

Zuckervermittelte Peptidverknüpfung der zweiten Generation: eine Methode zur Synthese von cysteinhaltenigen Glycopeptiden**

Simon Ficht, Richard J. Payne, Ashraf Brik und Chi-Huey Wong*

Die post- und cotranslationale Glycosylierung von Proteinen ist eine sehr häufig auftretende Modifikation mit großer Bedeutung für biologische Systeme.^[1] Schätzungen gehen davon aus, dass mehr als die Hälfte aller menschlichen Proteine glycosyliert ist.^[2] Die Proteinglycosylierung spielt eine wichtige Rolle für eine Reihe biologischer Erkennungsvorgänge wie Zelladhäsion, Zelldifferenzierung und Zellwachstum.^[3,4] Einige Parasiten nutzen stark glycosyierte membrangebundene Proteine als Einfallstor.^[5] Eine anomale Protein-glycosylierung verändert häufig die intrazelluläre Erkennung und ist mit einer Reihe von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und Krebs verbunden.^[6] Um die Rolle der Glycosylierung auf molekularer Ebene zu verstehen, ist es wichtig, Zugang zu homogenen Glycopeptiden und Glycoproteinen zu haben. Anders als die Aminosäuresequenz eines Proteins unterliegt das Glycosylierungsmuster eines Glycoproteins nicht der Kontrolle eines codierenden Templaats, sondern ist vielmehr Resultat unterschiedlicher Aktivitäten der am Aufbau des Zuckerbaums beteiligten Enzyme. Die Verwendung biologischer Expressionssysteme für die Herstellung von Glycoproteinen ergibt daher Produkte von großer Heterogenität, was deren Studium sehr schwierig macht.

Zugänge zu homogenen Glycoproteinen bieten die rein chemische sowie die chemoenzymatische Synthese.^[7–10] Einige Verknüpfungsmethoden haben in dieser Hinsicht unlängst verstärktes Interesse erfahren. Eine davon ist die native chemische Ligation (NCL), eine chemoselektive Kondensationsreaktion zwischen einem Peptidthioester und einem Peptid mit N-terminalem Cystein, die bereits für die Synthese hunderter unmodifizierter Proteine erfolgreich eingesetzt worden ist.^[11–13] Der Erfolg dieser Methode in der

Peptid- und Proteinsynthese hatte zur Folge, dass diese Technik auch für die Synthese von Glycopeptiden und Glycoproteinen verwendet wurde.^[14–17] Einschränkend gilt aber, dass die NCL-Methode nicht universell einsetzbar ist. Eine offensichtliche Beschränkung besteht darin, dass an der Verknüpfungsstelle ein Cysteinrest vorhanden sein muss.^[18] Cystein ist mit einer natürlichen Häufigkeit von nur 1.7% eine relativ seltene Aminosäure, sodass viele interessante Zielproteine entweder kein Cystein enthalten oder falls doch, dann nur an synthetisch ungünstigen Positionen. Dies führte zur Entwicklung mehrerer cysteinfreier Verknüpfungstechniken,^[19,20] von denen einige bereits erfolgreich in der Synthese von Glycopeptiden eingesetzt wurden.^[21,22] Leider sind diese Methoden, die auf der Verwendung eines N-terminal gebundenen Auxiliars basieren, auf Verknüpfungsstellen mit geringem sterischem Anspruch beschränkt.

Wir berichteten kürzlich über eine neuartige Verknüpfungsmethode für die cysteinfreie Synthese von O- und N-verknüpften Glycopeptiden.^[23,24] Diese als „zuckervermittelte Ligation“ (sugar-assisted ligation, SAL) bezeichnete Methode verwendet ein Glycopeptid, dessen Kohlenhydrat (*N*-Acetylglucosamin) durch einen Sulfanylacetylester modifiziert wurde. In Gegenwart eines Peptidthioesters und unter geeigneten Verknüpfungsbedingungen gehen die Reaktionspartner eine Umlagerung ein, gefolgt von einem spontanen S→N-Acyltransfer, sodass ein Verknüpfungsprodukt mit natürlichem Peptidrückgrat erhalten wird. Die Reaktionskaskade zeigte eine hohe Sequenztoleranz an der Verknüpfungsstelle, sodass eine große Zahl an Produkten auf diesem Weg zugänglich sein sollte. Außerdem verlief die Reaktion selbst in Gegenwart von nucleophilen Aminosäureseitenketten wie Lysin chemoselektiv.^[23] Dies bedeutet, dass Glycopeptidverknüpfungen in Abwesenheit jeglicher Schutzgruppen ausgeführt werden können. Aus diesem Grund hat die SAL kürzlich besondere Aufmerksamkeit als mögliche Methode für die Synthese von Glycoproteinen gefunden.^[25] Ein Problem dieser Methode besteht jedoch darin, dass die für die Entfernung des Auxiliars verwendeten Bedingungen (katalytische Hydrierung) mit anderen thiolhaltigen Resten nicht kompatibel sind. Wie bereits erwähnt, ist die Häufigkeit von Cystein gering, dennoch enthalten die meisten natürlichen Glycoproteine diese Aminosäure in ihrer Sequenz, wenn auch an einer für Verknüpfungsreaktionen ungünstigen Position, sodass weder die SAL noch die NCL verwendet werden kann.

Um das Problem der chemoselektiven Auxiliarentfernung zu umgehen, entwickelten wir eine zuckervermittelte Ligation der zweiten Generation. Diese Methode beruht auf der Verwendung eines Auxiliars, das in Gegenwart anderer Cysteinreste nach der Verknüpfung entfernt werden kann. Ein

[*] Dr. S. Ficht, [+] Dr. R. J. Payne, [+] Prof. C.-H. Wong

The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-748-2409
E-Mail: wong@scripps.edu
und
Academia Sinica, Taipei (Taiwan)

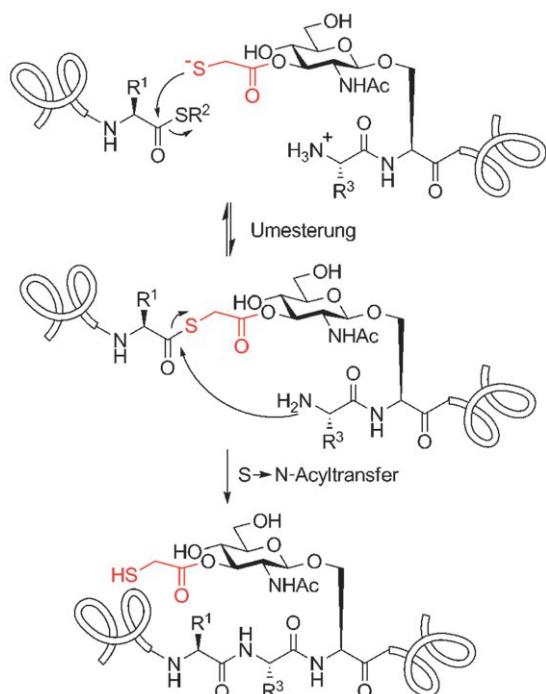
Dr. A. Brik
Department of Chemistry, Ben Gurion University
Beer Sheva (Israel)

[+] Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Diese Arbeit wurde durch die NIH und das Skaggs Institute for Chemical Biology unterstützt. Dank gilt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) (Stipendium für S.F.) und dem Lindemann Trust (Stipendium für R.J.P.).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

säurelabiles Auxiliar konnte nicht verwendet werden, da bei der Festphasensynthese des Glycopeptids stark saure Bedingungen nötig sind. Demgegenüber erfüllt ein basenlabiles Auxiliar, in diesem Fall ein über die 3-Position des Zuckers gebundener Sulfanylacetylrest, die Orthogonalitätskriterien. Der Mechanismus der vorgeschlagenen zuckervermittelten Ligation der zweiten Generation ist in Schema 1 dargestellt.

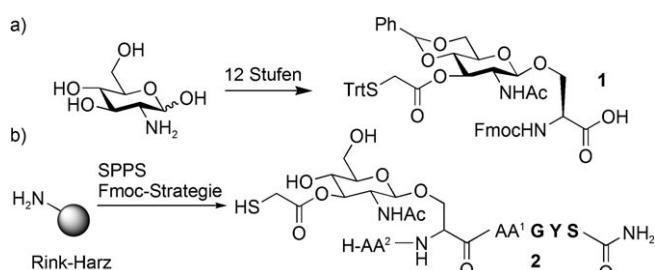


Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus für die zuckervermittelte Glycopeptidligation der zweiten Generation, unterstützt durch ein basenlabiles Auxiliar (R^1, R^3 : Seitenketten der Aminosäuren; R^2 : Phenyl).

Der erste Schritt ist der nucleophile Angriff der Thiolatgruppe des Auxiliars am Thioester unter Umesterung und Bildung eines neuen Thioesters. In einem zweiten Schritt folgt ein spontaner intramolekularer S→N-Acyltransfer, wobei das native Peptidrückgrat entsteht. Anschließende Entfernung des Auxiliars ergibt das native Glycoprotein ohne jegliche Modifikation des ungeschützten Peptidrückgrats.

Die Studie begann mit der Synthese des Monomers **1**, das für die Festphasensynthese des gewünschten auxiliarmodifizierten Glycopeptids benötigt wurde. Ausgehend von D-Glucosamin wurde **1** in einer zwölfstufigen Reaktionsfolge synthetisiert (Schema 2a, siehe Hintergrundinformationen). Die Glycopeptidserie **2** wurde der Fmoc-Strategie folgend an fester Phase aufgebaut (Schema 2b, siehe Hintergrundinformationen). Um den Einfluss verschiedener Reste an der Verknüpfungsstelle zu untersuchen, wurden Glycin, Histidin und Asparaginsäure als N-terminale Aminosäuren gekuppelt. Die für die Untersuchung benötigten Peptidthioester wurden der Boc-Strategie folgend an fester Phase synthetisiert (siehe Hintergrundinformationen).

Um die Tragfähigkeit des Konzepts zu prüfen, wurden das cysteinfreie Glycopeptid **3** und der Peptidthioester **4** im

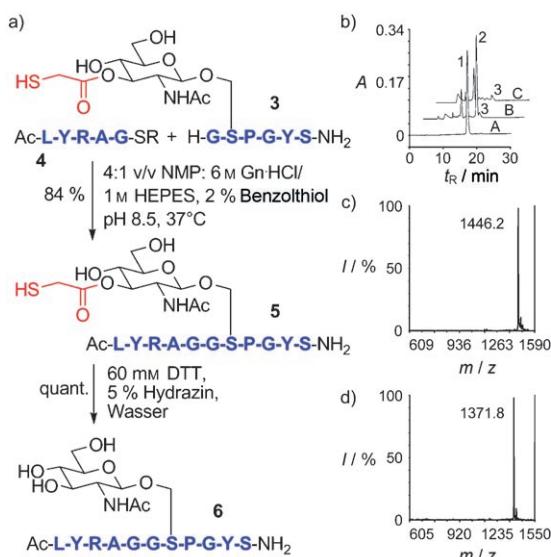


Schema 2. a) Synthese des glycosylierten Aminosäurebausteins **1** ausgehend von D-Glucosamin. Trt: Trityl. b) Festphasensynthese (SPPS) der Glycopeptide mit Sulfanylacetylauxiliar (AA^1 : Pro oder Cys; AA^2 : Gly, Asp oder His).

Standardligationspuffer (6 M Guanidin(Gn)-HCl, 100 mM NaH₂PO₄, pH 8.5, 2 % Benzolthiol, 37 °C, 1.5 Äquivalente des Glycopeptids im Verhältnis zum Peptidthioester) bei Konzentrationen von 10 mM zur Reaktion gebracht.^[24] Eine Analyse des Reaktionsgemisches nach 24 h zeigte, dass das gewünschte Verknüpfungsprodukt zusammen mit erheblichen Mengen an hydrolysiertem Peptidthioester und Glycopeptid mit hydrolysiertem Auxiliar entstanden war. Um die Nebenreaktionen zu minimieren, wurden veränderte Verknüpfungsbedingungen untersucht. Die Verwendung von Puffern mit niedrigerem pH-Wert (6.0–7.5) führte zu einer deutlich langsameren Verknüpfung.^[26] Aus diesem Grund fiel die Wahl auf ein Cosolvans bei einem höheren pH-Wert, um so die Hydrolyse des Startmaterials zu minimieren. Die wichtigste Voraussetzung – die Fähigkeit, ganze Glycoproteine zu lösen – erfüllte ein Gemisch von N-Methylpyrrolidon (NMP) und Guanidin/HEPES-Puffer (4:1 v/v NMP:6 M Gn-HCl/1 M HEPES, 2 % Benzolthiol, pH 8.5), mit dem Ribonuclease A bei einer Konzentration von 5 mM eine klare Lösung bildete. Die Verknüpfung von Glycopeptid **3** und Peptidthioester **4** unter diesen Reaktionsbedingungen ergab das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 84 % nach einer Reaktionszeit von 60 h (Schema 3). Diese Bedingungen verhinderten sowohl die Hydrolyse des Thioesters als auch die des estergebundenen Thiolauxiliars.

Der nächste Schritt war die Entfernung des Thiols vom Zucker. Zu diesem Zweck wurde das Verknüpfungsprodukt **5** in einer wässrigen Lösung von Dithiothreitol (DTT, 60 mM) mit 5 % Hydrazin gelöst. Schema 3b zeigt die HPLC-Spur des Startmaterials **5** (16.9 min, Spur A, Peak 1). Nach 30 min wurde ein neuer Peak beobachtet (15.7 min, Spur B, Peak 2), der laut massenspektrometrischer Untersuchung dem auxiliarfreien Verknüpfungsprodukt **6** entsprach (Schema 3d). Der kleine Peak 3 stammt nicht von verbliebenem Verknüpfungsprodukt **5**, sondern ist dem DTT/Hydrazin-Gemisch zuzuordnen (Spur C). Diese Untersuchung belegte, dass die Hydrazinolyse des Auxiliars eine Peak-zu-Peak-Umsetzung ist, und das auxiliarfreie Glycopeptid konnte in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

Um zu untersuchen, inwieweit die Verknüpfungsreaktion weitere Thiolfunktion toleriert, wurde ein cysteinhaltiges Glycopeptid mit N-terminalem Glycin mit einem Peptidthioester mit C-terminalem Glycin umgesetzt (Tabelle 1, Eintrag 2). Nach einer Reaktionszeit von 60 h wurde das



Schema 3. a) Zuckervermittelte Peptidligation der zweiten Generation zwischen Glycopeptid **3** und Peptidthioester **4** und anschließende Entfernung des Auxiliars ($R = (\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$). b) HPLC-Spuren der Entfernung des Auxiliars ($\lambda = 280 \text{ nm}$). Spur A: **5**, Spur B: Reaktionsgemisch von **5** in einer Lösung von DTT mit 5 % Hydrazin nach 30 min, Spur C: Lösung von DTT mit 5 % Hydrazin. c) MALDI-TOF-MS-Analyse von Peak 1 ($[\text{M}+\text{H}]^+ m/z 1446.6$, **5**). d) MALDI-TOF-MS-Analyse von Peak 2 ($[\text{M}+\text{H}]^+ m/z 1372.5$, **6**). Matrix: α -Cyan-4-hydroxyimtsäure.

Verknüpfungsprodukt in einer Ausbeute von 69 % isoliert. Diese Ausbeute ist etwas niedriger als im cysteinfreien Fall, dennoch belegt das Ergebnis, dass die zuckervermittelte Glycopeptidligation zusätzliche Thiolgruppen toleriert. Nach Entfernung des Auxiliars unter den in Schema 3 beschriebenen Bedingungen wurde das gewünschte cysteinhaltige Glycopeptid quantitativ erhalten.

Tabelle 1: SAL der zweiten Generation mit unterschiedlichen Aminosäuren an der Verknüpfungsstelle ($R = (\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$).

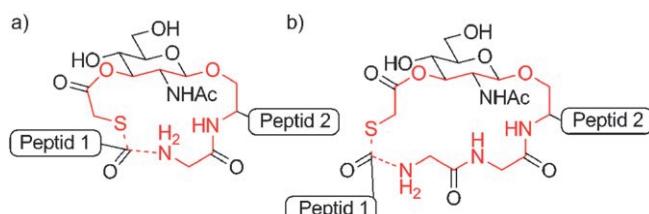


Nr.	Thioester AA ¹	Glycopeptid AA ² (AA ³)	Verknüpfungsstelle AA ¹ -AA ²	Ausb. [%]
1	Gly	Gly (Pro)	Gly-Gly	84 ^[a]
2	Gly	Gly (Cys)	Gly-Gly	69 ^[a]
3	His	Gly (Cys)	His-Gly	62 ^[a]
4	Ala	Gly (Cys)	Ala-Gly	28 ^[b]
5	Phe	Gly (Cys)	Phe-Gly	41 ^[b]
6	Gly	His (Cys)	Gly-His	28 ^[b]
7	His	His (Cys)	His-His	27 ^[b]
8	Ala	His (Cys)	Ala-His	40 ^[b]
9	Tyr	His (Cys)	Tyr-His	32 ^[b]
10	Gly	Asp (Cys)	Gly-Asp	38 ^[b]
11	His	Asp (Cys)	His-Asp	22 ^[b]
12	Ala	Asp (Cys)	Ala-Asp	59 ^[b]
13	Tyr	Asp (Cys)	Tyr-Asp	40 ^[b]

[a] Nach 60 h Reaktionszeit. [b] Nach 4 d Reaktionszeit.

Um den Einfluss anderer Aminosäuren an der Verknüpfungsstelle zu untersuchen, wurden die in den Einträgen 3–13 in Tabelle 1 aufgeführten Glycopeptid-Peptidthioester-Paare den Reaktionsbedingungen ausgesetzt. Die höchsten Ausbeuten wurden erhalten, wenn das Glycopeptid ein N-terminal Glycin trägt (Tabelle 1, Einträge 1–5). Auch das Glycopeptid mit N-terminal gebundener Asparaginsäure lieferte sehr gute Ausbeuten (Tabelle 1, Einträge 10–13), besonders in Kombination mit sterisch gehinderten Peptidthioestern wie Alanin (59 % Ausbeute, Eintrag 12). Histidin am N-Terminus des Glycopeptids führte zu Ausbeuten zwischen 27 und 40 % (Tabelle 1, Einträge 6–9). Die Entfernung des Auxiliars wurde in allen Fällen der Beschreibung von Schema 3 folgend durchgeführt, und die nativen Glycopeptide wurden jeweils in Ausbeuten über 95 % erhalten (siehe Hintergrundinformationen).

Bei genauerer Untersuchung einer großen Zahl an Glycoproteinsequenzen wurde deutlich, dass viele Glycoproteine sterisch gehinderte Aminosäuren N-terminal zur zuckerbundenen Aminosäure aufweisen. Wie auch für die NCL und die cysteinfreie NCL stellen diese sterisch anspruchsvollen Reste, besonders Valin, Leucin, Isoleucin und Prolin, für die SAL der zweiten Generation schwierig zur Reaktion zu bringende Verknüpfungsstellen dar. Um dieses Problem zu umgehen, bestand unser Konzept darin, das Glycopeptid um eine Aminosäure zu verlängern. Der erste Schritt einer Verknüpfungsreaktion mit einem solchen verlängerten Glycopeptid – die Umesterung – wäre identisch zum in Schema 1 beschriebenen Mechanismus. Der anschließende intramolekulare S→N-Acyltransfer hingegen würde keinen 15-gliedrigen – wie im Fall der SAL der zweiten Generation (Schema 4a) –, sondern vielmehr einen 18-gliedrigen Über-



Schema 4. Vorgeschlagene Übergangszustände bei a) der SAL der zweiten Generation (15-gliedriger Übergangszustand) und b) der erweiterten SAL der zweiten Generation (18-gliedriger Übergangszustand).

gangszustand durchlaufen (Schema 4b). Einige Fälle von S→N-Acyltransfers mit Übergangszuständen vergleichbarer Größe wurden bereits beschrieben,^[27,28] sodass uns diese Strategie erfolgversprechend schien.

Die in Tabelle 2 gezeigten Glycopeptide wurden analog wie in Schema 2 beschrieben synthetisiert. Die Verknüpfungsreaktionen wurden unter den Cosolvans-Bedingungen wie oben beschrieben ausgeführt und liefen in allen getesteten Fällen sehr effizient ab. Glycopeptide mit der Aminosäure Glycin am N-Terminus reagierten in guten Ausbeuten (48–68 %, Tabelle 2, Einträge 1–7), auch wenn sterisch gehinderte Peptidthioester als Reaktionspartner verwendet

Tabelle 2: Erweiterte SAL der zweiten Generation mit verschiedenen Aminosäuren an der Verknüpfungsstelle ($R = (\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$).

Nr.	Thioester AA ¹	Glycopeptid AA ² (AA ³)	Verknüpfungsstelle AA ¹ -AA ²	Ausb. [%]
1	Gly	Gly (Pro)	Gly-Gly	68 ^[a]
2	Ala	Gly (Pro)	Ala-Gly	65 ^[b]
3	His	Gly (Pro)	His-Gly	58 ^[b]
4	Gly	Gly (Cys)	Gly-Gly	66 ^[c]
5	Ala	Gly (Cys)	Ala-Gly	48 ^[b]
6	His	Gly (Cys)	His-Gly	60 ^[d]
7	Tyr	Gly (Cys)	Tyr-Gly	45 ^[b]
8	Gly	His (Cys)	Gly-His	55 ^[e]
9	Ala	His (Cys)	Ala-His	23 ^[b]
10	His	His (Cys)	His-His	40 ^[b]
11	Tyr	His (Cys)	Tyr-His	39 ^[b]
12	Gly	Asp (Cys)	Gly-Asp	81 ^[c]
13	Ala	Asp (Cys)	Ala-Asp	50 ^[f]
14	His	Asp (Cys)	His-Asp	60 ^[f]
15	Tyr	Asp (Cys)	Tyr-Asp	37 ^[f]

[a] 12 h Reaktionszeit. [b] 4 d Reaktionszeit. [c] 24 h Reaktionszeit. [d] 36 h Reaktionszeit. [e] 56 h Reaktionszeit. [f] 3 d Reaktionszeit.

wurden (Tabelle 2, Einträge 2, 5 und 7). Auch hier stellte das Vorliegen von Cystein in der Aminosäuresequenz der Reaktionspartner kein Problem dar. Glycopeptide mit N-terminaler Asparaginsäure reagierten ebenfalls in befriedigenden Ausbeuten (Tabelle 2, Einträge 12–15), wohingegen die Aminosäure Histidin, besonders in Kombination mit sterisch anspruchsvollen Thioestern, zu niedrigen Ausbeuten führte (Tabelle 2, Einträge 8–11). Um zu klären, ob auch nichtterminales Cystein eine Verknüpfungsreaktion im Sinne eines NCL-Mechanismus ermöglichen kann, wurde das Auxiliar eines Glycopeptids (verwendet in Einträgen 4–7) entfernt und das Produkt zusammen mit einem Glycinpeptidthioester den Reaktionsbedingungen ausgesetzt. Interessanterweise war eine Hintergrundreaktion zu beobachten, deren detaillierte Untersuchung noch aussteht.

Die erweiterte Glycopeptidverknüpfung schien effektiver zu sein als die ursprüngliche SAL und die SAL der zweiten Generation. Um einen genaueren Eindruck von den relativen Geschwindigkeiten der drei Methoden zu erhalten, wurden die Reaktionskinetiken durch Analyse von Teilproben der Reaktionsgemische von **7**, **8** und **3** mit Glycinpeptidthioester **4** über 24 h untersucht (Abbildung 1). Die SAL der zweiten Generation benötigte etwa 24 h, um eine Ausbeute von 50 % zu erreichen. Die gleiche Ausbeute wurde nach nur 12 h erhalten, wenn Glycopeptid **8** verwendet wurde (erweiterte SAL der zweiten Generation). Die ursprüngliche SAL ergab nach nur 9 h eine Ausbeute von 50 %, ist also schneller als die SAL der zweiten Generation und die erweiterte Variante.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchten wir, ob weitere N-terminale Erweiterungen des Glycopeptids möglich sind. Hierzu wurden vier Glycopeptide mit bis zu fünf Aminosäuren N-terminal zum zuckergebundenen Serin synthetisiert (Tabelle 3) und den üblichen Cosolvens-Bedingun-

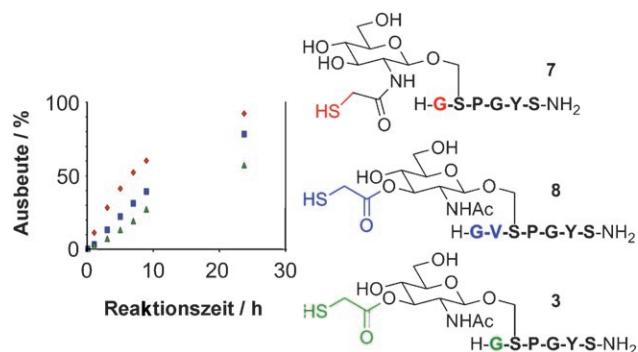


Abbildung 1: Reaktionsverlauf der SAL (7), der erweiterten SAL der zweiten Generation (8) und der SAL der zweiten Generation (3).

gen ausgesetzt. Verknüpfungsreaktionen würden in diesen Fällen 21- bis 28-gliedrige Übergangszustände im S→N-Acyltransfer durchlaufen. Die gewünschten Verknüpfungs-

Tabelle 3: Erweiterte SAL der zweiten Generation mit mehreren Aminosäuren am N-Terminus ($R = (\text{CH}_2)_2\text{CONH}_2$).

Nr.	Thioester AA	Glycopeptid XX _n	Verknüpfungsstelle AA-Gly	Ausb. [%]
1	Gly	Val Leu	Gly-Gly	62 ^[a]
2	His	Val Leu	His-Gly	81 ^[b]
3	Gly	Gly Val Leu	Gly-Gly	56 ^[a]
4	Gly	Gly Gly Val Leu	Gly-Gly	52 ^[c]

[a] 24 h Reaktionszeit. [b] 36 h Reaktionszeit. [c] 42 h Reaktionszeit.

produkte wurden in Ausbeuten von 52 bis 81 % isoliert. Dieses Ergebnis erweitert das Syntheserepertoire zum Aufbau von Glycopeptiden und möglicherweise Glycoproteinen. Mit der erweiterten SAL der zweiten Generation könnte es einfach möglich sein, eine Glycoproteinsequenz in N-terminaler Richtung vom Zucker aus zu untersuchen, bis eine geeignete Verknüpfungsstelle gefunden ist.

Zusammenfassend haben wir eine wirkungsvolle Methode für den Aufbau cysteinhaltiger und cysteinfreier Glycopeptide vorgestellt: die zuckervermittelte Glycopeptidligation der zweiten Generation. Mit der Möglichkeit, das Peptidrückgrat des zu synthetisierenden Glycoproteins in N-terminaler Richtung vom glycosylierten Serin aus nach günstigen Verknüpfungsstellen „abzutasten“, könnte eine große Zahl an Glycopeptiden zugänglich werden. Die Verknüpfungsreaktionen und die Bedingungen für die Entfernung des Auxiliars sind chemoselektiv, daher ist ein Schützen des Peptidrückgrats nicht nötig. Die Methode könnte Anwendung in der chemischen Totalsynthese finden und bietet sich außerdem für die Semisynthese sehr großer Glycoproteine an. In diesem Szenario würde man große Peptidthioester mithilfe der Intein-Technik exprimieren und in der SAL der zweiten Generation einsetzen. Ausgehend vom Brückenkopf-

Glucosamin sollten durch enzymatischen Transfer auch komplexe Glycane aufgebaut werden können.

Eingegangen am 6. Februar 2007
Online veröffentlicht am 2. Juli 2007

Stichwörter: Acyltransfer · Auxiliare · Glycopeptide · Kohlenhydrate · Ligation

-
- [1] R. G. Spiro, *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R–56R.
 - [2] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 4–8.
 - [3] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
 - [4] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
 - [5] L. H. Miller, M. F. Good, G. Milon, *Science* **1994**, *264*, 1878–1883.
 - [6] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 477–488.
 - [7] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–601.
 - [8] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58–68.
 - [9] L. Liu, C. S. Bennett, C. H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 21–33.
 - [10] A. Brik, S. Ficht, C. H. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 638–644.
 - [11] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129–149.
 - [12] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
 - [13] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
 - [14] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684–11689.
 - [15] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677–1681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650–1654.
 - [16] L. A. Marcaurelle, L. S. Mizoue, J. Wilken, L. Oldham, S. B. H. Kent, T. M. Handel, C. R. Bertozzi, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1129–1132.
 - [17] C. P. R. Hackenberger, C. T. Friel, S. E. Radford, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12882–12889.
 - [18] Kürzlich wurde berichtet, dass auch Thiolseitenketten in Gegenwart von anderen (Acm-geschützten) Cysteinen entschweift werden können, wobei die Aminosäure Alanin entsteht. Damit wird die Notwendigkeit für Cystein am N-Terminus relativiert, auch Alanin ist somit möglich: B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687–690.
 - [19] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642–4646.
 - [20] D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554–6559.
 - [21] D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4659–4662.
 - [22] B. Wu, J. H. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. H. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4222–4231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116–4125.
 - [23] A. Brik, S. Ficht, Y. Y. Yang, C. S. Bennett, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15026–15033.
 - [24] A. Brik, Y. Y. Yang, S. Ficht, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5626–5627.
 - [25] L. C. Hsieh-Wilson, *Nature* **2007**, *445*, 31–33.
 - [26] C. Dose, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 59–65.
 - [27] S. Sasaki, M. Shionoya, K. Koga, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3371–3372.
 - [28] C. Gennari, F. Molinari, U. Piarulli, M. Bartoletti, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7289–7300.
-