



Glycan-spezifisches metabolisches Oligosaccharid-Engineering von C7-substituierten Sialinsäuren**

Heinz Möller, Verena Böhrsch, Joachim Bentrop, Judith Bender, Stephan Hinderlich* und Christian P. R. Hackenberger*

Professor Werner Reutter zum 75. Geburtstag gewidmet

Die intakte und vollständige Glykosylierung sowohl von membranständigen als auch sekretierten Glycoproteinen ist ein wichtiger Aspekt der einwandfreien Funktion biologischer Systeme. Rekombinante Glycoproteine – z. B. Antikörper, Wachstumsfaktoren, Hormone, Impfstoffe und Kontrastmittel – spielen eine Schlüsselrolle in der medizinischen Anwendung.^[1] Durch das Einbringen chemisch modifizierter Monosaccharide in die Glykanenheiten können Eigenschaften von therapeutisch verabreichten Glycoproteinen effizient verbessert werden, ein Verfahren, das man als metabolisches Oligosaccharid-Engineering („metabolic oligosaccharide engineering“; MOE) bezeichnet.^[2] Das MOE hat neben der pharmazeutischen Anwendung auch die Diagnostik durch Lokalisierung und Visualisierung von Glykanen in lebenden Organismen vorangebracht.^[2]

Zum jetzigen Zeitpunkt ist bereits eine Vielzahl chemisch modifizierter Monosaccharide für das MOE entwickelt worden. Dabei sind Sialinsäuren und ihre metabolische Vorstufe *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) wegen ihrer terminalen Position in den Glykanstrukturen der Glycoproteine und ihrer Bedeutung für zelluläre Erkennungsprozesse als

Zielstrukturen für das MOE am weitesten verbreitet.^[3] Es wurden bereits mehrere ManNAc-Derivate mit modifizierten N-Acetyl-Seitenketten synthetisiert und über die Sialinsäurebiosynthese in entsprechende Sialinsäureanaloga metabolisch eingebracht (Abbildung 1). Dieser Ansatz hat zur Erweite-

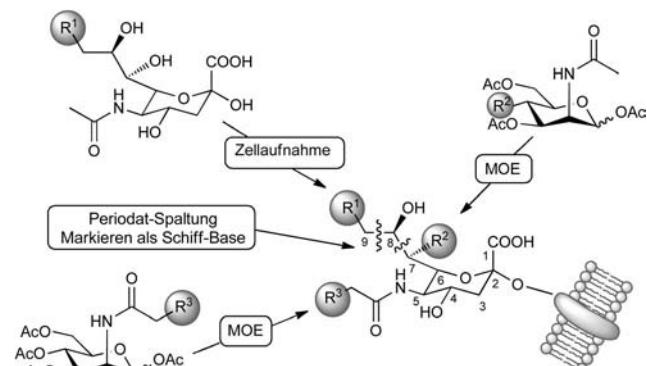


Abbildung 1. Methoden zur Strukturmodifizierung von glykangebundenen Sialinsäuren durch Anwendung von chemisch modifiziertem ManNAc oder direkter Periodat-Oxidation glykangebundener Sialinsäuren (links). Die spezifische Modifizierung der C7-Position wurde mit C4-modifiziertem ManNAc in dieser Studie erzielt (rechts; die Methoden wurden bislang einzeln angewendet, mit nur jeweils einer Modifikation eines einzelnen Sialinsäuremoleküls).

zung des Verständnisses der biologischen Funktion der N-Acyl-Seitenkette in Sialinsäuren, z. B. bei Virusinfektionen^[4] oder der neuronalen Differenzierung,^[5] beigetragen. Alternativ dazu wurden durch die direkte Anwendung synthetischer Sialinsäurederivate C9-Modifikationen von Sialosiden möglich.^[6] Zudem führte eine selektive Spaltung der Glykoleinheit zu gekappten, sialinsäuretragenden Glykanen mit einer Aldehydfunktion für Markierungsreaktionen (Abbildung 1).^[7] Alle diese Modifikationen betreffen die N- und die O-Glykosylierung in etwa gleichem Maße.

Wir haben nun untersucht, ob die Biosynthesemaschine der Sialinsäuren auch andere ManNAc-Derivate toleriert, die direkt am Kohlenhydrat-Sechsring modifiziert sind. Dabei schien die C4-Modifikation am attraktivsten, da sie in der zellulären Glycoproteinsynthese nicht enzymatisch modifiziert wird und bis dato unbekannte, C7-modifizierte, sialinsäurehaltige Glycoproteine liefern würde (Abbildung 1). Um die Anwendbarkeit in der Biosynthese zu testen, fassten wir in unserer Studie das C4-modifizierte ManNAc-Derivat *N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin (4-Azido-ManNAc, **1**)

[*] Dr. H. Möller,^[+] Prof. Dr. S. Hinderlich

Beuth Hochschule für Technik Berlin – University of Applied Sciences, Department of Life Sciences and Technology
Seestraße 64, 13347 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hinderlich@beuth-hochschule.de

Dr. V. Böhrsch,^[+] Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@chemie.fu-berlin.de

Dr. J. Bentrop, Dipl.-Chem. J. Bender
Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Zoologisches Institut,
Abteilung für Zell- und Neurobiologie
Haid-und-Neu-Straße 9, 76131 Karlsruhe (Deutschland)

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

[**] Diese Arbeit wurde gefördert durch den „Arbeitsgruppenwettbewerb Glykobiotechnologie“ des BMBF (S.H. und C.P.R.H.). Weitere finanzielle Unterstützung kam von der DFG (Emmy Noether HA 4468/2-1 und SFB 765 an C.P.R.H. und BA 1034/15-19 an Martin Bastmeyer und Jo.B.), der Boehringer-Ingelheim Stiftung (Plus-3-Programm an C.P.R.H.), dem FCI (an C.P.R.H.), dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (an S.H.) und dem Institut für Angewandte Forschung Berlin (an S.H.). V.B. ist Mitglied der Medizinischen Fakultät Charité der FU und HU Berlin.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (detaillierte Informationen über die verwendeten Materialien, die chemische Synthese der Verbindungen und die biochemischen Methoden) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108809> zu finden.

ins Auge, um nach der Glykosylierung die Möglichkeit der Ligation und Visualisierung über bioorthogonale Reaktionen zu erhalten.^[8]

N-Acetyl-(1,3,6-*O*-acetyl)-4-azido-4-desoxymannosamin ($\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$) wurde nach einer optimierten Literaturvorschrift hergestellt (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen),^[9] wobei die abschließende Peracetylierung die Membrangängigkeit zur metabolischen Aufnahme des Zuckers sicherstellte. Dann untersuchten wir, ob dieses synthetische Kohlenhydrat ein geeignetes Substrat für MOE von Zelloberflächen-Glykoproteinen in Säugerzellen darstellt. Wir verwendeten dafür HEK293-Zellen mit einem Mangel an UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (GNE), dem Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, um gesteigerte Einbauraten der ManNAc-Analoga im Vergleich mit GNE-exprimierenden Zellen sicherzustellen, wie bereits für *N*-acylierte ManNAc-Derivate gezeigt wurde.^[10] Wir inkubierten sowohl GNE-defiziente als auch GNE-exprimierende Zellen mit sowohl $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ als auch peracetyliertem *N*-Azidoacetylmannosamin (Ac_4ManNAz) und peracetyliertem ManNAc (Ac_4ManNAc , Abbildung 2a). Die isolierten Membranen wurden mit alkyliertem Biotin und AlexaFluor 488 in Kupfer-katalysierten Cycloadditionen (CuAAC) zur Reaktion gebracht, um die eingebauten Azidozucker zu markieren.^[11] Nach der Auftrennung der Proben über SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Azidoglykoproteine durch Fluoreszenzanalyse und Western-Blots mit einem spezifischen Biotin-antikörper detektiert (Abbildung 2b). Im Unterschied zu Zellen, welche mit Ac_4ManNAc behandelt wurden, oder zu mit Azidozucker behandelten, GNE-exprimierenden Zellen konnten in Membranfraktionen der mit $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ behandelten GNE-defizienten Zellen konzentrationsabhängige Signale detektiert werden, vergleichbar mit den Signalen der mit Ac_4ManNAz behandelten GNE-defizienten Zellen (Abbildung 2b). Diese Ergebnisse lieferten die ersten klaren Hinweise auf die Metabolisierung von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ durch zelluläre Enzyme und den tatsächlichen Einbau in Zelloberflächen-Glykoproteine, während die Azidogruppe für die bioorthogonale Reaktion mit Markierungsreagentien zugänglich blieb.

Der Verdau der Membranfraktionen GNE-defizienter Zellen mit Sialidase bei anschließender Reaktion mit Alki-

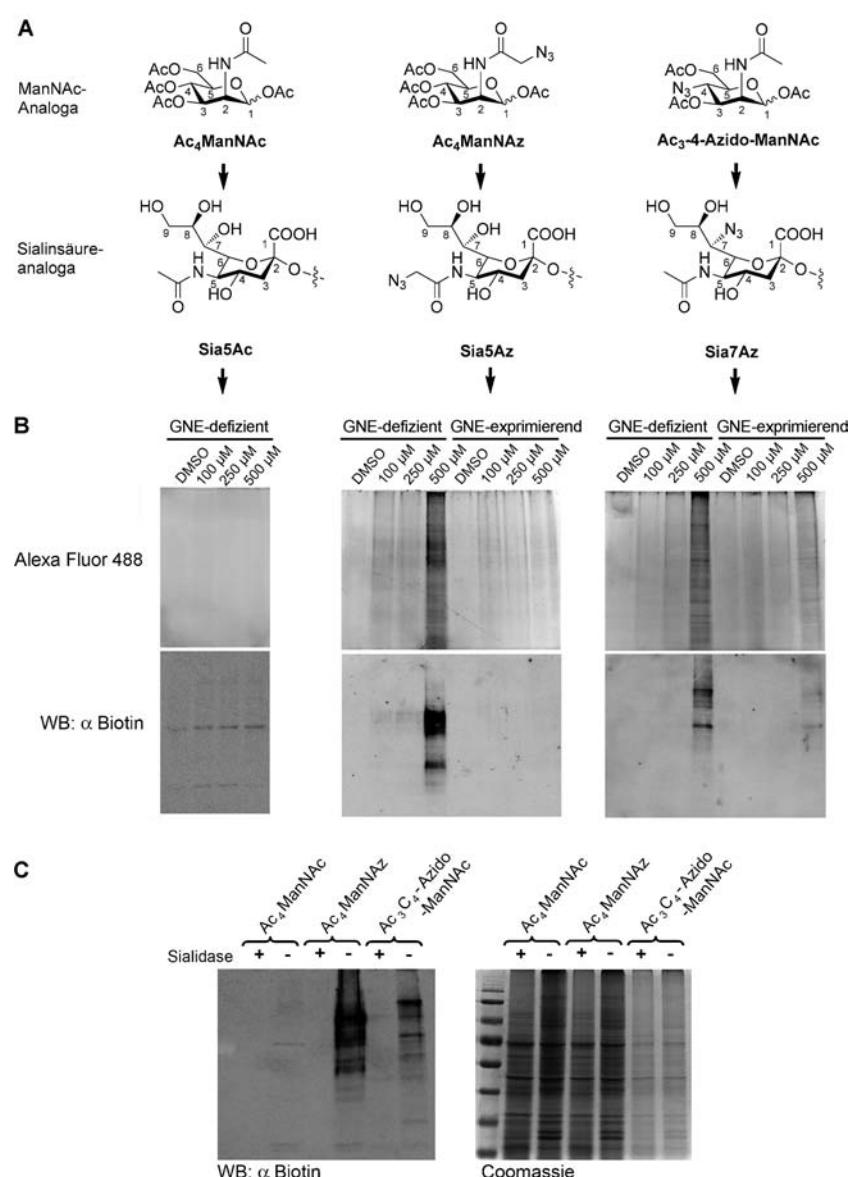


Abbildung 2. A) Der biosynthetische Einbau peracetylierter (Ac_3, Ac_4)-ManNAc-Derivate in die entsprechenden Glykokonjugat-gebundenen Sialinsäuren. B) Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ und $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$ in Zelloberflächen-Glykoproteine von HEK293-Zellen mit GNE-Mangel. Membranfraktionen der drei Tage mit Zucker behandelten Zellen wurden mit alkyliertem AlexaFluor 488 oder Biotin durch CuAAC zur Detektion eingebauter Sialinsäuren über Fluoreszenz- und Western-Blot-Analyse markiert. C) Western-Blot Analyse glykokonjugatgebundener Sialinsäurederivate durch Sialidase-Verdau der drei Tage mit 500- μM Lösungen der angegebenen ManNAc-Analoga behandelten Zellen. Für weitere Details siehe die Hintergrundinformationen.

nylbiotin, um verbleibende Azidosialinsäuren zu adressieren, ergab kein Signal im Western-Blot, was eine Umwandlung von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in die C7-modifizierte 7-Azido-7-desoxy-*N*-acetylneuraminsäure (Sia7Az) in Glykanen von Zelloberflächenproteinen bestätigt (Abbildung 2c). Zur Bestimmung der Einbauraten von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ analysierten wir die Membranfraktionen der mit Zuckern behandelten Zellen mithilfe von fluoreszenzbasiertem HPLC. Dafür wurden die hydrolytisch gespaltenen Sialinsäuren mit 1,2-Diamino-4,5-methylenoxybenzol (DMB) markiert und im

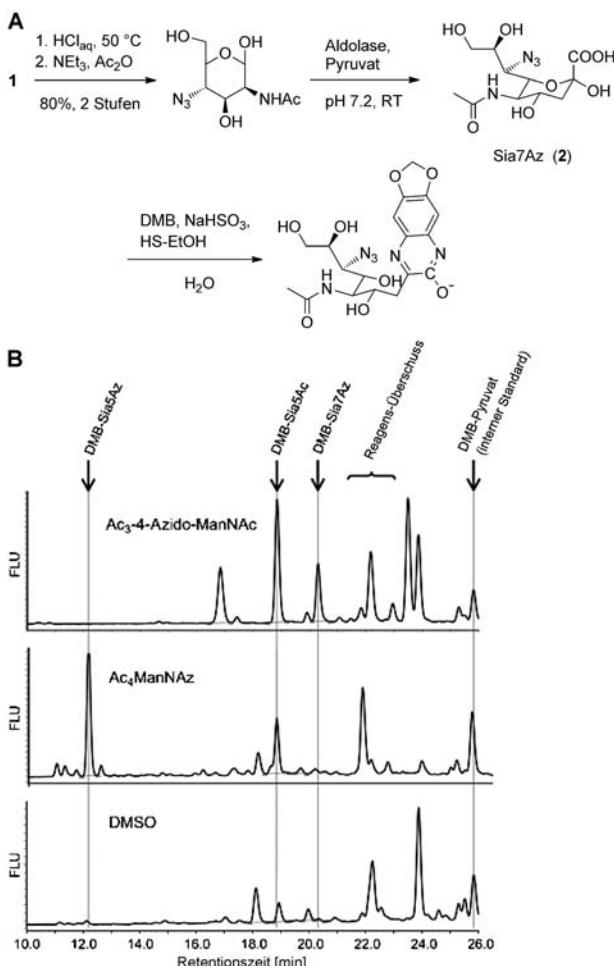


Abbildung 3. A) Chemoenzymatische Synthese der Standards für die HPLC-Analytik. B) Quantitative Analyse des Einbaus von Sia5Az und Sia7Az in Glykane von GNE-defizienten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit einer 500- μM Lösung von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ (oben), $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$ (Mitte) oder einer entsprechenden Menge DMSO (unten) über 3 Tage behandelt. FLU = „fluorescence light units“. Für weitere Details siehe die Hintergrundinformationen.

Vergleich mit chemoenzymatisch synthetisierter Sia7Az identifiziert (Abbildung 3).^[9b,12] Die Identität von Sia7Az wurde des Weiteren durch kombinierte Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS) bestätigt (für Details siehe die Hintergrundinformationen). Wir fanden Sia7Az-Einbauraten von bis zu 50 % des Gesamtsialinsäuregehalts, was der Größenordnung des maximalen Einbaus von Sia5Az abgeleitet von $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$ (60 % der Sialinsäuren) entspricht. Die hohe Einbaurate modifizierter Sialinsäuren in dieser Studie ist zumindest teilweise auf die Anwendung von GNE-defizienten Zellen zurückzuführen, welche der effizienten Metabolisierung von ManNAc-Derivaten zuträglich sind.^[10] Andererseits haben mehrere Studien gezeigt, dass ManNAz auch nützlich zur Modifikation von Sialinsäuren in „normalen“ GNE-exprimierenden Zellen ist. Die Einbaurate von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in dieser Studie deutet darauf hin, dass die von uns eingeführte Verbindung genauso vielversprechend als allgemein verwendbares Werkzeug für das Glyko-Engineering ist wie ManNAz.

Nach dem erfolgreichen Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in Glykane der Zelloberflächen-Glykoproteine untersuchten wir die Anwendbarkeit dieses Zuckers für das MOE rekombinanter exprimierter Glykoproteine. Zunächst wurde $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ für den Einbau in Glykane von CEACAM1 („CEA-related cell adhesion molecule 1“) und Lactotransferrin (LTF) getestet, welche zuvor erfolgreich mit ManNAz adressiert werden konnten.^[10,13] Zu unserer Überraschung konnten wir keinen Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in die Glykane von CEACAM1 oder LTF finden (Abbildung S2). Da beide Proteine ausschließlich N-Glykane tragen,^[14] nahmen wir einen möglicherweise spezifischen Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in O-Glykane an.

Die O-Glykan-Spezifität von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ wurde durch die Behandlung von Zellen mit PNGase F, einem Enzym, welches spezifisch N-Glykane spaltet, untersucht. Zellen, welche mit ManNAz gefolgt von PNGase F behandelt wurden, zeigten eine starke, jedoch nicht vollständige Reduzierung des azidspezifischen Signals (Abbildung S3, links), was auf einen vornehmlichen Einbau des Markers in N-verknüpfte Glykanketten hinweist. Die Inkubation von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ -behandelten Zellen mit PNGase F hatte augenscheinlich keinen Effekt auf die Signalintensität der biotinmarkierten Sia7Az, wie die Western-Blot-Analyse zeigte (Abbildung S3, Mitte). Übereinstimmend mit diesen Daten führte die Behandlung der Zellen mit dem N-Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin nicht zu einem verminderten Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ (Abbildung S3, rechts).

Zum direkten Beweis des spezifischen Einbaus von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in O-Glykane untersuchten wir Mucin-1 als hoch O-glykosyliertes Protein, das stark in MCF-7-Zellen exprimiert wird.^[15] MCF-7-Zellen zeigten nicht nur einen Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in Glykane von Zelloberflächenproteinen, (Abbildung 4a) sondern auch in Glykane des sekretierten Mucin-1 (Abbildung 4b). Zum Vergleich untersuchten wir ebenfalls die Effizienz der Einbaurate von $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$ in Sialinsäuren, sowie den O-Glykan-spezifischen Azidozucker $\text{Ac}_4\text{-GalNAz}$.^[16] Beide wurden sowohl in Zelloberflächenglykanen als auch in Glykanen des löslichen Mucin-1 effizient und in ähnlichem Ausmaß wie $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ (Abbildung 4a,b) eingebaut. Die Markierung von Mucin-1 durch alle drei verwendeten Substanzen weist klar auf die Modifizierung von O-Glykanen hin, wobei $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ als einziges Molekül spezifisch Sialinsäuren in derartigen Oligosacchariden adressiert.

Da Azidozucker bereits erfolgreich in der zellulären Membranfärbung^[17] angewendet wurden, untersuchten wir das Potenzial von $\text{Ac}_3\text{-4-azido-ManNAc}$ für die Glykanmarkierung in lebenden Tieren. Dafür wurde $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in die Hinterhirnventrikel von Larven des Zebraförblings 24 hpf („hours post fertilization“, Stunden nach Befruchtung) injiziert. AlexaFluor-488-konjugiertes Dibenzocyclooctin (DIBO),^[18] das selektiv mit der Azidogruppe modifizierter Sialinsäuren reagiert, wurde 48 hpf injiziert, und die lebenden Embryonen wurden 72 hpf analysiert. In Embryonen, denen $\text{Ac}_3\text{-4-azido-ManNAc}$ injiziert worden war, detektierten wir eine deutliche Markierung des Mittel- sowie des Hinterhirns, während diese Regionen in den DMSO-

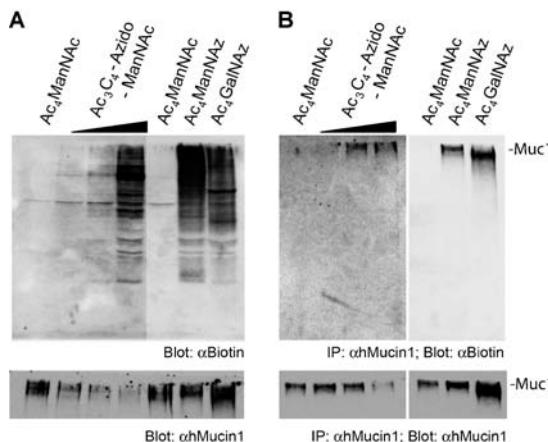


Abbildung 4. A) Konzentrationsabhängiger Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in Zelloberflächen-Glykoproteine von Mucin-1-exprimierenden MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden drei Tage entweder mit steigender Menge an $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ (100, 250 und 500 μM) oder mit $\text{Ac}_4\text{-ManNAc}$, $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$ und $\text{Ac}_4\text{-GalNAz}$ (je 500 μM) behandelt. Die Western-Blot-Analyse biotinmarkierter Zelloberflächen-Glykoproteine zeigte azidomodifizierte Sialinsäuren oder GalNAz in Glykoproteinen (oben). Membranassoziierte Mucin-1-Expression wurde durch Immunblotting detektiert (unten). B) Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in Glykane löslichen, O-glykosylierten Mucin-1. Lösliches Mucin-1 aus dem Zellkulturmedium der mit Azidozuckern behandelten MCF-7-Zellen (analog zu (A)) wurden nach Immunpräzipitation mit Alkinylbiotin in einer CuAAC umgesetzt und durch einen Western-Blot analysiert. $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$ und $\text{Ac}_4\text{-GalNAz}$ dienten als Positivkontrollen (obere Reihe). Die Menge an präzipitiertem Muc-1 wurde durch Immunblotting detektiert (untere Reihe).

Kontrollen nur eine leichte Hintergrundfärbung aufwiesen (Abbildung 5). Zusätzlich beobachteten wir eine schwache Färbung des dorsalen Myoseptums, die in den Kontroll-Embryos nicht auftrat (Abbildung 5, weiße Pfeile und Einschübe). Die Fluoreszenzmarkierung von Teilen des zentralen Nervensystems und des Myoseptums spiegeln möglicherweise den hochgradigen Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in Sialinsäuren von stark O-glykosylierten Proteinen wie Dystroglykanen wider, die ein ähnliches Expressionsmuster in Zebrafärblingen aufweisen.^[19] Zur Untermauerung unserer Ergebnisse, die auf den spezifischen Einbau von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in Sialinsäuren O-glykosylierter Proteine nicht nur in Sägerzellen, sondern auch in sich entwickelnden Zebrafisch-Zellen hinweisen, sind weitere Studien nötig.

Alles in allem konnten wir die erfolgreiche biochemische und biologische Anwendung eines synthetischen, C4-modifizierten ManNAc-Analogons demonstrieren, indem wir die Umwandlung in die entsprechende C7-Azido-Sialinsäure in Sägerzelllinien zeigten. Des Weiteren konnten wir erstmals den biosynthetischen Zugang der C7-Position zur bioorthogonalen Funktionalisierung nachweisen. Versuche, die C7-Position mit Periodat als selektives Reagens chemisch zu modifizieren, waren schon vorher unternommen worden, jedoch führten diese immer zu einer Kappung der Sialinsäuremoleküle durch Entfernen von C8 und C9 in der Periodat-oxidation.^[7] Unser Ansatz hebt die Anwendung von C4-modifizierten ManNAc-Derivaten hervor, welche von Zellen umgewandelt werden, und ermöglicht dadurch die funktio-

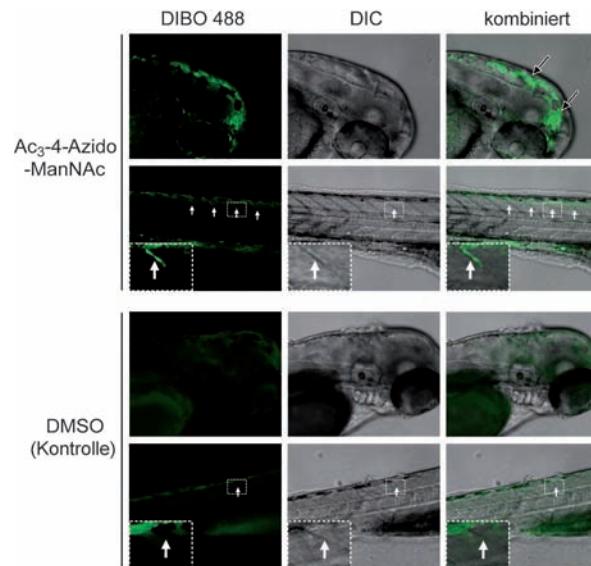


Abbildung 5. In-vivo-Markierung von Zebrafischglykanen durch Anwendung von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ und AlexaFluor-488-DIBO. Zebrafischlarven wurde 24 hpf intraventrikulär $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ (obere Reihe) oder DMSO (untere Reihe) injiziert, 48 hpf wurde AlexaFluor-488-DIBO als chemischer Marker für inkorporiertes $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ injiziert, und 72 hpf wurde die Fluoreszenzmarkierung analysiert. Lange Pfeile zeigen Mittelhirn- und Hinterhirnregionen, weiße Pfeile markieren Myosepta, die exemplarisch im Einschub vergrößert sind. DIC = „differential interference contrast“.

nelle Charakterisierung von C7-modifizierten Sialinsäuren mit ansonsten erhaltener Zusammensetzung. Interessanterweise wurde Sia7Az nicht in N-Glykane rekombinant exprimierter und membranständiger Proteine eingebaut, konnte aber im stark O-glykosylierten Protein Mucin-1 detektiert werden. Dadurch wird der Zucker zu einem wertvollen Werkzeug für die spezifische O-Glykan-Analyse, welche mit den eher unspezifischen ManNAc-Derivaten früherer MOE-Studien nicht möglich war. Zudem wurde die Anwendbarkeit von $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ in der Markierung von membranassoziierten Glykoproteinen von kultivierten Sägerzelllinien und lebenden Tieren, wie am Beispiel von Zebrafischlarven demonstriert, gezeigt. Diese Studie bestätigt die Relevanz eines neuen MOE-Werkzeugs mit besonderen Eigenschaften für die Glykobiologieforschung, welche sich von anderen synthetisch zugänglichen Azidozuckern unterscheiden.

Eingegangen am 14. Dezember 2011,
veränderte Fassung am 22. Februar 2012

Stichwörter: In-vivo-Markierung · Mannosamin · Metabolisches Oligosaccharid-Engineering · O-Glycan · Sialinsäure

- [1] A. M. Sinclair, S. Elliott, *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94, 1626.
- [2] C. T. Campbell, S. G. Sampathkumar, K. J. Yarema, *Mol. Bio. Syst.* **2007**, 3, 187.
- [3] J. Du, M. A. Meledeo, Z. Y. Wang, H. S. Khanna, V. D. P. Paruchuri, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2009**, 19, 1382.

- [4] O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1308.
- [5] a) N. W. Charter, L. K. Mahal, D. E. Koshland, C. R. Bertozzi, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9255; b) R. Horstkorte, S. Reinke, C. Bauer, W. Reutter, M. Kontou, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 296.
- [6] a) S. Han, B. E. Collins, P. Bengtson, J. C. Paulson, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 93; b) C. Oetke, S. Hinderlich, R. Brossmer, W. Reutter, O. T. Keppler, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6688–6695.
- [7] Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, J. C. Paulson, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 207.
- [8] a) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13; b) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030.
- [9] a) R. Thomson, M. von Itzstein, *Carbohydr. Res.* **1995**, *274*, 29; b) T. Honda, T. Masuda, S. Yoshida, M. Arai, Y. Kobayashi, M. Yamahita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1921.
- [10] H. Möller, V. Böhrsch, L. Lucka, C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 2245.
- [11] M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12371; frühe Berichte zur CuAAC: a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [12] Der erste Bericht über die chemoenzymatische Synthese von Sia7Az: D. M. Kong, M. von Itzstein, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 957.
- [13] H. Möller, V. Böhrsch, C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, *30*, 334.
- [14] a) C. Kannicht, L. Lucka, R. Nuck, W. Reutter, M. Gohlke, *Glycobiology* **1999**, *9*, 897; b) T. Yu, C. Guo, J. Wang, P. Hao, S. Sui, X. Chen, R. Zhang, P. Wang, G. Yu, L. Zhang, Y. Dai, N. Li, *Glycobiology* **2011**, *21*, 206.
- [15] P. L. Devine, G. W. Birrell, R. H. Whitehead, H. Harada, P. X. Xing, I. F. C. McKenzie, *Tumor Biol.* **1992**, *13*, 268.
- [16] a) H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846; b) M. Boyce, I. S. Carrico, A. S. Ganguli, S.-H. Yu, M. J. Hangauer, S. C. Hubbard, J. J. Kohler, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3141.
- [17] a) 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; b) S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664.
- [18] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253.
- [19] C. J. Moore, H. T. Goh, J. E. Hewitt, *Genomics* **2008**, *92*, 159.