

Zweifarbmarkierung von Glycanen lebender Zellen durch Kombination von Diels-Alder- und Klick-Chemie**

Andrea Niederwieser, Anne-Katrin Späte, Long Duc Nguyen, Christian Jüngst, Werner Reutter und Valentin Wittmann*

Die Glycosylierung von Proteinen ist eine komplexe Art der posttranslationalen Modifikation und äußerst wichtig für die Funktion vieler Proteine. Sialinsäure befindet sich in exponierter Lage am äußeren Ende von Membranglycoproteinen. Sie spielt eine entscheidende Rolle für die Regulation vieler Zellfunktionen und bildet eine Schutzschicht um die Zelle. Darüber hinaus steht sie in ständiger Wechselwirkung mit der Zellumgebung und trägt zur Histokompatibilität bei.^[1] Dies macht die Sialylierung zu einem interessanten Forschungsgebiet, doch die Visualisierung von Sialinsäuren in vivo stellt noch immer eine große Herausforderung dar. Genetische Markierungsmethoden, wie die routinemäßig zur Untersuchung von Proteinen genutzte Expression als GFP-Fusionsproteine, stehen für die Untersuchung sekundärer Genprodukte, wie den Glycanen von Glykokonjugaten, nicht zur Verfügung. Eine neue erfolgreiche Strategie zur Visualisierung von Glycanen in vitro und in vivo ist das metabolische Oligosaccharid-Engineering (MOE).^[2] Hierbei werden Zellen in Anwesenheit von nichtnatürlichen Monosaccharidderivaten, welche eine chemische Reportergruppe tragen und trotzdem von der Biosynthesemaschinerie der Zelle akzeptiert werden, kultiviert. Zum Beispiel wird peracetyliertes *N*-Azidoacetylmannosamin (Ac₄ManNAz) von den Zellen aufgenommen, durch intrazelluläre Esterasen desacetyliert und aufgrund der Toleranz der an der Sialinsäurebiosynthese beteiligten Enzyme in *N*-Azidoacetylneuraminsäure umgewandelt und in Sialoglykokonjugate eingebaut.^[3] Präsentiert auf der Zelloberfläche, kann das azidfunktionalisierte sialylierte Glycan durch eine bioorthogonale Ligationsreaktion

sichtbar gemacht werden.^[4] Neben Ac₄ManNAz sind auch *N*-Acetylgalactosamin-,^[5] *N*-Acetylglucosamin-^[6] und *L*-Fucose-Derivate^[7] für das MOE geeignet. Dies ermöglicht weitere Einblicke in die Aufgaben zellulärer Strukturen und die Funktionen von Glycanen in der Zelle.

Derzeit werden vor allem die Staudinger-Ligation^[3] und die Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (kupferkatalysiert^[8] oder ringspannungsvermittelt,^[9] auch Klick-Reaktion genannt) als Ligationsreaktionen für das MOE verwendet. Da jedoch beide auf der Reaktion eines Azides beruhen, können sie nicht für den gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen metabolisch eingebauten Kohlenhydraten genutzt werden. Eine Markierungsstrategie, die in Anwesenheit von Aziden und Alkinen ausgeführt werden kann, würde daher die Anwendungsbreite chemischer Ligationsreaktionen in lebenden Zellen entscheidend erweitern und ist daher von großem Interesse.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DARinv) von 1,2,4,5-Tetrazinen^[10] mit gespannten Dienophilen, wie *trans*-Cyclooctenen,^[11] Cyclobutenen,^[12] Norbornenen,^[11d,f,13] Cyclooctinen^[11d,f] und substituierten Cyclopropenen,^[14] die Anforderungen an eine bioorthogonale Ligationsreaktion erfüllt und außerdem orthogonal zur Azid-Alkin-Cycloaddition ist. Allerdings sind diese cyclischen Alkene oder kinetisch stabile Tetrazine^[15] vermutlich zu groß, um, ausgehend von den entsprechenden *N*-Acylmannosaminderivaten, den Sialinsäure-Biosyntheseweg effizient zu durchlaufen. Auf der Suche nach kleineren, für das MOE geeigneten Dienophilen konnten wir monosubstituierte (terminale) Alkene als neue Klasse chemischer Reporter identifizieren. Vor kurzem haben wir über die erfolgreiche Anwendung der DARinv zwischen terminalen Alkenen und 1,2,4,5-Tetrazinen zur Herstellung von Kohlenhydrat-Mikroarrays berichtet.^[13c] Da terminale Alkene kaum in biologischen Systemen zu finden sind und auch nicht in Proteinen vorkommen, sind sie eine vielversprechende Reportergruppe. Wir zeigen hier, dass ManNAc-Derivate mit einem terminalen Alken in der Acylseitenkette metabolisch in Sialinsäuren auf der Zelloberfläche eingebaut werden und anschließend durch die DARinv markiert werden können (Abbildung 1). Darüber hinaus zeigen wir, dass eine doppelte Markierung von zwei unterschiedlich modifizierten, metabolisch eingebauten Monosacchariden durch Kombination der DARinv mit der ringspannungsvermittelten Azid-Alkin-Cycloaddition (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) möglich ist.

Da die Reaktionsgeschwindigkeit der DARinv von acyclischen Olefinen mit Tetrazinen sehr empfindlich gegenüber

[*] Dipl.-Chem. A. Niederwieser, M. Sc. A.-K. Späte, M. Sc. C. Jüngst, Prof. Dr. V. Wittmann
Universität Konstanz, Fachbereich Chemie und
Konstanz Research School Chemical Biology (KoRS-CB)
78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: mail@valentin-wittmann.de

Dr. L. D. Nguyen, Prof. Dr. W. Reutter
Institut für Biochemie und Molekularbiologie, CBF
Charité Universitätsmedizin
14195 Berlin-Dahlem (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 969), die Universität Konstanz, die Konstanz Research School Chemical Biology, die Wilhelm Sander-Stiftung (L.D.N., W.R.) und die Sonnenfeld-Stiftung, Berlin (L.D.N.) gefördert. Wir danken Prof. M. Wießler für hilfreiche Diskussionen bezüglich der Diels-Alder-Chemie und dem Bioimaging Center der Universität Konstanz und Prof. A. Zumbusch für die Bereitstellung der Fluoreszenzmikroskope.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208991> zu finden.

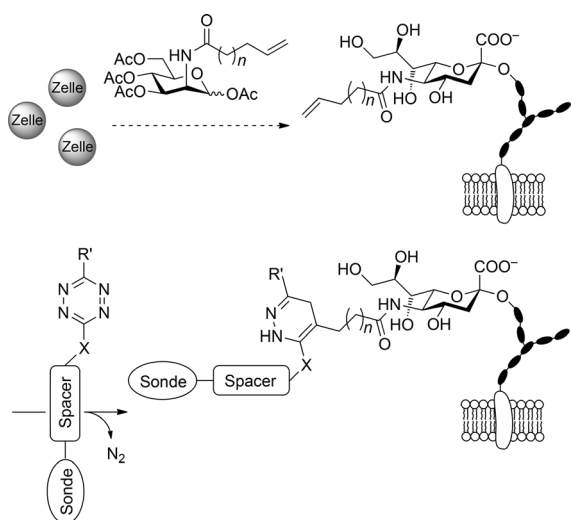


Abbildung 1. Strategie für das MOE mit terminalen Alkenen als chemische Reportergruppen.

sterischer Hinderung ist, reagieren Doppelbindungen mit mehr als einem Substituenten nur sehr langsam.^[16] Terminale Alkene hingegen können auch ohne weitere Aktivierung schnell reagieren. Dies veranlasste uns, die Mannosaminderivate **2** und **4** (Abbildung 2) in drei Schritten ausgehend von

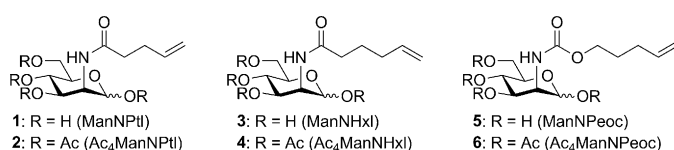
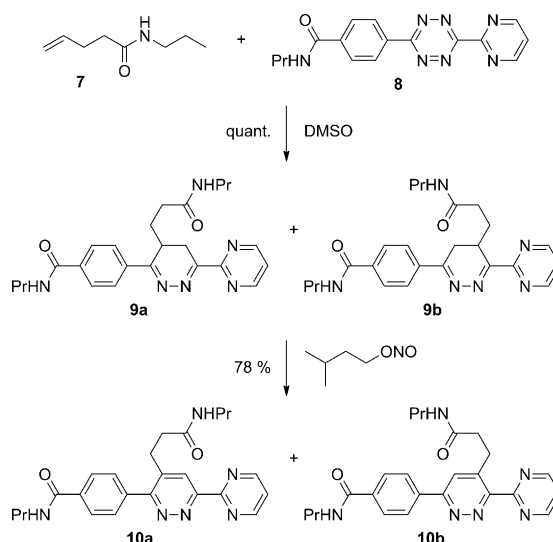


Abbildung 2. Für das MOE verwendete Mannosaminderivate. Hxl = Hexenoyl, Peoc = Pentenyloxycarbonyl, Ptl = Pentenoyl.

Mannosamin-Hydrochlorid zu synthetisieren (siehe die Hintergrundinformationen). Basierend auf früheren Arbeiten von Keppler et al.^[2c] erwarteten wir, dass beide Derivate von Zellen akzeptiert würden, wobei *N*-Pentenoylmannosamin **2** (aufgrund der kürzeren Acylseitenkette) mit höherer Effizienz eingebaut werden sollte. Andererseits sollte die Hexenoylseitenkette des Mannosaminderivats **4** aufgrund des größeren Abstandes zwischen der Doppelbindung und der elektronenziehenden Carbonylgruppe schneller in der DARinv reagieren.

Als Reaktionspartner für die Alkene wählten wir ein diarylsubstituiertes Tetrazin, da zuvor gezeigt worden war, dass diese Verbindungen ausreichend hydrolysestabil sind, was eine wichtige Voraussetzung für die bioorthogonale Chemie ist. In einer Modellreaktion wurde Pentenamid **7** in DMSO mit Tetrazin **8** umgesetzt, wodurch die Dihydropyridazine **9a/b**, die jeweils in mehreren tautomeren Formen vorliegen, in praktisch quantitativer Ausbeute erhalten werden (siehe Schema 1 und die Hintergrundinformationen). LC-MS-Analytik zeigte, dass die Produkte leicht zu den Pyridazinen **10a/b** oxidiert werden. Um die Oxidation zu vervollständigen, wurde **9a/b** mit Isopentylnitrit umgesetzt, und



Schema 1. DARinv von Pentenamid **7** und dem diarylsubstituierten Tetrazin **8**. Es ist nur je eine tautomere Form von **9a/b** gezeigt.

die Pyridazine **10a/b** wurden nach Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 78 % erhalten.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass die Reaktion zwischen einem terminalen Alken und einem Tetrazin in guter Ausbeute verläuft, untersuchten wir die Kinetik dieser Ligationsreaktion. Es ist bekannt, dass die DARinv in Wasser wesentlich schneller abläuft als in organischen Lösungsmitteln.^[17] Daher führten wir einen Tri(ethylenglycol)-Linker ein, um das wasserlösliche Tetrazin **11** zu erhalten (Abbildung 3). Mit dieser Verbindung **11** wurden quantitative kinetische Untersuchungen in wässrigem Puffer mit ManNPtl (**1**) und ManNHxl (**3**) durchgeführt (siehe die Hintergrundinformationen) und Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung von $0.021 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die Pen-

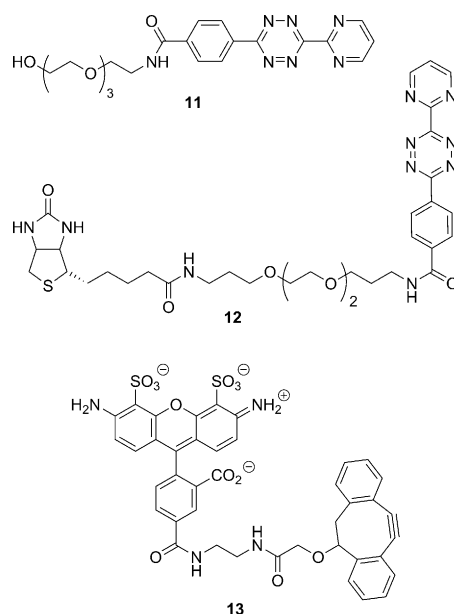


Abbildung 3. Tetrazine und Dibenzocyclooctin-Derivate.

tenoyl- und $0.041\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Hexenoylverbindung bestimmt. Diese Werte indizieren eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit als für die Reaktion mit cyclischen Alkenen, sie sind dennoch vergleichbar mit den Geschwindigkeitskonstanten der Staudinger-Ligation ($k = 0.002\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ 95:5)^[18] und der SPAAC eines Dibenzocyclooctins ($k = 0.0565\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in MeOH)^[19] welche sich beide als sehr wertvolle bioorthogonale Markierungsreaktionen erwiesen haben.^[20]

Um die Eignung der neuen ManNAc-Derivate für das MOE zu prüfen, wurden verschiedene Zelllinien in Anwesenheit von $\text{Ac}_4\text{ManNPTl}$ (**2**) bzw. $\text{Ac}_4\text{ManNHxl}$ (**4**) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Tetrazin-Biotin-Konjugat **12** markiert und mit AlexaFluor-647-markiertem Streptavidin (AF647-Streptavidin) inkubiert. Abbildung 4a

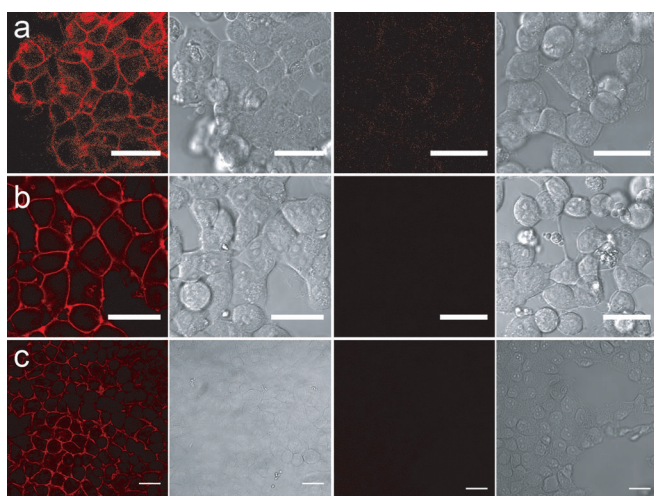


Abbildung 4. a) HEK293T-Zellen wuchsen für 2 Tage mit $\text{Ac}_4\text{ManNPTl}$ (**2**; $100\text{ }\mu\text{M}$) (links) oder ohne **2** (rechts). Lebende Zellen wurden mit Tetrazin-Biotin **12** (1 mM) für 6 h bei 37°C und anschließend mit AF647-Streptavidin für 20 min bei RT inkubiert. b) HEK293T-Zellen wurden behandelt, wie unter (a) beschrieben, aber mit $\text{Ac}_4\text{ManNHxl}$ (**4**) anstatt von $\text{Ac}_4\text{ManNPTl}$ (**2**). c) HeLa-S3-Zellen wuchsen für 3 Tage mit $\text{Ac}_4\text{ManNPeoc}$ (**6**; $100\text{ }\mu\text{M}$) (links) oder ohne **6** (rechts), wurden anschließend mit Paraformaldehyd fixiert und dann wie unter (a) beschrieben behandelt. (Maßstab: $30\text{ }\mu\text{m}$)

zeigt HEK293T-Zellen, die in Anwesenheit von $\text{Ac}_4\text{ManNPTl}$ (**2**) gewachsen waren. Wie erwartet, zeigt eine Untersuchung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie eine intensive Anfärbung der Zellmembran dieser stark sialylierten Zelllinie. Kontrollexperimente, in denen die Zellen in Abwesenheit von **2** kultiviert worden waren aber ansonsten gleichermaßen behandelt wurden, zeigten eine vernachlässigbare Hintergrundfärbung. Dieses wichtige Ergebnis bestätigt, dass das Tetrazin-Biotin-Konjugat **12** unter diesen Bedingungen nicht mit anderen zellulären Komponenten, wie zum Beispiel ungesättigten Lipiden der Zellmembran, reagiert. Entsprechende Ergebnisse von HEK293T-Zellen und $\text{Ac}_4\text{ManNHxl}$ (**4**) sind in Abbildung 4b gezeigt. Interessanterweise führen beide Zucker, **2** und **4**, zu einer gleich intensiven Anfärbung der Zellmembran. Ähnliche Ergebnisse wurden mit HeLa-

S3-Zellen erzielt (siehe Abbildung S15 und S16 in den Hintergrundinformationen).

Bisher enthielten alle im MOE verwendeten Mannosamin-derivate eine Acylseitenkette an der 2-Aminogruppe.^[21] Um zu untersuchen, ob auch andere funktionelle Gruppen den Biosyntheseweg durchlaufen können, setzten wir Pentenylcarbamate **6** ein. Eine Carbamatgruppe hat den Vorteil, dass sie die Synthese funktionalisierter Mannosamine aus Alkoholen wie Pentenol erleichtert. MOE-Experimente mit HeLa-S3-Zellen zeigten, dass $\text{Ac}_4\text{ManNPeoc}$ (**6**) zu einer ähnlich intensiven Membranfärbung führt wie die Zucker **2** und **4** (Abbildung 4c). Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die DARinv von ManNPeoc (**5**) mit Tetrazin **11** wurde zu $0.017\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt.

Als nächstes untersuchten wir die Möglichkeit, die DARinv in Kombination mit der SPAAC anzuwenden, um zwei unterschiedliche metabolisch eingebaute Zucker parallel zu detektieren. HeLa-S3-Zellen wurden in Anwesenheit von sowohl alkenfunktionalisiertem $\text{Ac}_4\text{ManNPTl}$ (**2**) als auch peracetyliertem *N*-Azidoacetylgalactosamin (Ac_4GalNAz ; **14**) kultiviert (Abbildung 5). Während *N*-Acylmannosamin-

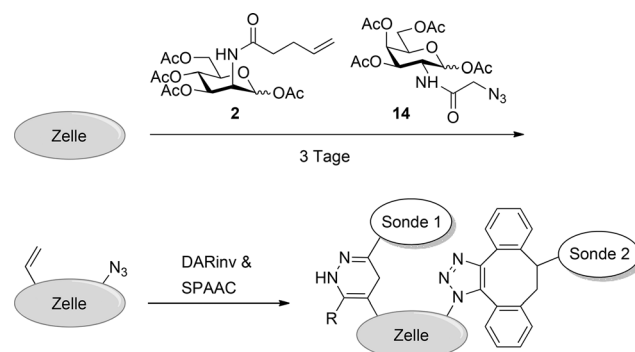


Abbildung 5. Strategie zur Doppelmarkierung durch MOE mit alken- und azidfunktionalisierten Monosacchariden gefolgt von DARinv und SPAAC mit zwei verschiedenen Farbstoffen.

derivate wie **2** biosynthetisch in Sialinsäuren eingebaut werden, die als terminale Strukturen auf Glycoproteinen zu finden sind, wurde gezeigt, dass Ac_4GalNAz (**14**) in O-Glycane vom Mucin-Typ eingebaut wird.^[5a] Als Kontrollexperimente wurden dem Medium nur ein oder kein Zucker zugesetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen sowohl durch DARinv (mit Tetrazin-Biotin **12** und anschließender AF647-Streptavidin-Inkubation) als auch durch SPAAC (mit AlexaFluor-488-Dibenzocyclooctin **13**, AF488-DIBO) angefärbt und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Bei Anwesenheit beider Zucker im Medium konnten wir in beiden Kanälen eine deutliche Anfärbung der Zellmembran detektieren (Abbildung 6b), während die Abwesenheit von einem der beiden Zucker zu ausbleibender Anfärbung der Zellmembran im entsprechenden Kanal führte (Abbildung 6c,d). Interessanterweise war im SPAAC-Kanal eine intrazelluläre Anfärbung zu detektieren, welche wir auf unspezifische Anfärbung zurückführen, da sie ebenso in den Kontrollexperimenten ohne Zugabe von Ac_4GalNAz (**14**) zu

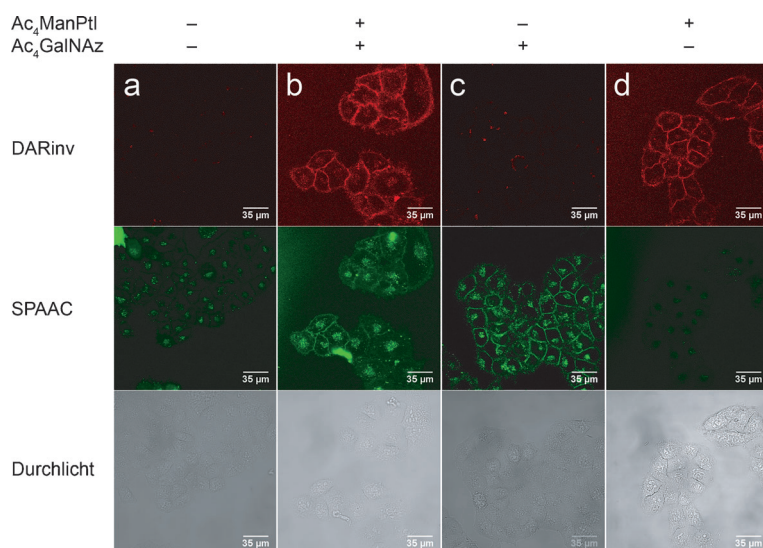


Abbildung 6. a) HeLa-S3-Zellen wurden für 3 Tage kultiviert. Lebende Zellen wurden mit Tetrazin-Biotin **12** (1 mM) für 6 h bei 37°C markiert und anschließend mit AF647-Streptavidin für 20 min bei RT und mit AF488-DIBO (4 µM) für 30 min bei RT inkubiert. b) Zellen wuchsen 3 Tage mit Ac₄ManPtl (**2**; 100 µM) und Ac₄GalNAz (**14**; 25 µM) und wurden dann in gleicher Weise behandelt, wie unter (a) beschrieben. c) Zellen wuchsen 3 Tage mit Ac₄GalNAz (**14**; 25 µM) und wurden dann in gleicher Weise behandelt, wie unter (a) beschrieben. d) Zellen wuchsen 3 Tage mit Ac₄ManPtl **2** (100 µM) und wurden dann in gleicher Weise behandelt, wie unter (a) beschrieben. (Maßstab: 35 µm)

sehen ist (Abbildung 6a,d). Über eine unspezifische Anfärbung durch Cyclooctine wurde bereits berichtet;^[13e] sie könnte durch Addition von SH-Gruppen an die Dreifachbindung^[22] oder von unspezifischer Bindung des Farbstoffs hervorgerufen werden. Im DARinv-Kanal wurde kaum Hintergrundfärbung für die DARinv beobachtet (Abbildung 6a,c). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung von Alkenen und Aziden als chemische Reporter die Detektion von zwei unterschiedlichen metabolisch eingebauten Zuckern in einem Experiment ermöglicht.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass terminale Alkene, eingebaut in *N*-Acylmannosamin, geeignete chemische Reporter für das metabolische Oligosaccharid-Engineering sind. Wegen ihrer geringen Größe, die vergleichbar mit der der bewährten Azid-Reporter ist, werden sie von den Enzymen der Sialinsäurebiosynthese akzeptiert und in Glykokonjugate auf der Zelloberfläche eingebaut. Weiter konnten wir zeigen, dass der Biosyntheseweg auch Mannosederivate mit einer Carbamat-Gruppe akzeptiert. Terminale Alkene können in bioorthogonaler Weise durch eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf, welche keiner Katalyse durch toxische Metalle bedarf, markiert werden. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die DARinv in Anwesenheit von Aziden durchgeführt werden kann, was die gleichzeitige Detektion zweier verschiedener Zucker ermöglicht. Derartige Detektionsstrategien sind wichtig für die fortgeschrittene Glycan-Analytik im „Multiplex“-Verfahren. Da terminale Alkene auch leicht in andere Biomoleküle eingebaut werden können, zum Beispiel in Proteine durch Erweiterung des genetischen Codes, ist unser Markierungs-

ansatz nicht nur auf metabolisches Kohlenhydrat-Engineering beschränkt sondern weithin anwendbar.

Eingegangen am 9. November 2012,
veränderte Fassung am 24. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 6. März 2013

Stichwörter: Bioorthogonale Reaktionen · Klick-Chemie · Kohlenhydrate · Metabolisches Engineering · Tetrazine

- [1] R. Schauer, *Zoology* **2004**, *107*, 49–64.
- [2] a) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Cell* **2006**, *126*, 851–854; b) D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 616–625; c) O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R–18R.
- [3] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [4] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [5] a) H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846–14851; 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*, 3141–3146.
- [6] a) D. J. Voadlo, H. C. Hang, E.-J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9116–9121; b) B. W. Zaro, Y.-Y. Yang, H. C. Hang, M. R. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8146–8151.
- [7] a) D. Rabuka, S. C. Hubbard, S. T. Laughlin, S. P. Argade, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12078–12079; b) 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*, 12371–12376.
- [8] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; b) 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.
- [9] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [10] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885–2896.
- [11] a) M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519; b) N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931–2934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872; c) R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Volders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3447–3450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375–3378; d) K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320; e) M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 944–946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 920–922; f) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4242–4246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166–4170.
- [12] K. Braun, M. Wiessler, V. Ehemann, R. Pipkorn, H. Spring, J. Debus, B. Didinger, M. Koch, G. Müller, W. Waldeck, *Drug Des. Dev. Ther.* **2008**, *2*, 289–301.
- [13] a) N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299; b) J. Schoch, M. Wiessler, A.

- Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8846–8847; c) H. S. G. Beckmann, A. Niederwieser, M. Wiessler, V. Wittmann, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6548–6554; d) K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298–304; e) L. I. Willems, N. Li, B. I. Florea, M. Ruben, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4507–4510; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4431–4434.
- [14] a) J. Yang, J. Šečkutė, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7594–7597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479; b) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638–18643.
- [15] J. L. Seitchik, J. C. Peeler, M. T. Taylor, M. L. Blackman, T. W. Rhoads, R. B. Cooley, C. Refakis, J. M. Fox, R. A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2898–2901.
- [16] F. Thalhammer, U. Wallfahner, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851–6854.
- [17] J. W. Wijnen, S. Zavarise, J. B. F. N. Engberts, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2001–2005.
- [18] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. Van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686–2695.
- [19] N. E. Mbua, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1912–1921.
- [20] a) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676; b) X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.
- [21] J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. P. Paruchuri, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1382–1401.
- [22] R. van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 392–398.