

Linearer Aufbau eines reinen Glykoenzym

Benjamin G. Davis*

Kohlenhydrate · Native chemische Ligation

Posttranslationale Modifikation (PTM),^[1] also die Veränderung eines Proteins nach dessen Biosynthese, häufig sogar erst nach dessen Faltung, betrifft typischerweise die funktionellen Gruppen der Seitenketten. Dennoch ist PTM mit den Vorgängen der Transkription und Translation nicht vergleichbar; es handelt sich um einen von Matrizen unabhängigen Prozess, der häufig unvorhersehbar verläuft und komplexe Mischungen posttranslational modifizierter Proteine erzeugt, die zum Teil unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Derartige Mischungen erschweren ein vollständiges Verständnis der biologisch gewonnenen PTM-Produkte und ihrer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Eine mögliche Lösung für dieses Problem bietet der chemische Aufbau.^[2]

Glykosylierung, die bei Weitem vielfältigste Modifikation, tritt sowohl posttranslational als auch cotranslational auf. Schätzungen zufolge liegen um 70 % aller Oberflächenproteine humaner Zellen glykosyliert vor, wobei die Funktion der Glykosylreste in vielen Fällen ungeklärt ist. Aus diesem Grund wurde die Herstellung reiner Glykoproteine^[3,4] bereits als eine der großen Herausforderungen der organischen Synthese charakterisiert.^[5]

Die Herstellung modifizierter Proteine, z.B. Glykoproteine, kann auf der Grundlage retrosynthetischer Bindungsbrüche und -knüpfungen prinzipiell in drei Strategien eingeteilt werden (A–C in Schema 1).^[3] Modus C beschreibt die Veränderung einer existierenden Modifikation, was häufig ortsspezifisch durch selektive Biokatalysatoren erzielt wird. Allerdings ist die Methode per Definition von einer bereits existierenden Modifikation an einem bekannten Ort abhän-

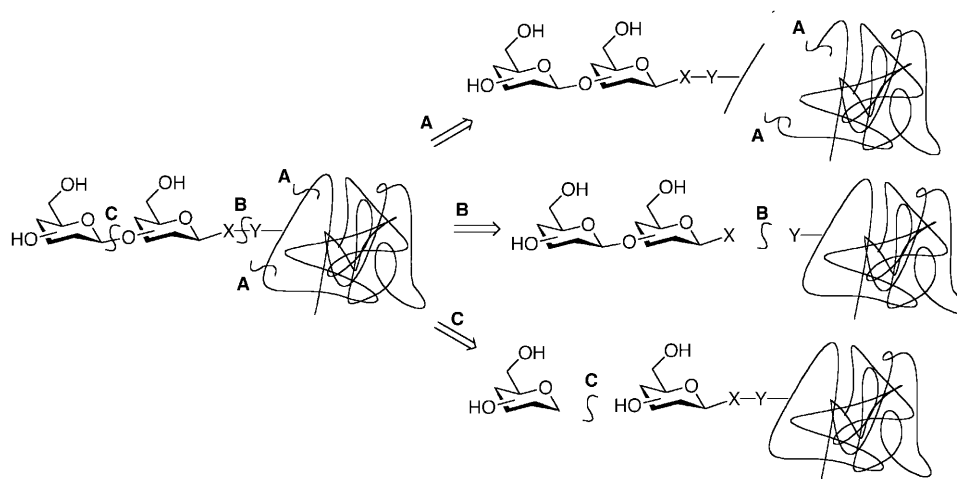


Abbildung 1. Strategien zur Glykoproteinsynthese.

gig, weshalb sie häufig als Glykoprotein-Remodellierung („glycoprotein remodeling“) bezeichnet wird.

Modus B, die ortsspezifische konvergente Einführung einer Modifikation, verwendet typischerweise ein bereits gefaltetes Proteingerüst, das häufig mithilfe eines einfachen Expressionssystems wie *E. coli* gewonnen wird. Hierbei können sogar komplexere, eigens synthetisierte Modifikationen eingeführt werden. Modus A stellt eine alternative Strategie dar und beschreibt den linearen Einbau modifizierter Aminosäuren oder Peptide in eine wachsende Peptidkette. Theoretisch entspricht dies beispielsweise der Verwendung eines modifizierten (glykosylierten) Aminosäurebausteins bei der Festphasensynthese von Peptiden (solid-phase peptide synthesis, SPPS). Jedoch erweist sich die Festphasensynthese außer für die kleinsten Proteine als unzureichend, weil auf diese Weise nur Peptide mit einer Länge von typischerweise < 50–100 Aminosäuren zugänglich sind. Die Methode ist eher geeignet, um „Glykopeptidfragmente“ von Proteinen bereitzustellen.^[3,6]

Die lineare Kupplung solcher Glykopeptidfragmente würde Kettenlängen ermöglichen, die denen natürlicher Glykoproteine nahe kämen. Eine Methode für einen solchen linearen Zusammenbau nach Modus A, die native chemische Ligation (NCL), stellt ein leistungsfähiges Verfahren für derartige Glykoproteinkupplungen dar.^[7–12] Dieser Prozess, der an anderer Stelle hervorragend zusammengefasst wurde,^[13–16] umfasst typischerweise die chemoselektive Reaktion

[*] Prof. B. G. Davis
Department of Chemistry, University of Oxford
Chemistry Research Laboratory
Mansfield Road, Oxford, OX1 3TA (Großbritannien)
Fax: (+44) 1865-28-5002
E-Mail: ben.davis@chem.ox.ac.uk

des N-terminalen Cysteinrests eines Peptids mit dem C-terminalen Thioester eines anderen.

Prinzipiell verläuft die Ligation durch eine Thio-Umes-terung, gefolgt von einer spontanen und im Wesentlichen irreversiblen S→N-Acylübertragung zur Bildung einer nativen Peptidbindung. Diese Methode der Proteinsynthese beruht auf Beobachtungen, die Wieland et al.^[17] bereits in den 1950er Jahren gemacht hatten, sie wurde jedoch erst in den 1990er Jahren von Kent und Mitarbeitern eingeführt und seither auf ihren Nutzen hin optimiert.^[10] Die Tatsache, dass NCL in wässriger Umgebung ausgeführt werden kann und keine Schutzgruppen erfordert, führte zu einer wachsenden Anwendung bei der Synthese größerer Glykopeptide und Glykoproteine, für die einige beeindruckende Beispiele veröffentlicht wurden.

Die NCL-Strategie wurde im Besonderen durch eine Variante verbessert, die als Ligation exprimierter Proteine („expressed protein ligation“, EPL) bezeichnet wird^[14] und bereits beim Einbau von Cysteinresten am C- oder N-Terminus bakteriell exprimierter Proteine Verwendung fand.^[14,18,19] Sie kann zur Synthese von Peptidthioestern (aus dem beim Intein-Spleißen gebildeten Cysteinseitenketten-Thioester) oder von Peptiden mit N-terminalen Cysteinresten, die als Komponenten für die NCL nötig sind, durch ein Expressionssystem verwendet werden. Ökonomischer als die Standardmethoden der SPPS eröffnet die EPL somit einen einfachen Zugang zu größeren Proteingerüsten. Als anschauliches Beispiel wurde schon früh die Sequenz des Mannan-bindenden Proteins (MBP) in Fusion mit dem N-Terminus des Inteins aus dem mutierten VMA-Gen von *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli* exprimiert. Das mithilfe dieses Fusionskonstrukts erzeugte Protein enthält zudem eine Chitin-Bindedomäne zur einfachen Aufreinigung. Das Selbstspleißen des Inteinabschnitts aus der Bindedomäne nach der Expression ermöglichte die NCL des resultierenden Peptidthioesters an kurze Acylakzeptorpeptide mit zwei bis drei Aminosäuren, z.B. Cys-Asn(GlcNAcβ).^[20] Derartige Inteine sind heutzutage umfassend anwendbar und verfügbar, sodass käufliche Expressionsvektoren und Systeme („Kits“, z.B. IMPAC-System) von zahlreichen Arbeitsgruppen eingesetzt werden. Beispielsweise verwendeten Imperiali, Hackenberger und Mitarbeiter ein Intein-System bei der Synthese des Immunoproteins Im7.^[21]

In einem wichtigen Beispiel nutzten Macmillan und Ber- tozzi die EPL zur Konstruktion dreier definierter Modell- glykoproteine für GlyCAM-1 (132 Aminosäuren) und demon- strierten somit die erste modulare Synthese biologisch relevanter Glykoproteine.^[22] Das mucinähnliche Glykoprotein GlyCAM-1 dient als Ligand bei der Leukozyten-Auf- nahme („homing“) und besteht aus zwei flankierenden Mu- cindomänen an einer nichtglykosylierten Kerndomäne. Im Rahmen dieser Arbeit wurden semisynthetische Varianten des Proteins erhalten, die die glykosylierte N-terminale Do- mäne (1), die glykosylierte C-terminale Domäne (2) oder beide Domänen in glykosylierter Form (3) aufwiesen. Die N- terminale glykosylierte Domäne (1) wurde durch NCL eines glykosylierten Thioesterpeptids und GlyCAM-1 (Aminosäuren 41–132) erhalten, das wiederum in einem IMPACT-CN- Inteininfusionsvektor exprimiert worden war. GlyCAM-1 41–

132 mit dem N-terminalen Cysteinrest wurde als Intein/Chi- tinbindedomäne-Fusionsprotein exprimiert, an chitinmodifi- zierten Kügelchen aufgereinigt und anschließend unter Ver- wendung von Faktor-Xa-Protease von seiner C-terminalen Intein/Chitinbindedomäne abgetrennt. Die C-terminal gly- kosylierte Domäne (2) erforderte eine im Vergleich zur N- terminalen Glykoform (1) umgekehrte Synthesestrategie, die von einem bakteriell erzeugten Thioester (GlyCAM-1 1– 77)^[22] und einem synthetischen N-terminalen Cystein-Gly- kopeptid (78–132) ausging, das durch SPPS und NCL erzeugt wurde. Die noch fehlende N- und C-terminal glykosylierte Variante (3) wurde aus dem erwähnten Glykopeptid 78–132 konstruiert und unter Verwendung einer kleinen Menge an 2- Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) mit einer bakteriell exprimierten Kerneinheit (C41-S77) verknüpft. Das resul- tierende Intermediat wurde anschließend auf ähnliche Weise wie im Fall der N-terminal glykosylierten Domäne (1) mit Faktor Xa ligiert, wobei die N- und C-terminal glykosylierte Glykoform (3) nicht weniger als 13 N-Acetylglucosamine an vorherbestimmten Positionen aufwies.^[23]

In zwei kürzlich erschienenen Arbeiten beschrieben nun Unverzagt und Mitarbeiter Fortschritte bei der leistungsfä- higen Synthese einer einzelnen Glykoform eines Enzyms.^[40,41] Man wählte ein exzellentes Modellsystem zur Demonstration der Strategie aus. Ribonuclease (RNase) ist ein Protein aus 124 Aminosäureresten, dessen Aktivität in einer einzelnen N- Glykosylierung an Asn34 begründet ist. Daher gilt RNase als Musterbeispiel für die Funktion von Glykoproteinen. In einer Arbeit von Rudd, Dwek et al. aus dem Jahr 1994^[24] wurde RNase-B, eine glykosylierte Form (Glykoform) von RNase, als Modell verwendet, um die Effekte der Glykosylierung auf die Funktion eines Proteingerüsts zu analysieren. Es gelang ihnen, verschiedene Glykoformen von RNase-B durch Kapil- larelektrophorese zu trennen; dabei zeigte sich, dass unter- schiedliche Zucker bei identischer Primärsequenz zu verän- derten Hydrolyseaktivitäten führten. In Anbetracht der vier im Protein enthaltenen Disulfidbrücken wurde RNase eben- falls häufig für detaillierte Untersuchungen zum Disulfid- „Scrambling“ verwendet sowie zur Entwicklung von Strate- gien für die enzymgestützte Peptidligation (auch glykosy- lierter Varianten)^[25] und Enzym-Remodellierung.^[26]

Das glykosylierte Fragment 30–68 von RNase wurde zu- vor erfolgreich von Unverzagt und Mitarbeitern unter Ver- wendung von SPPS- und NCL-Methoden hergestellt. Es handelte sich dabei um die erste Synthese eines Peptids mit komplexem N-Glykosyl-Substituenten durch NCL.^[27] Ein Fmoc-geschützter Asparaginrest, der mit einem ungeschütz- ten biantennären Heptasaccharid glykosyliert vorlag, wurde mithilfe von 1-Benzotriazolyl-oxy-tris(pyrrolidino)phospho- nium (PyBOP) in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in einen Pentapeptid-Linker eingeführt, der über einen „Safety-catch“/Rink-Amid-Doppellinker an die Fest- phase gebunden war.^[28] Die Aktivierung des Glykosylaspa- ragins erzielte in situ die höchsten Kupplungsausbeuten, und freie Hydroxygruppen konnten ohne Aktivierung des „Saf- ety-catch“-Linkers geschützt werden. Das so entstandene Glykopeptid wurde mit SPPS weiter verlängert, bevor der „Safety-catch“-Linker durch Behandlung mit Natriumthio- phenolat gespalten und der resultierende Thioester mit NCL

an das Proteinfragment RNase 40–68 gekuppelt wurde. Die neuartige Linkerkonstruktion ermöglichte eine schnelle LC-MS-Analyse nach saurer Spaltung des Rink-Amid-Linkers, sodass die zweistufige Spaltungsreaktion, die sonst bei SPPS häufig erforderlich war, vermieden werden konnte.

Zur Erzeugung der Peptide mit N-terminalen Cysteinen (als Acyl-Akzeptoren für die NCL) sind diverse Wege gängig, z.B. die Verwendung von TEV-Protease,^[29] Bromcyan^[30] oder Faktor Xa,^[23] der in der RNase-Synthese von Unverzagt verwendete Inteinansatz ist dagegen selten anzutreffen. Das käufliche IMPACT-System wurde auch in dieser Arbeit verwendet, wobei eine Expression in *E. coli*, wie häufig der Fall, zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate führte. Wegen der intrazellulären Präzipitation von vermutlich fehlgefaltetem Protein war das Intein nicht zur Selbstspaltung in der Lage. Eine Lösung für dieses Problem bietet die Resolubilisierung mit Denaturierungsreagentien wie Guanidinhydrochlorid, um nach anschließender Verdünnung das lösliche, umgefaltete Proteins zu erhalten. Nach einigen Versuchen mit dieser etablierten Methode griffen Unverzagt et al. zu einem neuartigen Ansatz, der besonders für thiolreiche Proteine nützlich sein könnte. Sie verwendeten ein Carboxyethylmethanthiosulfonat (MTS)-Reagens,^[31] um die sieben Thiolgruppen des Proteinfragments unter den Bedingungen von Resolubilisierung und Umfaltung effektiv als gemischte Disulfide zu schützen. Die Intein-Aspartamid-Gruppe erwies sich weiterhin als aktiv und erzielte hervorragende Ausbeuten an abgespaltenem disulfidmodifiziertem RNase-Fragment. Hierbei war die Verwendung von MTS-Reagentien zur Bildung disulfidgeschützter Produkte allen anderen Methoden überlegen.

Die disulfidgeschützten Fragmente von RNase erwiesen sich anschließend in der Synthese weiterer bemerkenswerter RNase-Varianten durch die Arbeitsgruppe Unverzagt als überaus wertvoll. Zunächst ermöglichte die durch Thiophenol beschleunigte NCL des disulfidgeschützten Fragments mit dem auf dem Inteinweg gewonnenen Thioester RNase 1–39 binnen zwei Tagen einen Zugang zur vollständigen RNase (nach Entschützung mit 1,4-Dithiothreitol). Interessanterweise konnten die Ausbeuten durch die Verwendung eines Handschuhkastens (< 10 ppm Sauerstoff) verbessert werden. (Vermutlich wird die Bildung unlöslicher Nebenprodukte mit falscher Disulfidverknüpfung vermieden.) Die nachfolgende Umfaltung in Gegenwart eines Gluthation-Redoxpaares führte zu den gewünschten RNasen.

Mit dem so entwickelten Zugang zu einer nichtmodifizierten kompletten RNase und der Erfahrung bei der Herstellung kleiner glykosylierter Fragmente 30–68 des Proteins^[27] verfügte die Gruppe um Unverzagt über alle Voraussetzungen, um Glykoformen von kompletter RNase anzustreben. Pragmatisch wurde ein Zielmolekül mit einem bi-antennären Nonasaccharid ausgewählt. Solche komplexen Zucker sind einerseits bedeutsam für Säugetiere, andererseits kann der benötigte Baustein Gal₂GlcNAc₂Man₅GlcNAc₂-Asn, der aus neun Zuckern und einer Aminosäure besteht, durch Extraktion und Verdau von Eigelb im Milligramm-Maßstab gewonnen werden.^[32] Durch diesen natürlichen Zugang zu einem Glykoaminosäure-Baustein konnte ein Flaschenhals bei der Glykopeptid-/Glykoproteinsynthese

umgangen werden, denn chemische Totalsynthesen liefern üblicherweise nur geringere Mengen.

Die anfänglich verfolgte Strategie 1 (Schema 2) sah wie zuvor der Bruch an Cys40 in zwei Fragmente vor: ein disulfidgeschütztes Fragment und einen Thioester, in diesem Fall für eine glykosylierte RNase 1–39. Obwohl die Gruppe mit ihrem Doppellinker-PEGA-Harz^[27] bereits Erfolg bei der Präparation kleinerer Segmente mit Heptasacchariden gehabt hatte, konnte kein Fragment mit mehr als 20 Aminosäuren mit dem Nonasaccharid hergestellt werden. Hier zeigten sich die Schwierigkeiten, die schon mit Peptiden moderater Länge auftreten können, sobald diese Oligosaccharide enthalten. Dieser Misserfolg machte einen weiteren Bruch an Cys26 erforderlich, sodass in der modifizierten Strategie drei Fragmente sequenziell durch NCL zusammengefügt wurden: RNase 1–25 als Thioester für den N-Terminus, glykosylierte RNase 26–39 für den zentralen Abschnitt sowie das disulfidgeschützte Fragment 40–124 für den C-terminalen Abschnitt. Das Anfügen von mehr als einem Fragment mit NCL setzt die Schützung des N-Terminus (z. B. durch Thiazolidine) voraus, um eine Homokupplung des Thioesters zu vermeiden.

Allerdings konnte die Synthese des glykosylierten Zentralabschnitts am Doppellinker-System auch durch die Verwendung eines tierischen „Pseudoprolins“^[33] sowie durch Acetylierung zum Schutz der Hydroxygruppen des Glykans vereinfacht werden. Zudem wurden potenziell oxidationsanfällige Methionin-Seitenketten durch Norleucin ersetzt. Entschützung und Spaltung an der festen Phase ergaben den gewünschten Thiazolidin-geschützten Thioester. Der N-terminale Thioester 1–25 konnte ebenfalls unter Verwendung eines tierischen Pseudoprolins in angemessener Ausbeute gewonnen werden.

Nachdem alle benötigten Fragmente zugänglich waren, wandte man sich dem ersten Versuch einer Eintopfverfahrens zu. Kent und Bang^[34] hatten nahegelegt, dass dies einfach durch die Zugabe von Methoxyamin (zur Entschützung des Thiazolins) nach der Verknüpfung der beiden Fragmente erreicht werden kann, bevor der dritte Thioester zugegeben wird. Im vorliegenden Fall verfolgten Unverzagt et al. eine solche Strategie, die jedoch erwartungsgemäß an der Reaktion des guten Nucleophils Methoxyamin mit dem dritten Thioester (hier 1–25) scheiterte. Nach Entfernen des Thiazolidins im Handschuhkasten und Gelfiltration wurde folglich glykosylierte RNase 26–124, das Produkt aus den ersten beiden Fragmenten, isoliert. Die Ligation mit dem Thioester 1–25 ergab innerhalb eines Tages das vollständige Protein RNase 1–124 als einzelne Glykoform. Durch Umfaltung wurde wie zuvor nicht nur ein Protein erzeugt, dessen CD-Spektrum sich mit demjenigen der nativ gefalteten Struktur deckte, sondern im Wesentlichen auch ein hydrolytisch aktives Enzym (ca. 50 % der Aktivität von RNase A).

Es sei erwähnt, dass die Erweiterung der Methoden, die zur Synthese und Verknüpfung von Glykopeptiden durch NCL-Strategien verfügbar sind, vor kurzem zur ersten komplett chemischen Konstruktion anderer intakter kleiner Glykoproteine durch einen NCL-Zusammenbau nach Modus A geführt hat. Als Beispiele zu nennen sind der auf der konventionellen Kupplung von Thioestern und Cys-terminierten Peptiden beruhende Einbau eines vollständigen komplexen

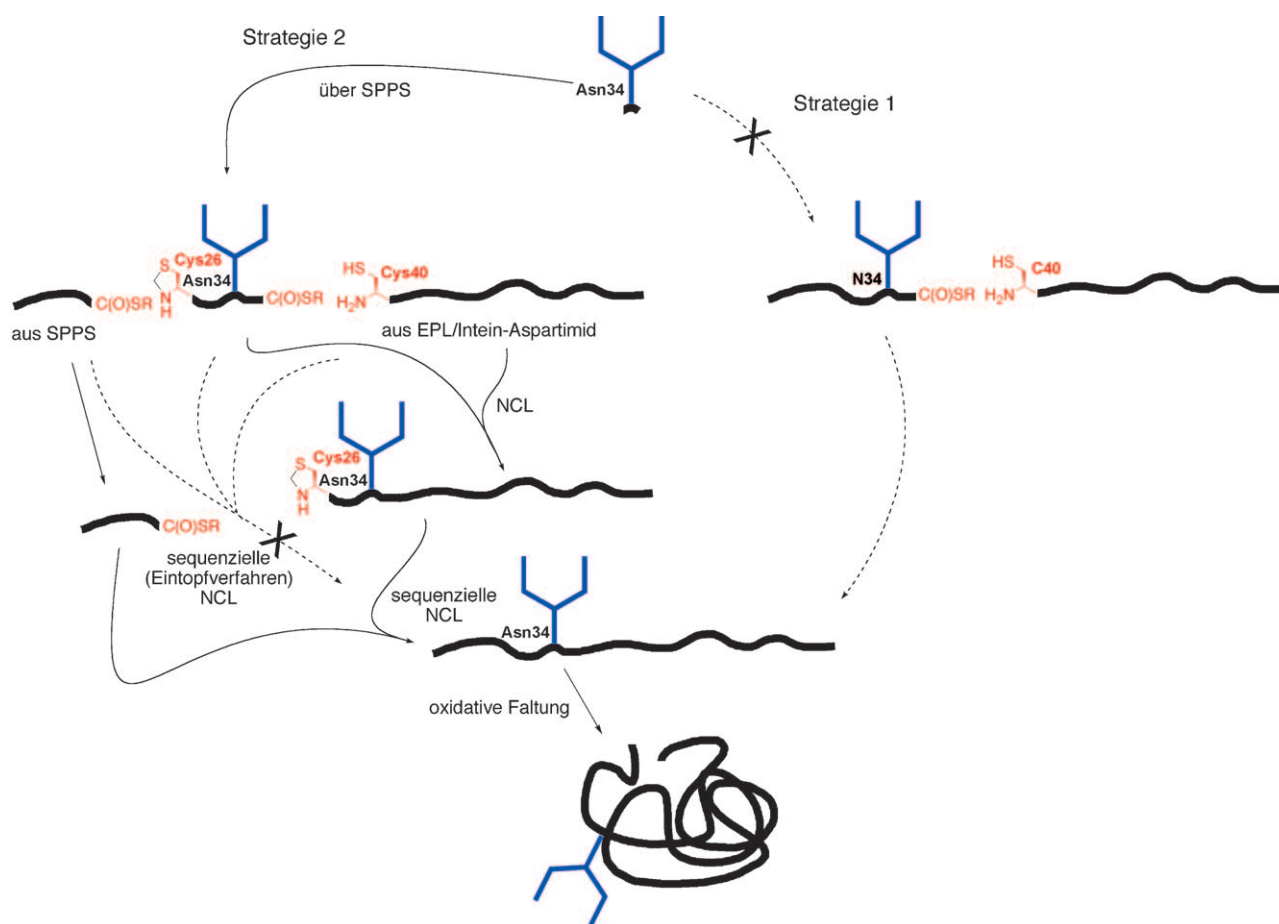


Abbildung 2. Erfolgreiche und vergebliche Strategien, die Unverzagt et al. bei der Synthese der reinen Glykoform eines Enzyms mithilfe von NCL verfolgten.

humanen Sialyloligosaccharids in das 76 Aminosäuren lange Glykoprotein MCP-3^[35] sowie die Synthese des 82 Aminosäuren langen Glykoproteins/Peptids Diptericin ϵ unter Verwendung zuckergestützter Ligationsmethoden.^[36] Zwar sind diese Beispiele durchaus beeindruckend, allerdings sind die aufgebauten Sequenzen kürzer als die hier beschriebene RNase und typische Glykoproteine. (Die Unterscheidung zwischen Protein und Peptid ist dabei eher eine Frage der Semantik.)

Nichtsdestotrotz stellt die erste Synthese eines aktiven glykosylierten Enzyms durch Unverzagt und seine Gruppe, die dabei eine NCL-Strategie nach Modus A verfolgten, für mich einen Meilenstein der Glykoproteinforschung dar. Entscheidend ist dabei, dass die zunehmende Verbreitung der NCL-Technik insofern richtungsweisend wirken kann, als sie die Proteinfunktion in den Mittelpunkt stellt. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für den Effekt von Glykosylierungen auf die Enzymaktivität sind bereits unter Verwendung von isolierten Proben^[24] und an nach dem Modus B hergestellten Glykoenzymen untersucht worden.^[37,38] Allerdings erforderten diese Ansätze entweder große Probenmengen und umfangreiche Aufreinigungsprotokolle, oder sie nahmen nichtnatürliche Peptidverknüpfungen innerhalb der Proteine in Kauf. Die Verwendung von NCL für die Herstellung synthetischer Proteine benötigt einiges an Expertise, da

Schwierigkeiten wie die anschließende Umfaltung^[39] von linearen Konstrukten zu einem aktiven Protein mit der richtigen Tertiärstruktur gelegentlich übergangen werden. Nichtsdestotrotz wird die NCL zunehmend als Synthesemethode für exakte Proteinkonstrukte wahrgenommen. Im vorliegenden Fall ermöglichte das enzymatische Modellsystem einen robusten und stringenten Funktionstest. Auch wenn die von Unverzagt hergestellten Varianten weiterhin nichtnatürliche Aminosäuren enthalten (Nle statt Met), zeigte die Synthese doch zum ersten Mal, wie eine realistischere Variante erzeugt werden könnte, die eine authentische N-Verknüpfung enthält (vom Asn-Amid zu Glykan).

Eingegangen am 21. Dezember 2008

Online veröffentlicht am 5. Mai 2009

- [1] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, Jr., *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7508; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7342.
- [2] B. G. Davis, *Science* **2004**, 303, 480.
- [3] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579.
- [4] D. P. Gamblin, E. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 131.
- [5] S. J. Danishefsky, Gordon Research Conference on Natural Products, **2005**.
- [6] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Glycobiology* **2006**, 16, 113R.

- [7] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4089; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985.
- [8] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [9] 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.
- [10] D. Macmillan, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7830; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7668.
- [11] D. S. Y. Yeo, R. Srinivasan, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4664.
- [12] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030.
- [13] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923.
- [14] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249.
- [15] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91.
- [16] Siehe Lit. [10].
- [17] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129.
- [18] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705.
- [19] R. David, M. P. O. Richter, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 663.
- [20] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421.
- [21] C. P. R. Hackenberger, C. T. Friel, S. E. Radford, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12882.
- [22] D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9515.
- [23] D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1355.
- [24] P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, *33*, 17.
- [25] K. Witte, P. Sears, R. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2114.
- [26] B. Li, H. Song, S. Hauser, L.-X. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3081.
- [27] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650.
- [28] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Koster, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645.
- [29] T. J. Tolbert, D. Franke, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 909.
- [30] D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9530.
- [31] R. Wynn, F. M. Richards, *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 351.
- [32] Y. Kajihara, Y. Suzuki, K. Sasaki, L. R. Juneja, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 44.
- [33] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mütter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218.
- [34] D. Bang, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2588; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534.
- [35] N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501.
- [36] Y.-Y. Yang, S. Ficht, A. Brik, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7690.
- [37] B. G. Davis, R. C. Lloyd, J. B. Jones, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1527.
- [38] R. C. Lloyd, B. G. Davis, J. B. Jones, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1537.
- [39] M. Basharov, *Biofizika* **2002**, *47*, 989.
- [40] C. Piontek, P. Ring, O. Harjes, C. Heinlein, S. Mezzato, N. Lombana, C. Pöhner, M. Püttner, D. Varón Silva, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1936.
- [41] C. Piontek, D. Varón Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941.