

Proteintemplat-vermittelter Acyltransfer: eine chemische Methode für die Markierung von Membranproteinen an lebenden Zellen**

Ulrike Reinhardt, Jonathan Lotze, Sarah Zernia, Karin Mörl, Annette G. Beck-Sickinger und Oliver Seitz*

Abstract: Eine neue Methode zur chemischen Proteinmarkierung läuft mit hoher Zielspezifität innerhalb weniger Minuten ab und ermöglicht eine freie Wahl des Reportermoleküls. Sie beruht auf Peptidtemplaten, die einen Thioester und ein N-terminales Cystein so ausrichten, dass eine Acyltransferreaktion bei nanomolarer Konzentration möglich wird. Das Zielprotein wird N-terminal mit einem 22 Aminosäure langen Cys-E3-Peptid (Akzeptor) ausgestattet, das mit einem Reportertragenden K3-Peptid (Donor) ein Coiled-Coil bilden kann. Dadurch wird die Übertragung des Reportermoleküls auf den Akzeptor am Zielprotein ausgelöst. Weil die Ligierung der wechselwirkenden Peptide vermieden wird, ist der Massenzuwachs am Zielprotein minimal. Zur Veranschaulichung der Methode werden die rasche Fluoreszenzmarkierung und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des humanen Y2-Rezeptors an lebenden Zellen gezeigt.

Methoden, durch die funktionelle Einheiten wie spektroskopische Marker oder Spinsonden in vivo kovalent an Membranproteinen angebracht werden können, sind Schlüsseletechniken der zellbiologischen Forschung.^[1] Die ideale Markierungsstrategie böte a) hohe Selektivität für das Zielprotein, b) hohe Markierungsgeschwindigkeiten für die Untersuchung schneller Prozesse und c) ein Baukastenprinzip zur Anbringung unterschiedlichster Marker. Allerdings sind diese Anforderungen bei Verwendung natürlich vorkommender funktioneller Gruppen nur schwer zu erfüllen.

Techniken wie Amber (STOP) oder erweitertes Codonauslesen, Pyrrolysinmethoden oder die metabolische Markierung werden verwendet, um artifizielle Aminosäuren einzuführen, die durch biokompatible Konjugationsreaktionen adressiert werden können.^[2] In einem häufigen Forschungsansatz werden genetisch kodierte Erkennungssequenzen genutzt. Diese werden mit dem Zielprotein fusioniert und schaffen eine einzigartige Mikroumgebung, die von Markierungssonden selektiv angesprochen werden kann. Dabei ist die Größe der Erkennungssequenz von Bedeutung.

Kurze Sequenzen sind wünschenswert, um eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion zu vermeiden. Hohe Spezifitäten werden durch selbstmodifizierende Proteine wie das Snap-,^[3] Clip-^[4] und Halo-Tag^[5] erreicht. Diese Erkennungssequenzen sind jedoch länger als 180 Aminosäuren. Ein anderer Ansatz nutzt Enzyme, die eine Reaktion zwischen einer reaktiven Sonde und einer kurzen Peptidsequenz vermitteln. Erforderlich sind relativ hohe Substratkonzentrationen (>100 μM für FGE^[7] und Sortase)^[8] oder lange Inkubationszeiten (1 h für Lactamase).^[6] Nur wenige Peptid-Tags sind in der Lage, ohne die Hilfe zusätzlicher Enzyme oder Reagenzien kovalente Bindungen zu bilden. Beispiele dafür sind Organobisarsonsäurethioester^[9] oder Bisboronsäuren,^[10] die mit Tetracystein- bzw. Tetraserinmotiven reagieren. Durch Reaktionszeiten von 30 min oder mehr und μM Sondenkonzentrationen könnten auch andere cystein- oder serinreiche Proteine markiert werden.

Wir suchten nach einer Methode, die eine rasche (<5 min) und hochspezifische Markierung von Membranproteinen ermöglicht und dabei dem Zielprotein nur eine minimale Last zufügt. Hierfür zogen wir Templat-vermittelte Reaktionen in Betracht. Diese verlaufen bei einer hohen effektiven Molarität der reaktiven Gruppen und ermöglichen so Konjugationsreaktionen unter den Bedingungen starker Verdünnung, wenn herkömmliche bimolekulare Reaktionen nicht mehr ablaufen. Unser Reaktionsdesign nutzt den Cystein-vermittelten Transfer einer beliebigen Reportergruppe (Schema 1). Das Reaktionssystem beruht auf zwei Peptiden mit hoher gegenseitiger Affinität, wie der zwischen der Tag-Sequenz im Akzeptorpeptid **1** und der Tag-Erkennungssequenz (TagRec) in **2**. Das mit dem Zielprotein fusionierte Akzeptorpeptid trägt ein N-terminales Cystein, das an einer Reaktion nach Art der nativen chemischen Ligation teilnehmen kann.^[11] Das TagRec-Peptid in **2** erkennt diese Tag-Sequenz und fungiert als Donor einer Thioester-gebundenen Reportergruppe. Die gegenseitige Erkennung der beiden Peptide löst eine Thiolautauschreaktion aus und bildet so **3-4**. Die anschließende S-N-Acylwanderung führt zur irreversiblen Übertragung der Acylgruppe vom Donor **2** auf das Akzeptorpeptid (**1→5**). Zu beachten ist, dass die Templat-gesteuerte Reaktion über binäre Komplexe verläuft. Dies sowie die Verwendung des Acyltransferprinzips minimieren den Massenzuwachs am Zielprotein, der bei einer konventionellen Verknüpfungsreaktion höher wäre.^[12]

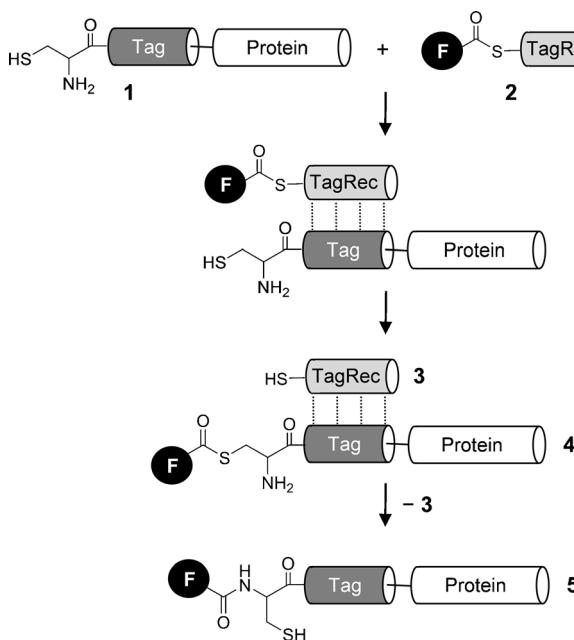
Templat-gesteuerte Acyltransferreaktionen wurden bereits in der Nucleinsäurechemie verwendet.^[13] Es ist jedoch ungleich anspruchsvoller, ein kurzes Peptid mit hoher Affinität zu einer reaktiven Sonde zu entwerfen. Ghadiri und Chmielewski zeigten mit ihren Arbeiten zu Templat-gesteu-

[*] U. Reinhardt, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

J. Lotze, S. Zernia, Dr. K. Mörl, Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger
Institut für Biochemie, Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)

[**] Dieses Projekt wurde vom Schwerpunktprogramm der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP 1623) finanziell unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403214> zu finden.



Schema 1. Prinzip der Peptidtemplate-vermittelten Acyltransferreaktion (F = Reportergruppe, Tag = genetisch-kodierte Erkennungssequenz, TagRec = reaktive Sonde).

erten Peptidverknüpfungen in Studien zum molekularen Ursprung des Lebens, dass die beiden Strände eines Coiled-Coils eine hohe wechselseitige Affinität aufweisen, die chemische Reaktionen bei submikromolaren Konzentrationen ermöglicht.^[12a-d] Zudem bestätigten fluoreszenzmikroskopische Studien von Matsuzaki et al., dass artifizielle Coiled-Coils an der Oberfläche lebender Zellen gebildet werden können.^[14] Die de novo entworfenen Coiled-Coil-Sequenzen K3 (KIAALKE)₃ und E3 (EIAALEK)₃ bilden sehr stabile, parallele Heterodimere ($K_D = 70 \text{ nM}$)^[15] und schienen deshalb geeignet zu sein, die Umsetzbarkeit eines Peptidtemplate-vermittelten Acyltransfers zu untersuchen.^[16]

Das K3-Peptid wurde am N-Terminus mit einer Mercaptophenylacetyl-Einheit (MPAA) ausgestattet, und Fluoreszenzmarker wie Tetramethylrhodamin (TAMRA) oder Alexa Fluor 350 (AF350) wurden als Thioester daran gebunden (Abbildung 1a).^[17] Das E3-Peptid fungierte als Akzeptor und trug zu diesem Zweck einen N-terminalen Cysteinrest. Um die Realisierbarkeit des Peptidtemplate-gesteuerten Acyltransfers einzuschätzen, wurde die TAMRA-tragende Donorsonde **6a** mit dem Akzeptor **7** bei 5 μM Konzentration zur Reaktion gebracht. Die Analyse mithilfe von HPLC unter Fluoreszenzdetektion zeigte das fast vollständige Verschwinden des Donorpeptids **6a** und die Entstehung von zwei neuen Peaks nach 30 min Reaktionszeit (Abbildung 1b). Basierend auf der massenspektrometrischen Untersuchung dieser Peaks wurden diese als das Transferprodukt **8a** und das Hydrolyseprodukt **10a** identifiziert. Nach 30 min Reaktionszeit wurden 57 % markiertes Produkt erhalten. Zur Untersuchung der Spezifität der Coiled-Coil-gesteuerten Transferreaktion wurde das Thioesterpeptid auch mit dem Cysteinylpeptid CRAESYK (**11**; Abbildung 1b, Hintergrund) umgesetzt. Die Abwesenheit eines Reaktions-

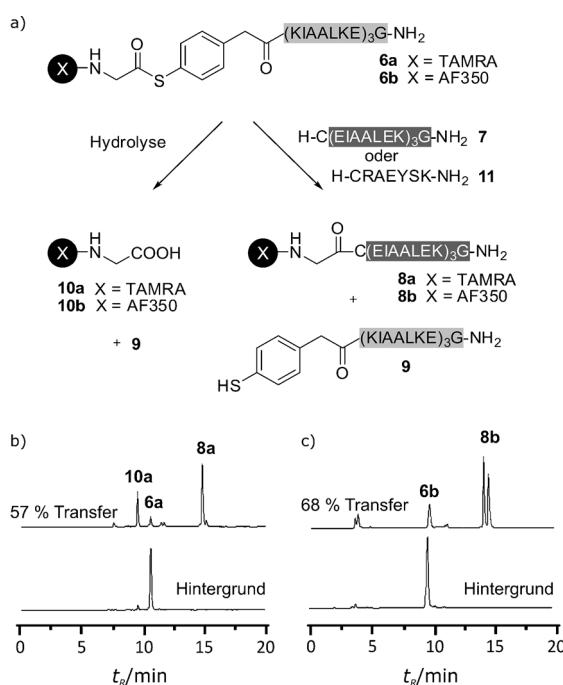


Abbildung 1. a) Peptidtemplate-vermittelte Acyltransferreaktionen der Donor-Thioesterpeptide **6a,b** mit dem Akzeptorpeptid-Tag **7** oder dem Cysteinylpeptid **11** (= Spezifitätskontrolle). Analyse mithilfe Fluoreszenz-detekterter HPLC nach 30 min Reaktion zwischen b) Thioester **6a** und den Cysteinylpeptiden **7** (oben) oder **11** (unten) (5 μM Peptid, 100 mM NaH_2PO_4 , 1 mM TCEP, pH 7.0; $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$) oder c) Thioester **6b** und den Cysteinylpeptiden **7** (oben) oder **11** (unten) (0.5 μM Peptid, 100 mM NaH_2PO_4 , 1 mM TCEP, pH 7.0; $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 442 \text{ nm}$). Transferprodukt **8b** tritt durch gleichzeitige N- und S-Acylierung als Doppelpeak auf. TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphin.

produkts zeigt, dass die Reaktion der Proximitätserhöhung durch die Coiled-Coil-Bildung bedarf.

Als nächstes evaluierten wir die Vielseitigkeit der Markierungsreaktion. Das Cys-E3-Akzeptorpeptid **6** wurde mit dem Donorkonjugat **6b**, das einen sulfonierten Alexa-Fluor-Farbstoff (AF350, **6b**) trägt, umgesetzt. Bei einer Konzentration beider Peptide von 0.5 μM wurde das Transferprodukt **8b** in einer Ausbeute von 68 % gebildet (Abbildung 1c). In diesem Fall konnte die Bildung eines doppelt acylierten Produkts (N- und S-gebunden) beobachtet werden. Dies ist kein Nachteil, da der S-gebundene Fluorophor durch Hydrolyse das einfach acyierte Transferprodukt **8b** bildet (Abbildung S1; S: Hintergrundinformationen). Nachfolgend unterzogen wir die Chemoselektivität der Peptidtemplate-vermittelten Acyltransferreaktion einem stringenteren Test und führten die Reaktion in Zellkulturmedium durch (Abbildung S2). In Abwesenheit eines externen Reduktionsmittels lieferte die Reaktion des AF350-K3-Donorkonjugats **6b** mit dem Cysteinylpeptid **7** trotz der Gegenwart von fetalem Kälberserum und Cystin (200 μM) eine Markierungsausbeute von 43 %.

Wir untersuchten die Reaktivität der Thioestersonde **6a** bei der Markierung einer kleinen Proteindomäne, der 5.8 kDa schweren Cys-E3-markierten WW2-Domäne **12** (Abbildung 2a). SDS-PAGE und Fluoreszenzdetektion zeig-

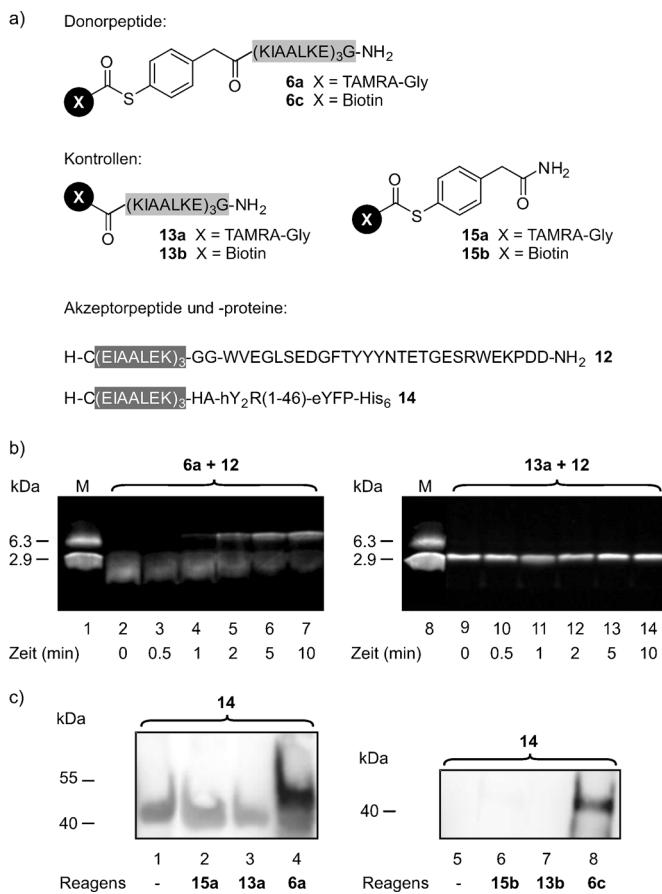


Abbildung 2. a) Strukturen verwendeter Verbindungen. b) Analyse mit Hilfe von SDS-PAGE unter Fluoreszenzdetektion der Reaktion zwischen der Cys-E3-tragenden WW2-Domäne **12** und dem Thioester-verknüpften TAMRA-K3-Konjugat **6a** oder der Amid-verknüpften Kontrollverbindung **13a**. Bedingungen: 0.5 μ M Cys-E3-WW2 (**11**), 1.0 μ M K3-Peptid (**6a** oder **13a**), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1 mM TCEP, pH 7.2; Reaktion durch Zugabe von 2% TFA gestoppt. c) Western-Blot-Analyse der Reaktion zwischen Cys-E3-tragendem hY₂R(1-46)-eYFP-His₆ mit 37.5 kDa (**14**) und TAMRA-verknüpften (**6a**, **13a**, **15a**) oder Biotin-verknüpften Verbindungen (**6c**, **13b**, **15b**). TAMRA-Markierungsbedingungen: 20 μ M **14**, 20 μ M TAMRA-Verbindungen (**6a**, **13a**, **15a**), 25 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4. Biotin-Markierungsbedingungen: 10 μ M **14**, 20 μ M Biotinverbindungen (**6c**, **13b**, **15b**), 25 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4; Reaktion durch Zugabe von 5 μ L 1 M NaOH gestoppt. Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

ten nach nur 1–2 min Reaktionszeit das Auftreten einer TAMRA-Bande in der zu erwartenden Massenregion (Abbildung 2 b, Taschen 4 und 5). Eine solch hohe Reaktionsgeschwindigkeit wurde ebenfalls bei kinetischen Untersuchungen zur Reaktion **6a** + **7** beobachtet (Abbildung S3). Die TAMRA-markierte WW2-Domäne wurde nach 10 min in einer Ausbeute von 58% erhalten. In einem Kontrollexperiment wurde das Akzeptorpeptid **12** mit einer unreaktiven K3-Sonde (**13a**) umgesetzt, in der TAMRA nicht als Thioester, sondern als Amid gebunden ist. Dies führte zu keiner fluoreszierenden Proteinbande im Gel (Abbildung 2 b, Taschen 10–14).

Der nächste Schritt umfasste die Markierung eines Membranproteinmodells. Wir wählten die N-terminale Mar-

kierung des humanen Neuropeptid-Y2-Rezeptors (hY₂R). Dieser Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembranproteine und spielt eine wichtige Rolle bei Epilepsie und der Regulation der Nahrungsaufnahme.^[18] Der extrazelluläre N-Terminus des hY₂R (1–46) wurde mit einem fluoreszierenden Protein (eYFP) fusioniert und mit einer N-terminalen Cys-E3-Sequenz sowie einem Hämaggglutinin-Epitop (HA) ausgestattet. Das resultierende Konstrukt Cys-E3-HA-hY₂R(1-46)-eYFP-His₆ (**14**) wurde mit dem Donorkonjugat **6a** umgesetzt (Abbildung 2 c). Als Negativkontrollen wurden das amidgebundene **13a** und ein TAMRA-Thioester ohne Peptid (**15a**) getestet. Die Donor- oder Kontrollpeptide wurden 2 min mit dem hY₂R-Konstrukt **14** inkubiert. SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse zeigte bei der Reaktion mit dem reaktiven Donor **6a** eine starke Bande des Molekulargewichts an (37.5 kDa), das für das Markierungsprodukt erwartet wurde (Abbildung 2 c, Tasche 4). Im Kontrollexperiment, bei dem der Akzeptor **14** ohne weitere Reagentien inkubiert wurde, zeigte sich eine unspezifische Bindung des TAMRA-Antikörpers (Abbildung 2 c, Tasche 1). Deshalb untersuchten wir auch die Übertragung eines Biotins, das durch die hochspezifische Wechselwirkung mit Streptavidin selektiv nachgewiesen werden kann. Ein biotinyliertes Produkt wurde bei der Reaktion des E3-tragenden Akzeptors **14** mit dem reaktiven K3-Konjugat **6c** innerhalb von nur 2 min gebildet (Abbildung 2 c, Tasche 8). Die Biotinylierung trat nicht auf, wenn wie bei den Kontrollverbindungen **13b** und **15b** die Thioesterverknüpfung bzw. das K3-Erkennungsmodul fehlten (Abbildung 2 c, Taschen 6 und 7). Dies zeigt, dass die Thioesterstruktur allein (**14** + **15b**) nicht ausreicht, um eine schnelle und effiziente Markierung von Cys-E3-HA-hY₂R(1-46)-eYFP-His₆ (**14**) herbeizuführen. Vielmehr ist das Zusammenspiel zwischen Thioesterstruktur und dem K3-Erkennungsmodul wie in den reaktiven Sonden **6a** und **6c** erforderlich, um die Reaktion anzureiben.

Der Coiled-Coil-vermittelte Acyltransfer wurde anschließend an lebenden Zellen getestet. Das Ziel war es, den vollständigen hY₂R selektiv zu markieren. Das Membranprotein wurde N-terminal mit zwei Varianten des E3-Tags fusioniert. Während **17** das E3-Tag mit einem N-terminalen Cystein trug, enthielt Konstrukt **18** ein E3-Tag, bei dem das Cystein durch ein Alanin ersetzt wurde. Dieses Konstrukt ist zwar in der Lage, das Coiled-Coil zu bilden, aber das Fehlen des Cysteins verhindert die Knüpfung einer kovalenten Bindung. Um die Lokalisierung des Rezeptors zu überprüfen, wurde ein autofluoreszierendes eYFP an den C-Terminus fusioniert. Das hY₂R-eYFP-Konstrukt (**16**) ohne E3-Tag fungierte als Kontrolle. Die hY₂R-Konstrukte wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert. Aufnahmen der eYFP-Emission zeigten, dass das Anhängen des E3-Tags die Membranlokalisierung nicht beeinflusste (Abbildung 3). Außerdem blieben die N-terminal modifizierten hY₂R-Rezeptoren biologisch aktiv, wie durch einen IP₃-Aktivierungssassay nach Behandlung mit dem nativen Neuropeptid-Y-Liganden gezeigt werden konnte (Tabelle S1). Die Zellen, die **16**, **17** oder **18** exprimierten, wurden lediglich 2 min mit einer Lösung aus 100 nM TAMRA-geladenem Peptid **6a** in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7.8) und 1% Rinderserumalbumin

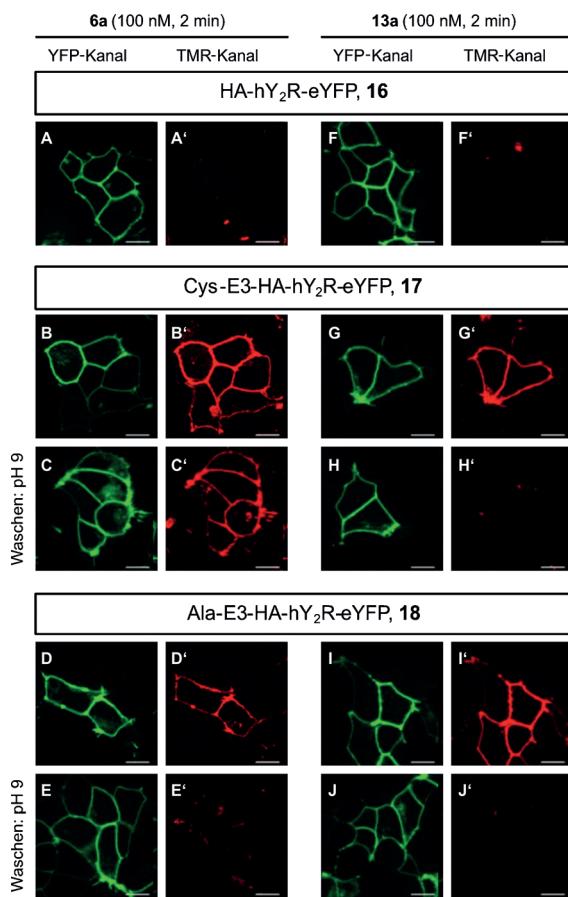


Abbildung 3. Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HEK293-Zellen, die transzit mit HA-hY₂R-eYFP (A, A', F, F'), Cys-E3-HA-hY₂R-eYFP (B, B', C, C', G, G', H, H') oder Ala-E3-HA-hY₂R-eYFP (D, D', E, E', I, I', J, J') transzit wurden, nach Inkubation mit Markierungssonde **6a** (beide Spalten links) oder mit unreaktivem Konjugat **13a** (beide Spalten rechts). Bilder C, C', E, E', H, H', J und J' wurden nach einem zusätzlichen basischen Waschschritt aufgenommen. Markierung: 100 nM Peptid **6a** oder **13a** in HBSS mit 1% BSA, nach 2 min Reaktionszeit wurde die Lösung durch HBSS ausgetauscht. Basisches Waschen: 200 mM NaHCO₃, pH 9 für 3 min, Fluoreszenzmikroskopie: 0.4–1.3 s Verschlusszeit für den eYFP-Filter, 4 s Verschlusszeit für den TAMRA-Filter, der Maßstabsbalken misst 10 μm.

(BSA) behandelt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Lösung durch HBSS ausgetauscht. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass Zellen, die E3-tragende Rezeptoren exprimierten, mit TAMRA markiert wurden, während Zellen, denen das E3-Tag fehlte, kein TAMRA-Signal emittierten (Abbildung 3, vergleiche B', D', G' und I' mit A' und F'). Zur Überprüfung der kovalenten Markierung wurden die Zellen mit einem pH-9-Puffer gewaschen (Abbildung 3; C', E', H', J'), was zu einer Dissoziation des Coiled-Coils sowie zur Hydrolyse des Thioesters führte. Die TAMRA-Emission blieb hoch, wenn die Zellen den Cys-E3-markierten hY₂R (**17**) exprimierten (Abbildung 3, vergleiche C' mit B'). Im Unterschied dazu zeigten die Zellen, die den Ala-E3-markierten hY₂R (**18**) exprimierten, einen deutlichen Verlust des TAMRA-Signals (Abbildung 3, vergleiche E' mit D'). Ein zusätzliches Kontrollexperiment umfasste die Verwendung unreaktiver TAMRA-K3-Konju-

gatate, in denen der TAMRA-Fluorophor als Amid gebunden war. Folglich konnten zwar Coiled-Coils gebildet, das TAMRA jedoch nicht auf den E3-tragenden hY₂R übertragen werden. Tatsächlich zeigten die Zellen, die mit Cys-E3-hY₂R (**17**) und Ala-Cys-hY₂R (**18**) transzit wurden, eine TAMRA-Emission nach der Behandlung mit unreaktivem **13a** (Abbildung 3, G' und I'), jedoch verschwand das TAMRA-Signal nach dem Waschen der Zellen mit pH-9-Puffer (Abbildung 3, vergleiche H' mit G' und J' mit I'), was die Dissoziation des Coiled-Coils bezeugt. Die Experimente belegen, dass eine robuste TAMRA-Markierung nur erreicht werden kann, wenn eine reaktive Sonde (**6a**) mit einem reaktiven Akzeptor (**17**) interagiert. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Bildung kovalenter Bindungen.

Die vorgestellten Daten demonstrieren die Vielseitigkeit der Peptidtemplat-vermittelten Acyltransferreaktion. Die Reaktion läuft in verschiedenen Puffern (pH 7.0–7.8) wie auch an der Oberfläche lebender Zellen ab. Die thioarylbasierten Thioester der Markierungsagentien **6a–c** haben eine hohe Reaktivität (**6a**: $t_{1/2}$ (HBSS) = 10 min; Abbildung S4). In Anbetracht der hohen Reaktionsgeschwindigkeit am Templat trägt dies zur hohen Reaktionsspezifität bei, da unerwünschte Markierungsreaktionen, die durch überschüssigen Thioester herbeigeführt würden, wegen der konkurrierenden Hydrolyse unterbleiben. Für den Fall, dass die Hydrolyse zu rasch verläuft, kann die Reaktivität durch Veränderungen an der Thioesterstruktur angepasst werden, wie frühere Arbeiten zu Oligonukleotidtemplat-vermittelten Reaktionen gezeigt haben (siehe auch Abbildung S5).^[13a,b,19]

Die vorgestellte Markierungsmethode benötigt einen N-terminalen Cysteinrest. Dies könnte unter Umständen die Faltung der Extrazellulärdomäne des gewünschten GPCR stören. Um die allgemeine Anwendbarkeit zu beurteilen, wendeten wir den E3/K3-vermittelten Acyltransfer auch auf den humanen Y₅-Rezeptor (hY₅R) an. Beide Rezeptoren, hY₂R wie auch hY₅R, enthalten extrazelluläre Disulfidbrücken. Das Cys-E3-Tag beeinträchtigte die GPCR-Funktion nicht, und die Markierung an lebenden Zellen lief auch am hY₅R mit hoher Geschwindigkeit ab (Abbildung S5).

Wir testeten den Transfer von TAMRA, AF350 und Biotin, und wir erwarten, dass diese Reaktion auch auf eine Reihe anderer Reportergruppen anwendbar ist. Die Verwendung des E3/K3-Coiled-Coil-Motivs verlieh der Markierungsreaktion eine bemerkenswerte Chemoselektivität. Die K3-Konjugate werden wahrscheinlich nicht in der Lage sein, die Plasmamembran zu durchqueren. Während dies gegenwärtig die Anwendung auf extrazelluläre Targets beschränkt, sehen wir Vorteile für die geplanten GPCR-Internalisierungsstudien, die eine sehr schnelle und hochspezifische Markierungsmethode benötigen. Wir möchten zudem herausstellen, dass die Konjugation mit zellpenetrierenden Peptiden den Anwendungsbereich auf intrazelluläre Proteine erweitern könnte. Ferner sollte die Markierung über Templatkontrollierten Acyltransfer nicht auf Coiled-Coils beschränkt bleiben, sondern sich vielmehr auch auf Wechselwirkungen zwischen anderen membranpermeablen Proteinen/Peptiden übertragen lassen.

Wir stellen fest: Kurze Markierungszeiten (2 min), niedrige Sondenkonzentrationen (100 nM) und geringer Massen-

zuwachs (22 Aminosäuren + Reporter) sind die besonderen Kennzeichen des von uns entwickelten Coiled-Coil-vermittelten Transfers einer Reportergruppe. Die Reaktion gehört nach unserem Kenntnisstand zu den schnellsten bekannten Markierungsmethoden. Wir erwarten, dass sich dies für Pulse-Chase-Markierungsexperimente als nützlich erweisen wird.

Eingegangen am 11. März 2014,
veränderte Fassung am 4. Juni 2014
Online veröffentlicht am 31. Juli 2014

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Fluoreszenzsonden · Membranproteine · Peptide · Proteinmodifikationen

- [1] a) I. Böhme, A. G. Beck-Sickinger, *Cell Commun. Signaling* **2009**, *7*, 16; b) Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *125*, 4182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088.
- [2] a) V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8150; b) Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, J. C. Paulson, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 207; c) A. Banerjee, T. D. Panosian, K. Mukherjee, R. Ravindra, S. Gal, D. L. Sackett, S. Bane, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 777; d) L. Wang, Z. W. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 56; e) J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486; f) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192; g) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057; h) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793; i) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046; j) M. Wiessler, C. Kliem, P. Lorenz, E. Müller, H. Fleischhacker, EP2006012414, **2006**; k) M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518; l) N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hildebrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297.
- [3] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *21*, 86.
- [4] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128.
- [5] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohane, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Balleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373.
- [6] S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016.
- [7] P. Wu, W. Q. Shui, B. L. Carlson, N. Hu, D. Rabuka, J. Lee, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3000.
- [8] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707.
- [9] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269.
- [10] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schebart, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438.
- [11] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [12] a) D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525; b) K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706; c) K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1017; d) S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 489; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 478; e) N. Brauckhoff, G. Hahne, J. T. H. Yeh, T. N. Grossmann, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4425; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4337.
- [13] a) T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723; b) T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596; c) T. N. Grossmann, L. Roeglin, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7119; d) J. Michaelis, A. Maruyama, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 618; e) J. Michaelis, G. J. v. d. H. van Noort, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 18.
- [14] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341.
- [15] J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37272.
- [16] Dieses Coiled-Coil-Motiv wurde auch von Ball et al. zur Rh-katalysierten Biotinylierung von Proteinen in Zellsäften bei hoher Konzentration (100 μ M) des Markierungsagens genutzt:
a) Z. Chen, B. V. Popp, C. L. Bovet, Z. T. Ball, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 920; b) Z. Chen, F. Vohidov, J. M. Coughlin, L. J. Stagg, S. T. Arold, J. E. Ladbury, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10138.
- [17] Siehe Hintergrundinformationen für Details zur Synthese.
- [18] a) C. Walther, K. Morl, A. G. Beck-Sickinger, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 233; b) R. E. Mercer, M. J. S. Chee, W. F. Colmers, *Front. Neuroendocrinol.* **2011**, *32*, 398.
- [19] a) A. Roloff, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3458; b) A. Roloff, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 432.