

# Sequentielle $\alpha$ -Ketosäurehydroxylamin(KAHA)-Ligationen: Synthese C-terminaler Varianten des Modifikationsproteins UFM1\*\*

Ayodele O. Ogunkoya, Vijaya R. Pattabiraman und Jeffrey W. Bode\*

Die Rolle, die Konjugation und Dekonjugation von Modifikationsproteinen wie Ubiquitin und SUMO in Bezug auf ihre Zielproteine spielen, hat sich zu einem der spannendsten Gebiete der Molekularbiologie und Pharmaforschung entwickelt.<sup>[1]</sup> Die Entwicklung neuer Therapeutika, die mit diesen regulatorischen Signalwegen wechselwirken, erfordert einerseits den Zugang zu markierten und derivatisierten Modifikationsproteinen und andererseits passende Konjugationstechniken.<sup>[2]</sup> Zwar können in einigen Fällen das Modifikationsprotein, das Zielprotein und die spezifische Ligase aus natürlichen Quellen gewonnen werden, allerdings konzentriert sich die Forschung zunehmend auf synthetische Methoden um die benötigten Proteine herzustellen und anschließend ihre biologische Bedeutung zu untersuchen.<sup>[2,3]</sup> In diesem Zusammenhang wird die native chemische Ligation (NCL) von C-terminalen Thioestern von Modifikationsproteinen mit einem 5-Thiolsin-Rest eines anderen Proteins die Bedeutung dieses Ansatzes zeigen.<sup>[4]</sup> Der nichtnatürliche 5-Thiolsin-Rest kann durch chemische Totalsynthese,<sup>[5]</sup> Semisynthese ausgehend von exprimierten Proteinsegmenten<sup>[6]</sup> oder ribosomalen Einbau in das Zielprotein inkorporiert werden.<sup>[7]</sup> Er wurde bereits genutzt, um Ubiquitin mit  $\alpha$ -Synuclein<sup>[6]</sup> und SUMO<sup>[7]</sup> zu konjugieren und um Di-,<sup>[4,8]</sup> Tri-<sup>[5]</sup> und Tetraubiquitine zu synthetisieren.<sup>[9]</sup>

Die total- und semisynthetischen Ansätze zur Herstellung von Modifikationsprotein-Protein-Konjugaten erfordern C-terminale Derivate der Modifikationsproteine. Der Zugang zu solchen Derivaten beschränkt sich momentan auf Ubiquitin,<sup>[4,5,8–10,11a]</sup> SUMO, Nedd8 und ISG15.<sup>[11a]</sup> Die entsprechenden, für die NCL nötigen, Thioester werden entweder totalsynthetisch,

semisynthetisch durch NCL eines exprimierten Proteinfragments oder durch Gebrauch spezifischer E1-Enzyme<sup>[11a]</sup> hergestellt. Die Erweiterung dieser Technik auf die Herstellung und Inkorporation anderer Modifikationsproteine wie FUB1,<sup>[12]</sup> MUB<sup>[13]</sup> und UFM1<sup>[14]</sup> würde entweder die Expression Intein-bildender Fusionsproteine mit anschließendem Abfang durch ein exogenes Thiol,<sup>[15]</sup> die Verwendung von spezifischen E1-Enzymen oder die chemische Totalsynthese von C-terminalen Thioestern erfordern. Die Größe dieser Modifikationsproteine (70–140 Aminosäuren) schließt im Allgemeinen eine lineare Festphasensynthese der Thioester aus, und viele dürften auch außerhalb der Reichweite von Zwei-Segment-Ligationen sein. Eine Drei- oder Vier-Segment-Ligationsstrategie ist also nötig.

Wir berichten hier über die chemische Synthese von C-terminalen Varianten des Ubiquitin-Faltungsmodifikationsprotein 1 (UFM1) durch mehrfache Segmentligation mittels der  $\alpha$ -Ketosäurehydroxylamin(KAHA)-Ligation mit 5-Oxaprolin (Opr). Alle für die Ligation nötige Peptidfragmente können ohne Probleme durch übliche Fmoc-Festpha-

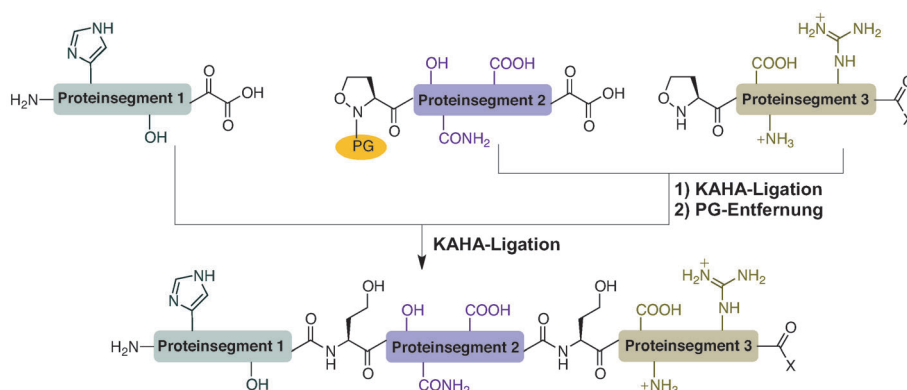


Abbildung 1. Sequentielle KAHA-Ligation. PG = Schutzgruppe, X = C-terminale Varianten.

senpeptidsynthese (SPPS) erhalten werden. Die N-terminal Fmoc-geschützten Opr-Peptide sind stabil gegenüber Abspaltung von der Festphase, Aufreinigung, Oxidation und Ligation und können zudem schnell und sauber von dem ansonsten ungeschützten Ligationsprodukt abgetrennt werden. Diese Arbeit ist die erste Alternative zur nativen chemischen Ligation, um natürliche Amidbindungen mittels sequentieller, chemoselektiver Ligationen zu erhalten.<sup>[16]</sup>

Der Schlüssel für jede sequentielle Ligationsstrategie (Abbildung 1) ist die Identifikation von passenden Schutzgruppen für den N- oder C-Terminus eines Ligationssegments. Schutzstrategien für sequentielle NCL beinhalten die N-terminale Schützung von Cysteinresten als Thiazolidine

[\*] A. O. Ogunkoya, Dr. V. R. Pattabiraman, Prof. Dr. J. W. Bode  
Laboratorium für Organische Chemie, Departement Chemie und  
Angewandte Biowissenschaften, ETH Zürich  
Wolfgang Pauli Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: bode@org.chem.ethz.ch  
Homepage: <http://www.bode.ethz.ch>

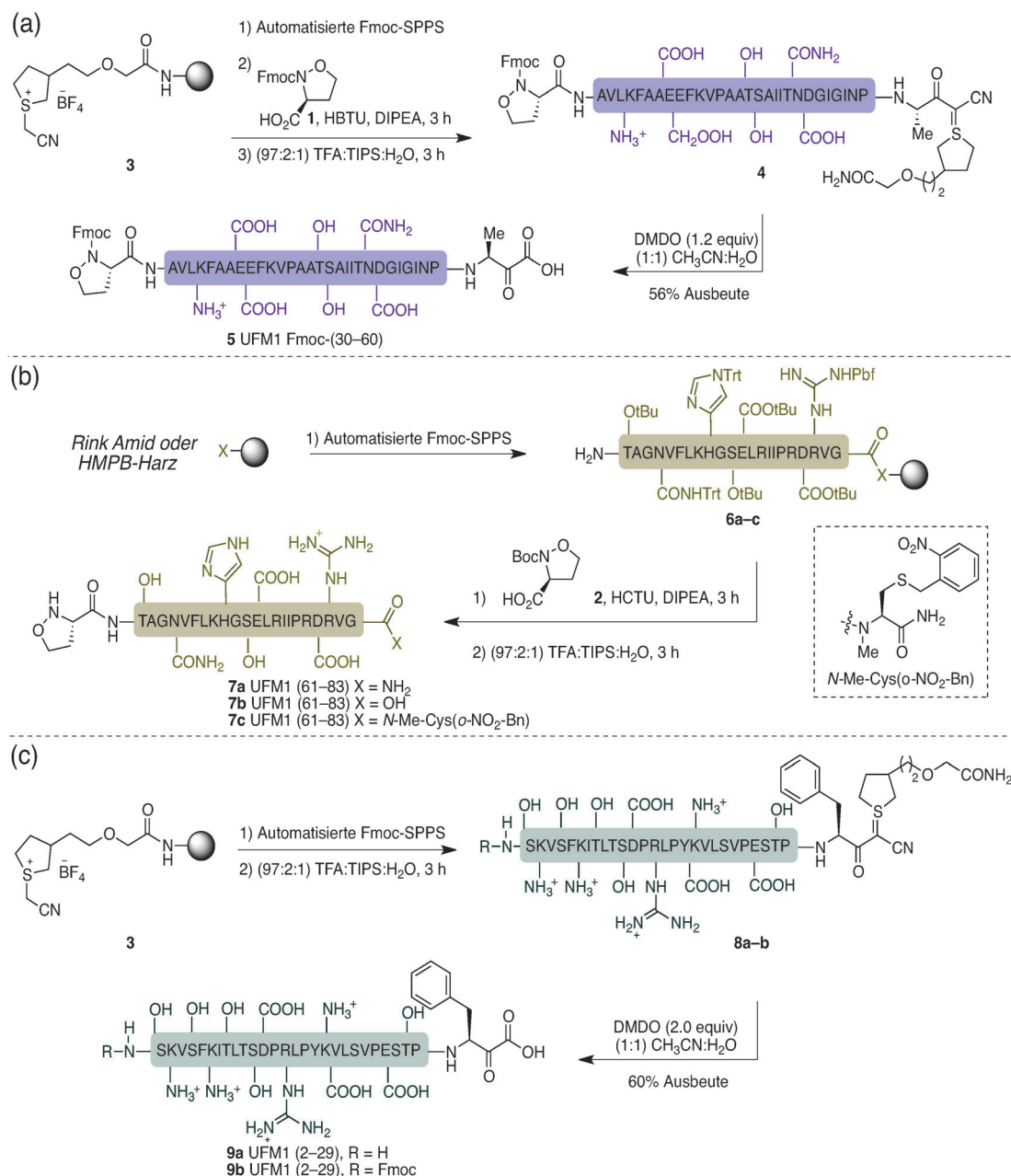
[\*\*] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds  
(200021\_131957) und durch eine ETH Fellowship für V.R.P. (ETH  
FEL 06-10-1) unterstützt. Wir danken Dr. Xiangyang Zhang und Rolf  
Häfliger vom Massenspektrometrieservice des LOC für Analysen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204144> zu finden.

und ihre Freisetzung mit Hydroxylamin oder die Demaskierung von C-terminalen Thioestern nach der Ligation durch Umlagerung.<sup>[17]</sup> Die größte Limitierung der sequentiellen NCL ist die Notwendigkeit mehrerer Cysteine, die gegebenenfalls desulfuriert werden müssen, um eine Störung der Proteinfunktion zu verhindern. Im Unterschied hierzu ergibt die KAHA-Ligation mit Opr einen  $\alpha$ -Homoserin-Rest (Hse, T<sup>8</sup>), der als unschädlicher Ersatz für andere Aminosäuren dienen kann.<sup>[18]</sup>

Das Hauptziel unserer Studie war die Identifikation einer Schutzgruppe, welche die folgenden Anforderungen erfüllt: 1) Orthogonalität zu den in der SPPS üblichen, säurelabilen

Schutzgruppen; 2) Resistenz gegenüber den oxidativen Bedingungen, die für die Transformation von Cyanoschwefeliden (SY) zu  $\alpha$ -Ketosäuren (KA) nötig sind; 3) Stabilität während der Ligation und anschließenden Aufreinigung der ungeschützten Peptidsegmente. Schutzgruppen, die durch Thiole, Reduktion oder Metallkatalyse abgespalten werden – wie Ns, Troc oder Alloc –, wurden als inkompatibel mit ungeschützten Peptiden befunden oder erfüllten nur teilweise die umrissenen Kriterien. Eine Prüfung basenlabiler Schutzgruppen deutete auf eine potentielle Inkompatibilität mit ungeschützten funktionellen Gruppen bzw. auf eine möglicherweise schwierige Entschützung nach der Ligation hin.



**Schema 1.** Synthese von UFM1-Peptidsegmenten: a) Synthese von UFM1-Fmoc-(30–60) **5**, b) UFM1 (61–83) **7a**, **7b** und **7c**, c) UFM1 (2–29) **9a** und **9b**. DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, TFA = Trifluoressigsäure, TIPS = Triisopropylsilan, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Trt = Triphenylmethyl, Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydro-1-benzofuran-5-sulfonyl, HCTU ist ein Uronium-basiertes Kupplungsreagens.

Trotz dieser Bedenken – und mangels besserer Alternativen – entschieden wir, eine Fmoc-basierte Schutzstrategie zur sequentiellen Ligation mit Opr zu untersuchen. Wir synthetisierten enantiomerenreines (*S*)-*N*-Fmoc-Opr **1** (siehe Hintergrundinformationen) ausgehend von modifizierten Vorschriften aus der Literatur.<sup>[18,19]</sup>

Innerhalb unserer Synthesestudien über neue Modifikationsproteine wollten wir den Zugang zu drei C-terminalen Varianten von UFM1 ermöglichen: 1) zur C-terminalen Carbonsäure, die mittels passender E1-Ligase an ein Zielprotein konjugiert werden könnte; 2) zum passend geschützten C-terminalen Thioester, der mittels NCL an ein Zielprotein, das einen 5-Thiolsin-Rest enthält, konjugiert werden kann; 3) zum C-terminalen Amid, das als wichtige Negativkontrolle in biochemischen Konjugationsstudien dienen könnte. Die sequentielle Ligungsstrategie mit modularen Proteinsegmenten würde die effiziente Synthese von C-terminalen Proteinvarianten bei minimalem Synthesaufwand ermöglichen. Im Allgemeinen ist die SPPS-basierte Synthese C-terminaler Proteinvarianten im Unterschied zu N-terminalen Modifikationen mühsam, da eine individuelle SPPS-Synthese jeder C-terminalen Variante nötig ist.<sup>[20]</sup>

Unsere sequentielle Strategie zur Synthese von UFM1-(2–83)-Varianten erfordert die Synthese von drei Segmenten (Schema 1). Wir wählten Ligungspositionen zwischen Phe29–Thr30 und Ala60–Gln61. Diese Strategie ergäbe C-terminal modifiziertes UFM1 mit zwei Mutationen im Vergleich zur natürlichen Sequenz: T30T<sup>8</sup> und Q61T<sup>8</sup>. Sie ermöglichte es uns, die KAHA-Ligationen mit N-terminalem Opr und Ala- bzw. Phe-KA zu evaluieren, in bisherigen Studien wurden Leu-, Tyr- und Glu-KA untersucht.

Die Herstellung von Fmoc-Opr-(31–60)- $\alpha$ -KA **5**, der Basis dieser sequentiellen Strategie, erfolgte mit unserer früher entwickelten Methode zur Synthese von Peptid- $\alpha$ -KA (Schema 1a). Cyanoschwefelylid-Linker auf Rink-Amid-Harz **3** wurden genutzt, um UFM1 (31–60) mittels automatisierter SPPS zu synthetisieren.<sup>[21]</sup> Fmoc-Opr **1** wurde manuell mit HBTU gekuppelt. Entschützung der Seitenketten und Abspaltung des Peptides vom Harz ergab **4** ohne jegliche Nebenprodukte. Ungeschütztes SY **4** wurde mit Dimethyldioxiran (DMDO) oxidiert und durch präparative HPLC aufgereinigt. Es wurde analytisch reine  $\alpha$ -KA **5** erhalten. Das N-terminale Opr30 wurde durch die gesamte Prozedur nicht beeinträchtigt und ist stabil.

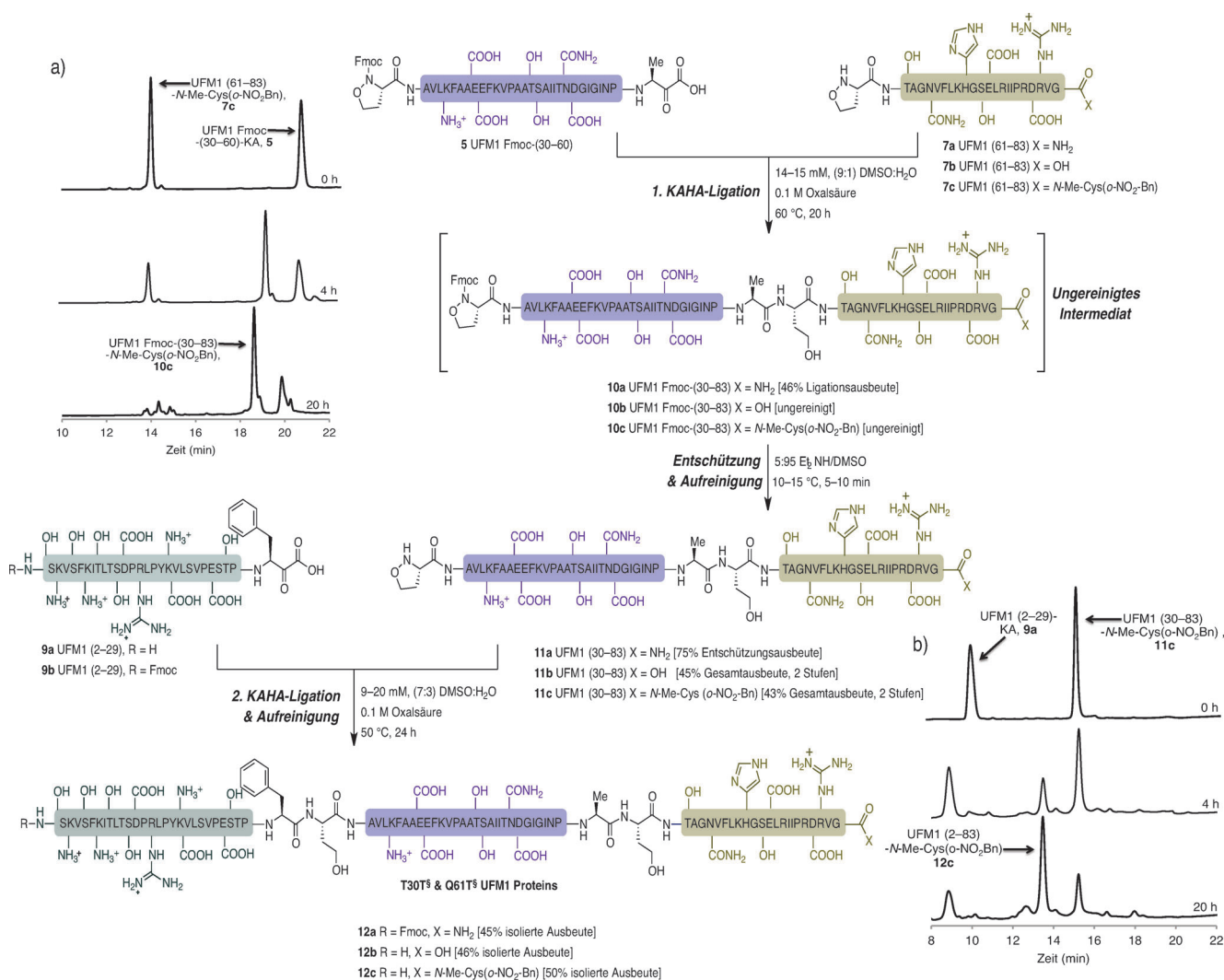
UFM1-(61–83)-Segmente mit drei unterschiedlichen C-Termini und ungeschütztem N-terminalen Opr61 (**7a–c**) (Schema 1b) wurden mit Standardmethoden synthetisiert.<sup>[18]</sup> Das C-terminale Amidsegment **7a** und das C-terminale Carbonsäuresegment **7b** wurden mit Fmoc-SPPS auf Rink-Amid- bzw. HMPB-Harz hergestellt. Die Thioester-Vorstufe **7c** wurde ausgehend von Rink-Amid-Harz, das mit Fmoc-*N*-Me-Cys(*o*-NO<sub>2</sub>-Bn)-OH beladen war, synthetisiert.<sup>[9]</sup> In jeder Synthese wurde automatisierte SPPS benutzt, um die Peptide zu Rest 62 (**6a–c**) zu verlängern, und (*S*)-*N*-Boc-Opr61 **2** wurde durch manuelle Kupplung mit HCTU eingeführt. Die folgende, säureinduzierte Abspaltung von der Festphase und anschließende Aufreinigung ergab die ungeschützten Peptide **7a–c**.

Die N-terminalen Segmente, UFM1 (2–29)- $\alpha$ -KA **9a** und **9b** (Schema 1c), wurden durch SPPS auf **3**, gefolgt von saurer Abspaltung vom Harz, Oxidation mit DMDO und Aufreinigung durch HPLC erhalten. Diese Prozedur ergab die Phe- $\alpha$ -KA entweder mit einem freien N-Terminus (**9a**) oder mit einem Fmoc-markierten N-Terminus (**9b**).

Unsere Studien zur Ligation der einzelnen Segmente begann mit der Ligation von  $\alpha$ -KA **5** und Opr **7a**, wobei ein kleiner Überschuss des  $\alpha$ -KA Segment benutzt wurde (1:1.3–2.0 Äquivalente). In unseren bisherigen Untersuchungen zur Opr-KAHA-Ligation fanden wir, dass ein höherer Anteil Wasser im Lösungsmittel die Reaktion beschleunigt.<sup>[18]</sup> Leider war die Ligation aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Peptide bei Wasserkonzentrationen von mehr als 10 % in DMSO (v/v) und gleichzeitig ausreichend hoher Peptidkonzentration (10–20 mM) nur schwer durchführbar. Dennoch verlief die Ligation in 10 % Wasser in DMSO in Gegenwart von 0.1M Oxaläure bei 60 °C und Peptidkonzentrationen von 14–15 mM problemlos innerhalb von 20 Stunden und ergab **10a** (Schema 2a). Es wurde kein Verlust der Fmoc-Schutzgruppe des geschützten 5-Oxaprolins in Segment **5** beobachtet. Aufreinigung der Reaktionsmischung durch HPLC ergab das Ligungsprodukt in 46 % Ausbeute. Anders als in unseren bisherigen Arbeiten oder als in der zweiten Ligation (siehe unten) wurde hier ein kleiner Anteil (ca. 10 %) eines isomeren Nebenprodukts mit gleicher Molekülmasse wie das gewünschte Produkt beobachtet,<sup>[22]</sup> welches allerdings leicht durch präparative HPLC vom gewünschten Ligungsprodukt abgetrennt werden konnte.

Erfreulicherweise zeigt sich, dass das Fmoc-geschützte Opr30 stabil unter den Ligungs- und Aufreinigungsbedingungen war, es musste nun noch eine Methode zur schnellen und effektiven Entschützung entwickelt werden. Fmoc-Entschützen werden typischerweise mit vollständig geschützten Peptiden durchgeführt, und die Entwicklung eines Protokolls zur Entschützung von ansonsten ungeschützten Peptiden in guten Ausbeuten erforderte einige Optimierung. Es zeigte sich, dass vor allem die Wahl der richtigen Base und der richtigen Reaktionstemperatur zur Vermeidung von Nebenprodukten essentiell sind. Nach sorgfältiger Optimierung fanden wir, dass Peptid **10a** bei 10–15 °C mit 5 % Et<sub>2</sub>NH in DMSO binnen 5–10 min glatt zum gewünschte Produkt **11a** reagierte. Für die Entwicklung der Prozedur entschieden wir, das entschützte Peptid vor der finalen Ligation mit HPLC aufzureinigen. In allen anderen Synthesen wurde die Fmoc-Entschützung sofort nach der Ligation und im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt. Beispielsweise wurde die Reaktionsmischung aus **5** und **7b**, die **10b** ergab, auf 10–15 °C gekühlt, mit einer Lösung von 10 % Et<sub>2</sub>NH in DMSO (Endkonzentration ca. 5 % Et<sub>2</sub>NH) versetzt und 10 min umgesetzt. Das entschützte Ligungsprodukt **11b** wurde durch präparative HPLC aufgereinigt und in einer Gesamtausbeute von 45 % erhalten. Dieses Verfahren verringert die Zahl an nötigen Handhabungsschritten für die sequentiellen Ligationen und erhöht somit die Gesamtausbeute. Diese In-situ-Entschützung wurde in allen folgenden Synthesen von UFM1 und anderen Proteinen verwendet.

Die finale Ligation zur Synthese der UFM1-Varianten wurde zuerst mit dem Ligungsprodukt **11a** und dem Fmoc-



**Schema 2.** Synthese von UFM1-Proteinen durch sequentielle KAHA-Ligationen: a) HPLC-Chromatogramme der Ligation zwischen UFM1 Fmoc-(30–60)-KA **5** und (61–83)-N-Me-Cys(o-NO<sub>2</sub>Bn) **7c**, b) HPLC-Chromatogramme der Ligation zwischen UFM1 (2–29)-KA **9a** und (30–83)-N-Me-Cys(o-NO<sub>2</sub>Bn) **11c**.

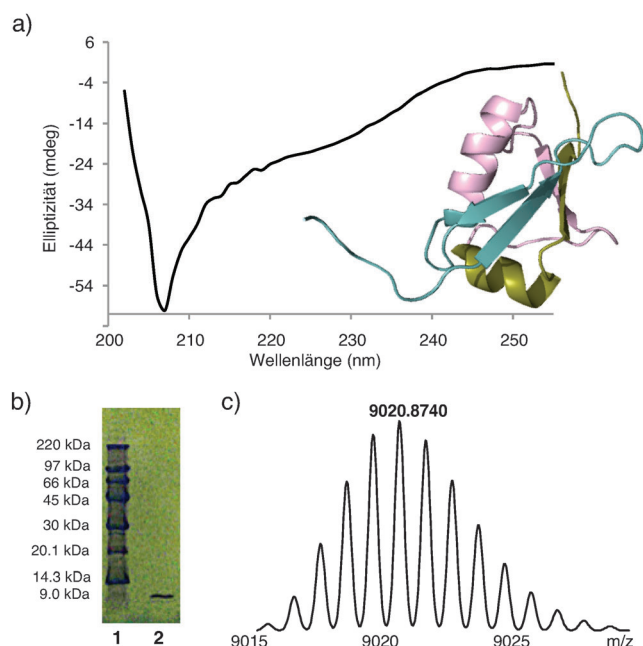
markierten Peptid **9b** untersucht, da letzteres aufgrund des Fmoc-Chromophors eine einfache Beobachtung des Reaktionsverlaufs ermöglichte. Die Ligation wurde mit 1.0 Äquivalenten **11a** und 1.4 Äquivalenten **9b** bei einer Peptidkonzentration von 20 mM in einer Mischung von 30 % Wasser in DMSO und 0.1 M Oxalsäure bei 50 °C durchgeführt. Nach 24 Stunden war die Reaktion vollständig abgelaufen und ergab **12a** in 45 % isolierter Ausbeute (Schema 2b). Es wurde kein isomeres Nebenprodukt beobachtet. Qualitativ betrachtet war diese zweite Ligation effektiver und verlief bei niedrigerer Temperatur als die erste, obwohl eine sterisch anspruchsvollere  $\alpha$ -KA (Phe vs. Ala) genutzt wurde. Wir führen diese erhöhte Reaktivität bei niedrigerer Temperatur auf eine erhöhte Löslichkeit des Peptides und einen höheren Wasseranteil in der Reaktionsmischung zurück.

Die Strategie der sequentiellen Ligationen wurde ohne Weiteres auch auf die Synthesen der C-terminalen UFM1-Carbonsäure **12b** und des maskierten Thioesters **12c** angewendet. In allen Fällen wurden sowohl die beiden Ligationen als auch die Fmoc-Entschützung unter ähnlichen Bedingun-

gen und mit vergleichbaren Ausbeuten wie bei der Synthese der UFM1-Variante **12a** durchgeführt. Nur geringfügige Änderungen aufgrund der Löslichkeit und der Ansatzgröße waren nötig: Beispielsweise wurde die zweite Ligation von **9a** mit **11b** zu **12b** bei einer Peptidkonzentration von 9 mM in 25 % Wasser in DMSO durchgeführt, und die Reaktion war in 24 h bei 50 °C abgeschlossen.

Die Reinheit, Identität und exakte Masse der finalen Proteine wurde mittels analytischer HPLC, SDS-PAGE (Abbildung 2b), hochauflösender Massenspektrometrie (FTMS) und Sequenzierung durch Tandem-Massenspektrometrie bestätigt. Die Tertiärstruktur der synthetischen UFM1-Varianten spielt eine Schlüsselrolle für die biologische Funktion. NMR-Studien von UFM1-Protein zeigten, dass mehrere  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -helikale Bereiche vorhanden sind.<sup>[23]</sup> CD-Spektren der synthetischen UFM1-Varianten **12a**, **12b** und **12c** (aufgenommen bei 23 °C in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 100 mM NaCl bei pH 6.0) deuten auf die Gegenwart von gefaltetem Protein mit  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -helikalen Strukturen hin (Abbildung 2a).





**Abbildung 2.** a) CD-Spektrum von UFM1 (2–83)-N-Me-Cys(o-NO<sub>2</sub>-Bn) **12c** bei 23 °C; Einschub: NMR-basierte Struktur von UFM1 in Lösung.<sup>[23]</sup> b) SDS-PAGE des Molekulargewichtstandards (14.3–220 kDa, Bahn 1) und reinem **12c** (9.0 kDa, Bahn 2). c) Dekonvolviertes ESI-FTMS von **12c**.

Es wurde gezeigt, dass Fmoc-geschütztes 5-Oxaprolin für sequentielle KAH-A-Ligationen zur Proteinsynthese geeignet ist. Die Entwicklung dieser Strategie ermöglichte die einfache Synthese dreier C-terminaler Varianten des UFM1-Proteins, einem wichtigen, aber nicht ausreichend untersuchten Modifikationsprotein von gegenwärtigem Forschungsinteresse. Diese Varianten stellen die bis heute größten Proteine mit natürlichen Amid-Bindungen dar, die durch Segmentligationen und mit einer anderen Methode als der nativen chemischen Ligation hergestellt wurden. Diese Studien werden sowohl den Zugang zu synthetischen Modifikationsproteinen verbessern als auch einen neuen Ansatz zum iterativen Segmentzusammenbau zur chemischen Proteinsynthese bieten.

Eingegangen am 28. Mai 2012

Online veröffentlicht am 22. August 2012

**Stichwörter:** Amide · Chemoselektivität · Ligationsreaktionen · Proteine · Proteinsynthese

- [1] a) M. Hochstrasser, *Nature* **2009**, 458, 422–429; b) E. R. Strieter, D. A. Korasick, *Chem. Biol.* **2012**, 7, 52–63.
- [2] T. Fekner, X. Li, M. K. Chan, *ChemBioChem* **2011**, 12, 21–33.
- [3] P. Siman, A. Brik, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, DOI: 10.1039/C2OB25149C.
- [4] a) K. S. Ajish Kumar, M. Haj-Yahya, D. Olschewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8234–8238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8090–8094; b) R. Yang, K. K. Pasunoti, F. Li, X. W. Liu, C. F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13592–13593; c) F. El Qualid, R. Merckx, R. Ekkebus, D. S.

- Hameed, J. J. Smit, A. de Jong, H. Hilkmann, T. K. Sixma, H. Ovaa, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 10347–10351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 10149–10153.
- [5] S. N. Bavikar, L. Spasser, M. Haj-Yahya, S. V. Karthikeyan, T. Moyal, K. S. A. Kumar, A. Brik, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 782–787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 758–763.
- [6] M. Hejjajoui, M. Haj-Yahya, K. S. A. Kumar, A. Brik, H. A. Lashuel, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 425–429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 405–409.
- [7] S. Virdee, P. B. Kapadnis, T. Elliott, K. Lang, J. Madrzak, D. P. Nguyen, L. Riechmann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10708–10711.
- [8] K. S. A. Kumar, L. Spasser, L. A. Erlich, S. N. Bavikar, A. Brik, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 9312–9317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 9126–9131.
- [9] K. S. A. Kumar, S. N. Bavikar, L. Spasser, T. Moyal, S. Ohayon, A. Brik, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 6261–6265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6137–6141.
- [10] L. A. Erlich, K. S. A. Kumar, M. Haj-Yahya, P. E. Dawson, A. Brik, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2392–2396.
- [11] a) P. P. Geurink, F. El Qualid, A. Jonker, D. S. Hameed, H. Ovaa, *ChemBioChem* **2012**, 13, 293–297; b) O. N. Burchak, M. Jaquinod, C. Cottin, L. Mugherli, K. Iwai, F. Chatelain, M. Y. Balakirev, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1667–1669.
- [12] K. Kas, E. Schoenmakers, W. Van de Ven, G. Weber, M. Nordenskjold, L. Michiels, J. Merregaert, C. Larsson, *Genomics* **1993**, 17, 387–392.
- [13] B. P. Downes, S. A. Saracco, S. S. Lee, D. N. Crowell, R. D. Vierstra, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 27145–27157.
- [14] M. Komatsu, T. Chiba, K. Tatsumi, S. Lemura, I. Tanida, N. Okazaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Natsume, K. Tanaka, *EMBO J.* **2004**, 23, 1977–1986.
- [15] a) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 297–303; b) R. M. Hofmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 297–303; c) C. Chatterjee, R. K. McGinty, J. P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2872–2876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2814–2818.
- [16] a) I. E. Valverde, F. Lecaille, G. Lalmanach, V. Aucagne, A. F. Delmas, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 742–746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 718–722; b) Z. Miao, J. P. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4253–4260.
- [17] a) M. Villain, J. Vizzavona, K. Rose, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 673–679; b) S. Ueda, M. Fujita, H. Tamamura, N. Fujii, A. Otaka, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1983–1986; c) G. Fang, Y. Li, F. Shen, Y. Huang, J. Li, Y. Lin, H. Cui, L. Lui, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7787–7791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7645–7649; d) N. Ollivier, J. Vicogne, A. Vallin, H. Drobecq, R. Desmet, O. El Mahdi, B. Leclercq, G. Goormachtigh, V. Fafeur, O. Melnyk, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 213–217; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 209–213.
- [18] V. R. Pattabiraman, A. O. Ogunkoya, J. W. Bode, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 5204–5208; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5114–5118.
- [19] A. Vasella, R. Voeffray, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 97–98.
- [20] J. Alsina, F. Albericio, *Biopolymers* **2003**, 71, 454–477.
- [21] a) L. Ju, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2259–2264; b) L. Ju, A. R. Lippert, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4253–4255.
- [22] J. Wu, J. Ruiz-Rodriguez, J. M. Cornstock, J. Z. Dong, J. W. Bode, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1976–1979.
- [23] H. Sasakawa, E. Sakata, Y. Yamaguchi, M. Komatsu, K. Tatsumi, E. Kominami, K. Tanaka, K. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 343, 21–26.