max}}$ : Maximalgeschwindigkeit;  $\Delta t$ : Reaktionsdauer;  $k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl.

Gleichgewicht (Schema 4a) die Bildung von  $\text{Enz}_A$  ( $k_a \gg k_d$ ) stark begünstigen. In solch einem Fall wird der Wert von  $1/K$  niedrig sein. Weil  $[\text{Enz}_A]$  und  $[\text{Enz}_I]$  aufgrund ihres Designs ähnlich groß sind, wird die Konzentration an gebildetem  $\text{Enz}_A$  ( $[\text{Enz}_A]$ ) sehr dicht bei der Analytkonzentration ( $[A]_T$ , Schema 4, Gl. (2)) liegen. Daher wird ein Analytmolekül über ein schnelles Gleichgewicht in ein Molekül des aktivierte Katalysators überführt (Schema 4a). Derartige Überlegungen waren auch Teil der beiden bisher vorgestellten Biosensorbeispiele, und sie wiederholen sich bei den Assays, die auf Signalamplifizierung über supramolekulare und metallorganische Katalyse beruhen (siehe Abschnitt 4).

Im katalytischen Schritt (Schema 4b) ist das amplifizierte Signal  $[P]$  proportional zur Konzentration des aktivierte Katalysators ( $[\text{Enz}_A]$ ), wenn die Reaktion einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt [Schema 4, Gl. (3)]. Ist  $[\text{Enz}_A] \approx [A]_T$ , wie im Idealfall, dann ist  $[P]$  proportional zu  $[A]_T$  mit einem Amplifizierungsfaktor von  $k_{\text{cat}}\Delta t$  – dem Produkt aus Wechselzahl und Reaktionszeit ( $[P] \approx k_{\text{cat}}\Delta t[A]_T$ ).

### 4. Signalamplifizierung über supramolekulare und metallorganische Katalyse

Die Entwicklung biosensorischer Messmethoden auf der Basis von SAAC-Strategien ist sehr schnell vorangegangen. In den meisten Fällen sind jedoch allosterische Enzyme oder Ribozyme beteiligt, die auf bestimmte Analyten zugeschnitten sind. Diese Bioassays sind auf den Nachweis nucleotidhaltiger Moleküle wie DNA,<sup>[40,51–59]</sup> RNA<sup>[47]</sup> oder ATP beschränkt.<sup>[60]</sup> Im Unterschied zu Enzymreaktionen sind supramolekulare<sup>[61,62]</sup> und metallorganische Katalysen<sup>[63]</sup> ein noch unerschlossenes Gebiet voller Möglichkeiten für die Entwicklung von Sensoranwendungen mit katalytischer Amplifizierung.

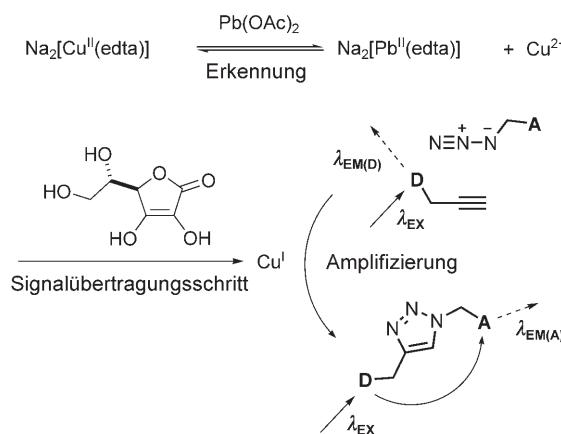
Eine große Zahl synthetischer Rezeptoren und Liganden wurde bereits verwendet, um vielfältige katalytische Reaktionen zu modulieren. Diese Diversität liefert reichliche Möglichkeiten zur Bildung „allosterischer“ supramolekulare und metallorganische katalytische Systeme,<sup>[64]</sup> die in gleicher Weise wie allosterische Biokatalysatoren für Sensorzwecke eingesetzt werden können. Nachfolgend werden mehrere Beispiele beschrieben.

Die erste metallorganische Katalyse, die im Zusammenhang mit SAAC beschrieben wurde, ist die Cu<sup>1</sup>-katalysierte Huisgen-Cycloaddition eines Kohlenstoffazids mit einem terminalen Alkin.<sup>[65,66]</sup> In einem gängigen Verfahren wird die katalytisch aktive Cu<sup>1</sup>-Spezies *in situ* durch Reduktion von Cu<sup>II</sup>-Sulfat mit Natriumascorbat erzeugt.<sup>[66]</sup> Folglich bietet diese In-situ-Methode zwei Bestandteile – das Cu<sup>2+</sup>-Ion und Natriumascorbat –, aus denen sich allosterische Systeme aufbauen lassen. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe<sup>[67]</sup> wurde ein Äquivalent EDTA in das katalytische System eingeführt, um dort an Cu<sup>2+</sup> zu koordinieren und dessen Reduktion zum katalytisch aktiven Cu<sup>1</sup> zu verhindern.<sup>[68,69]</sup> Ausgehend von diesem inaktiven Katalysator (Schema 5) verschob anschließend die Zugabe von Metallionenanalyten wie Pb<sup>2+</sup> das Gleichgewicht von [Cu<sup>II</sup>(edta)]<sup>2-</sup> so, dass eine

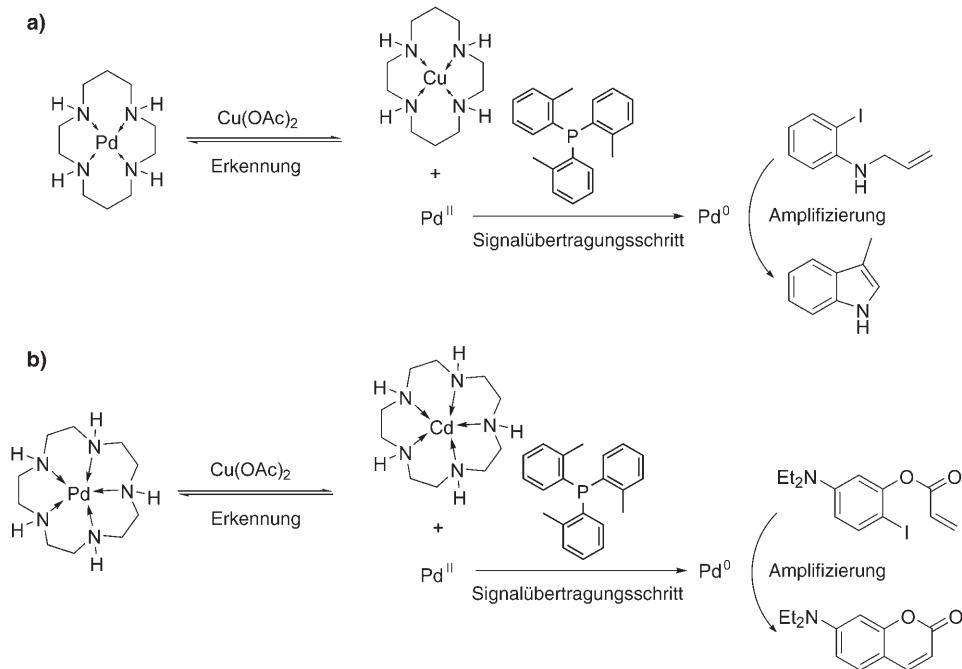
bestimmte Menge an Cu<sup>2+</sup>-Ionen freigesetzt und dann durch Ascorbat zum aktiven Katalysator im Cu<sup>1</sup>-Zustand reduziert wurde. Dieser Schritt entspricht dem Erkennungsschritt bei einer biologischen Signalübertragung, wo die Wechselwirkung zwischen „first messenger“ (dem externen Signal) und ruhendem Transmembranprotein proportional in aktives Enzym übertragen wird (siehe Schema 1 a).

Die Cu<sup>1</sup>-Spezies katalysierte schließlich die Huisgen-Cycloaddition des Kohlenstoffazids mit dem Alkin, die mit Fluorophoren (in dieser Studie Anthracen und Cumarin) funktionalisiert waren, um ein Produkt mit effizientem FRET zu erhalten. In diesem Schritt wurde das ursprüngliche Signal (das Pb<sup>2+</sup>-Ion in einer bestimmten Konzentration) katalytisch verstärkt in eine andere chemische Spezies (das FRET-Produkt, das einem „second messenger“ entspricht) umgewandelt. Die Menge des FRET-Produkts wurde über die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet und kann mit der Pb<sup>2+</sup>-Analytkonzentration korreliert werden. Diese Untersuchung zeigte, dass ein Analyt durch eine metallorganische Katalysereaktion prinzipiell zu einer größeren Zahl sekundärer, mit optischen Methoden nachweisbarer Moleküle vervielfacht werden kann.

Als weitere Bestätigung für die Eignung metallorganischer SAAC-Prozesse wollten wir ein empfindliches und spezifisches Nachweisverfahren für Cu<sup>2+</sup>-Ionen entwickeln.<sup>[70]</sup> Die Heck-Reaktion zum fluoreszierenden 3-Methylindol wurde durch Zugabe eines Äquivalents eines Cyclamliganden unterbunden (Schema 6 a). Durch Zugabe einer Cu<sup>2+</sup>-Probe zu diesem desaktivierten Katalysatorsystem wurde die Signalübertragung ausgelöst: Das Cu<sup>2+</sup>-Ion wurde vom Cyclamliganden koordiniert, wodurch proportional Pd<sup>II</sup> freigesetzt wurde. In der Praxis wurde der Cu<sup>2+</sup>-Analyt zunächst mit dem desaktivierenden Liganden gemischt; anschließend wurde ein Äquivalent Pd<sup>II</sup> zugegeben, um den verbleibenden



Schema 5. Eine durch Übergangsmetallionen vermittelte „allostatische“ Huisgen-Cycloaddition. D: Energiedonor; A: Energieacceptor; EX: Anregung; EM: Emission.



Schema 6. a) Nachweis von Cu<sup>2+</sup>-Ionen über eine Heck-Reaktion; b) Nachweis von Cd<sup>2+</sup>-Ionen.

Liganden aufzunehmen. Das überschüssige  $\text{Pd}^{\text{II}}$  wurde rasch in situ zu  $\text{Pd}^0$  reduziert, das die Heck-Reaktion anschaltete und als Produkt katalytisch das fluoreszierende 3-Methylindol lieferte. Das für dieses Produkt charakteristische Fluoreszenzsignal wurde zeitabhängig bestimmt, um die Menge des  $\text{Cu}^{2+}$ -Analyten zu erhalten. Mit dieser Methode können  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in einer Konzentration von 30 nm nachgewiesen werden. Im Unterschied zu anderen Beispielen steht die katalytische Amplifizierung von 3-Methylindol in einem linearen Verhältnis zur Analytkonzentration, was sich in einem linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration widerspiegelt. Daher ist der Umsatz von 3-Methylindol pro  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion unabhängig von der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration. Die Selektivität für das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion wurde durch die Wahl des desaktivierenden Cyclamliganden festgelegt, der eine höhere Affinität zu  $\text{Cu}^{2+}$  als zu anderen Metallionen aufweist.

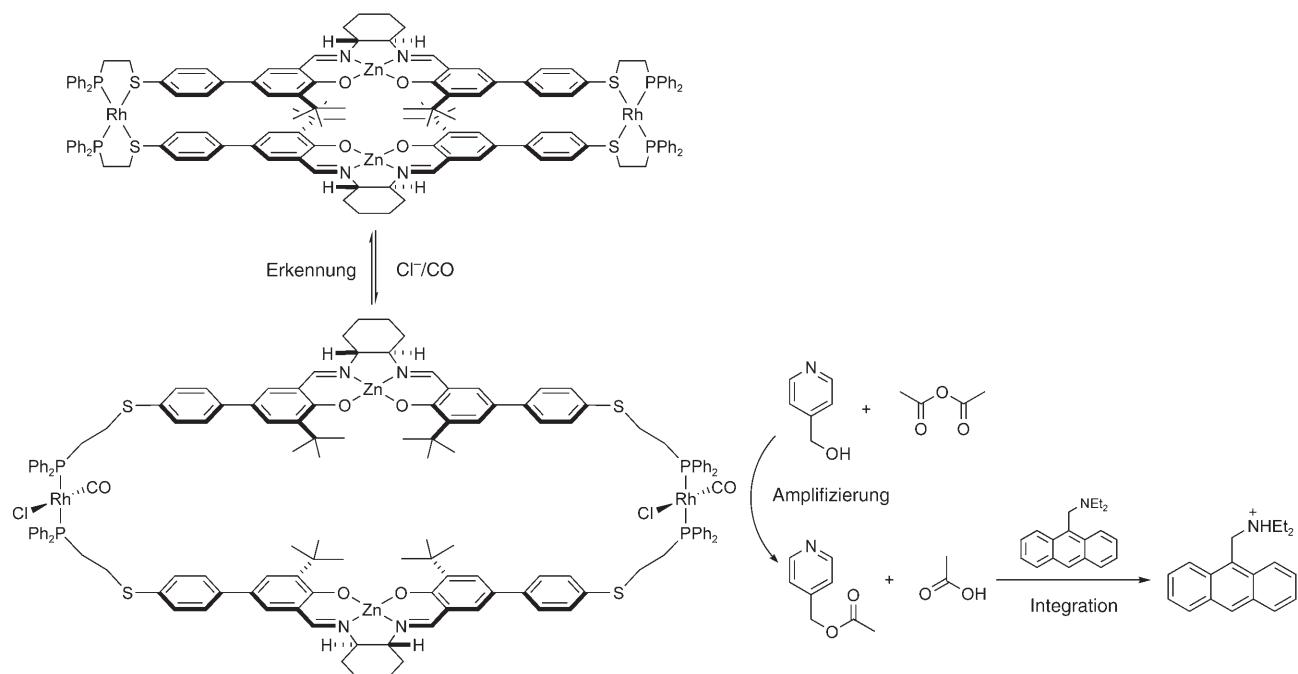
Als eine direkte Erweiterung dieser SAAC-Strategie wurde ein für  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen selektives System entwickelt. Die Allosterie wurde hier in eine andere fluorogene Heck-Reaktion implementiert, die zu 7-Diethylaminocumarin führt (Schema 6b).<sup>[71]</sup> Der  $\text{Cd}^{2+}$ -selektive Ligand 1,4,7,10,13-Pentaazacyclopentadecan wurde als desaktivierender Ligand für das Katalysesystem gewählt. Die Heck-Reaktion wurde durch die Einführung einer  $\text{Cd}^{2+}$ -Probe initiiert, um wie im vorherigen Beispiel eine proportionale Menge des desaktivierenden Liganden abzusondern. Die Fluoreszenzintensität des 7-Diethylaminocumarinprodukts nach der katalytischen Amplifizierung konnte mit der  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration der Probe korreliert werden. Die vorteilhafteren optischen Parameter ( $\varepsilon$  und  $\phi$ ) von Cumarin und die höhere Geschwindigkeit der Indikatorreaktion ( $k_{\text{cat}}$ ) – verglichen mit der 3-Methylindolbildung im früheren Beispiel – machen dieses Verfahren

empfindlicher. Die Initiierung des Pd-Katalysators wurde hier jedoch geschwindigkeitsbestimmend, wodurch sich die praktischen Möglichkeiten dieses Systems verringern.<sup>[71]</sup>

Mirkin et al. machten kürzlich aus einem supramolekularen allosterischen Katalysesystem<sup>[72]</sup> ein System für den Chloridnachweis (Schema 7).<sup>[73]</sup> Der supramolekulare allosterische Katalysator war dabei ein  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Salen-Dimer, das über die in Mirkins Arbeitsgruppe entwickelte Weak-Link-Methode<sup>[74]</sup> hergestellt wurde. In Abwesenheit der allosterischen Effektoren CO oder  $\text{Cl}^-$  nahm der Katalysator eine geschlossene Form an, die nicht in der Lage war, die Katalyse der Acylübertragung<sup>[75]</sup> von Acetanhydrid auf Pyridylcarbinol durchzuführen, für die ein zweikerniges Katalyzenzentrum erforderlich ist. CO und  $\text{Cl}^-$  führten dagegen zum Bruch der relativ schwachen Thioether-Rh<sup>I</sup>-Bindungen, sodass der Katalysator in eine offene Form überging, die die Acyltransferreaktion über zwei Metallzentren katalysieren konnte und dabei 4-Acetoxyethylpyridin und Essigsäure lieferte (Signalamplifizierung). Die Essigsäure protonierte schließlich einen pH-empfindlichen Fluorophor – (Diethylamino)methylanthracen –, sodass die verstärkte chemische Information in einem optischen Signal zusammengefasst wurde, das fluorimetrisch schnell analysiert werden konnte und die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration lieferte (mit dem CO-Druck als festem Parameter). Die Empfindlichkeit für  $\text{Cl}^-$ -Ionen erreichte nach einer Laufzeit von sechs Stunden den submikromolaren Bereich.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung von SAAC-Strategien hat der Bio- und Chemosensorik neue Impulse gegeben. Die Chemiker fangen



**Schema 7.** Ein supramolekularer allosterischer katalytischer Signalverstärker. Die Rh-S-Bindungen in der geschlossenen Struktur sind die schwachen Bindungen, die durch Versetzen mit  $\text{Cl}^-$  und CO gebrochen werden; auf diese Weise wird die offene Struktur erhalten.

gerade an, das umfangreiche Repertoire an katalytischen Reaktionen zu erforschen, das bisher ausschließlich für präparative Zwecke verwendet worden ist. Die enorme Zunahme von supramolekularen<sup>[76,77]</sup> und metallorganischen Katalysen in den letzten Jahrzehnten bietet uns reichliche Möglichkeiten, regulierbare katalytische Reaktionen für die Messtechnik zu verwenden.

Wie bei allen Messmethoden sind Empfindlichkeit, Spezifität und Analysedauer wichtige Kriterien. Nach unserer einfachen theoretischen Analyse (Schema 4) werden die Empfindlichkeit und die Anwendbarkeit solcher Methoden primär durch den Amplifizierungsfaktor ( $k_{cat}\Delta t$ ) der Indikatorreaktion bestimmt. Grundsätzlich kann die Empfindlichkeit immer durch die Erhöhung der Analysendauer  $\Delta t$  gesteigert werden, aber eine langwierige Detektion ist bei praktischen Anwendungen nicht erwünscht. Natürlich strebt man schnelle Reaktionen mit großen Umsätzen an. Das Ausmaß des katalytischen Umsatzes hängt nicht nur von der Reaktion selbst, sondern auch von den Substratstrukturen ab. In zukünftigen Studien sollten daher spezifische Substrate gesucht werden, um einfache Indikatorreaktionen zu erhalten. Da sich viele Messverfahren auf optische Anzeigewerte stützen, sind katalytische Reaktionen, die Fluorophore oder Luminophore mit ausgezeichneten optischen Parametern ( $\epsilon$  und  $\phi$ ) liefern, höchst erstrebenswert.

Studien zur molekularen Erkennung haben eine umfangreiche Liste spezifischer kleiner molekülgestützter Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ergeben, die für die Entwicklung von Sensoren erschlossen werden können. Weiterhin sind supramolekulare und metallorganische Katalyse mittlerweile ausgereifte Forschungsgebiete; die Zeit ist nun günstig, diese beiden chemischen Leistungen des 20. Jahrhunderts (anerkannt durch Nobelpreise in Chemie 1987, 2001 und 2005) zu vereinen, um ihr gemeinsames Potenzial für die Entwicklung von Messtechniken im neuen Jahrtausend einzusetzen.

*Wir danken Joy Wu und Ron Houk, die in unserer Arbeitsgruppe neue SAAC-Strategien entwickelt haben. Unsere Forschung wird durch das National Institute of Health (EB-00549-5) unterstützt.*

Eingegangen am 28. April 2005

Online veröffentlicht am 24. Januar 2006

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515.
- [2] L. Fabbrizzi, M. Licchelli, A. Taglietti, *Dalton Trans.* **2003**, 3471.
- [3] T. M. Swager, T.-H. Kim, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4951; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4803.
- [4] L. Zhu, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3676.
- [5] J. Wang, D. Liu, B. Munge, L. Lin, Q. Zhu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2158.
- [6] C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9134.
- [7] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192.

- [8] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, C. Gerber, J. K. Gimzewski, *Science* **2000**, *288*, 316.
- [9] F. J. Green, *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*, Sigma-Aldrich Corporation, Milwaukee, WI, **1990**.
- [10] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9. Aufl., Molecular Probes, Eugene, OR, **2002**.
- [11] P. Ball, *Nature* **2001**, *409*, 413.
- [12] B. Kobe, B. E. Kemp, *Nature* **1999**, *402*, 373.
- [13] L. Stryer, *Biochemistry*, 4. Aufl., W. H. Freeman, New York, **1995**.
- [14] W. J. Blaedel, R. C. Boguslaski, *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1026.
- [15] G. B. Wisdom, *Clin. Chem.* **1976**, *22*, 1243.
- [16] J. P. Gosling, *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 1408.
- [17] T. Porstmann, S. T. Kiessig, *J. Immunol. Methods* **1992**, *150*, 5.
- [18] J. R. Crowther, *ELISA: Theory and Practice*, Humana Press, Totowa, NJ, **1995**.
- [19] D. Perez-Bendito, M. Silva, *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*, Wiley, New York, **1988**.
- [20] G. J. Kost, P. J. Vogelsang, B. L. Reeder, K. L. Omand, C. S. Leach, *Lab. Rob. Autom.* **1989**, *1*, 275. Zum Beispiel fertigt Beckman Coulter jetzt automatisierte ELISA-Arbeitsplatzsysteme.
- [21] S. H. Jenkins, *J. Immunol. Methods* **1992**, *150*, 91.
- [22] R. K. Saiki, S. Scharf, F. S. Sanger, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350.
- [23] B. Schweitzer, S. Kingsmore, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 21.
- [24] M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 62.
- [25] P. Geymayer, N. Bahr, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1006.
- [26] H. C. Hang, C. Yu, M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6.
- [27] G. MacBeath, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6101.
- [28] H. Oguri, M. Hirama, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Maruyama, H. Uehara, Y. Nagumo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7608.
- [29] F. Taran, C. Gauchet, B. Mohar, S. Meunier, A. Valleix, P. Y. Renard, C. Crémignon, J. Grassi, A. Wagner, C. Mioskowski, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 132; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 124.
- [30] H. Ueda, K. Tsumoto, K. Kubota, E. Suzuki, T. Nagamune, H. Nishimura, P. A. Schueler, G. Winter, I. Kumagai, W. C. Mohoney, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1714.
- [31] Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3452.
- [32] T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Science* **1992**, *258*, 120.
- [33] C. M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 208.
- [34] A. Villaverde, *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 169.
- [35] Z. Ma, J.-S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11159.
- [36] J. Cai, X. Li, X. Yue, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324.
- [37] H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13980.
- [38] I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7849.
- [39] In ihrem Bericht verwendeten die Autoren noch den Begriff „allosterisch“. In den folgenden Abschnitten versuchen wir nicht, zwischen den Begriffen „allosterisch“ und „intrasterisch“ zu unterscheiden.
- [40] A. Saghatelyan, K. M. Guckian, D. A. Thayer, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 344.
- [41] B. W. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333.
- [42] F. C. Simmel, W. U. Dittmer, *Small* **2005**, *1*, 284.
- [43] E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science* **1990**, *247*, 954.
- [44] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 469.

- [45] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 318.
- [46] R. R. Breaker, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 31.
- [47] J. S. Hartig, I. Grüne, S. H. Najafi-Shoushtari, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 722.
- [48] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, **1999**.
- [49] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303.
- [50] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547.
- [51] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 411.
- [52] S. Sando, A. Narita, K. Abe, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5300.
- [53] V. Pavlov, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6522.
- [54] F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3398.
- [55] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770.
- [56] S. Sando, T. Sasaki, K. Kanatani, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15720.
- [57] P. Simon, C. Dueymes, M. Fontecave, J.-L. Decout, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2824; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2764.
- [58] F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13918.
- [59] Y. Xiao, V. Pavlov, R. Gill, T. Bourenko, I. Willner, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 374.
- [60] E. J. Cho, L. Yang, M. Levy, A. D. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2022.
- [61] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, Ltd., **2000**.
- [62] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [63] J. P. Collman, L. S. Hegedus, J. R. Norton, R. G. Finke, *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, **1987**.
- [64] L. Kovbasyuk, R. Krämer, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3161.
- [65] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [66] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [67] L. Zhu, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7267.
- [68] B. Beekman, J. W. Drijfhout, W. Bloemhoff, H. K. Rondal, P. P. Tak, J. M. te Koppele, *FEBS Lett.* **1996**, *390*, 221.
- [69] J. Hirata, F. Ariese, C. Gooijer, H. Irth, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478*, 1.
- [70] Q. Wu, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14682.
- [71] Q. Wu, E. V. Anslyn, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2815.
- [72] N. C. Gianneschi, P. A. Bertin, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10508.
- [73] N. C. Gianneschi, S. T. Nguyen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*.
- [74] M. S. Khoshbin, M. V. Ovchinnikov, C. A. Mirkin, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 496.
- [75] L. G. Mackay, R. S. Wylie, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3141.
- [76] J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1378.
- [77] R. Cacciapaglia, S. D. Stefano, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 113.