

# Spurlose Herstellung C-terminaler $\alpha$ -Ketosäuren zur chemischen Proteinsynthese mittels $\alpha$ -Ketoäure-Hydroxylamin-Ligation: Synthese von SUMO2/3\*\*

Thomas G. Wucherpennig, Vijaya R. Pattabiraman, Felix R. P. Limberg, Javier Ruiz-Rodríguez und Jeffrey W. Bode\*

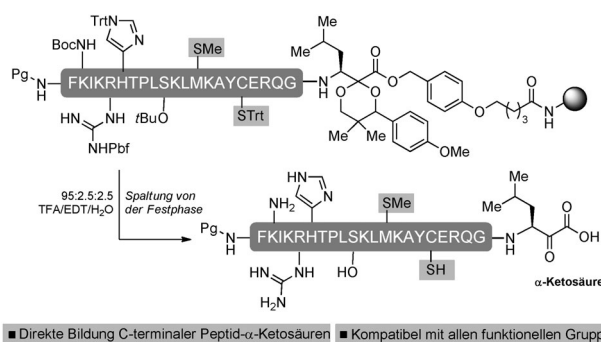
**Abstract:** Eine neue Schutzgruppe für enantiomerenreine  $\alpha$ -Ketosäuren ergibt direkt Peptide mit C-terminalen  $\alpha$ -Ketosäuren bei der Abspaltung von der Festphase und ermöglicht die Gegenwart aller kanonischen Aminosäuren im Peptid, einschließlich Cystein und Methionin. Unter Benutzung dieses Ansatzes und mittels der KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin wurden die Proteine SUMO2 und SUMO3 hergestellt. Die synthetischen Proteine, welche Homoserin-Reste enthalten, wurden durch SUMOlierungsenzyme erkannt und mit RanGAP1 konjugiert.

Die  $\alpha$ -Ketoäure-Hydroxylamin(KAHA)-Ligation ermöglicht die chemische Synthese von Proteinen ausgehend von ungeschützten Peptidsegmenten.<sup>[1]</sup> Sie bietet eine Alternative zur etablierten nativen chemischen Ligation (NCL) von Kent und Mitarbeitern.<sup>[2]</sup> Die KAHA-Ligation benötigt keinen Cystein-Rest und ermöglicht die Ligation unter sauren wässrigen Bedingungen, welche für die Solubilisierung von Peptidfragmenten gut geeignet sind. Die KAHA-Ligation toleriert ungeschützte Peptidseitenketten und wurde zur Synthese der Proteine Pup, cspA und UFM1 mittels Zwei- oder Drei-Segment-Ligationsstrategien benutzt.<sup>[3]</sup>

Die beste Implementation dieser Ligation nutzt einen 5-Oxaprolin-Rest am N-Terminus eines Segments, der einen nichtnatürlichen, aber unschädlichen Homoserin-Rest (T<sup>8</sup>) an der Ligationsstelle ergibt.<sup>[4]</sup> Das direkte Produkt der KAHA-Ligation mit 5-Oxaprolin ist ein Ester, der jedoch bereitwillig in basischem Puffer zum Amid umlagert.<sup>[5]</sup> Für die C-Termini

anderer Peptidsegmente können verschiedene  $\alpha$ -Ketosäuren wie Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Arginin, Glutaminsäure oder Alanin genutzt werden. Die Herstellung der  $\alpha$ -Ketosäure beruht auf der Oxidation eines Cyanschweifels-Ylids.<sup>[6]</sup> Diese Oxidation ist schnell und verlässlich; sie ist jedoch nicht mit Segmenten kompatibel, die Cystein- oder Methionin-Reste enthalten, und Tryptophan kann auch problematisch sein. Weiterhin wird dadurch ein weiterer Schritt nach der Festphasensynthese benötigt.

Hier stellen wir eine geschützte Form der Leucin- $\alpha$ -Ketosäure vor, die nach der Abspaltung von der Festphase unmittelbar die entsprechenden Peptid- $\alpha$ -Ketosäuren ergibt (Schema 1). Es werden keine weiteren Schritte nach der



**Scheme 1.** Eine Schutzgruppe zur spurlosen Herstellung von Peptid- $\alpha$ -Ketosäuren mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese.

Festphasensynthese benötigt, und diese Methode toleriert alle Seitenketten, einschließlich Cystein, Methionin und Tryptophan. Im Rahmen unserer Studien über Modifikationsproteine<sup>[7]</sup> synthetisierten wir SUMO3 mittels einer Drei-Segment-Strategie und SUMO2 mit Propeptid mittels einer Vier-Segment-Strategie unter Einbeziehung unserer neuen Methode. Diese Arbeit ergänzt die kürzlich erschienene, elegante Synthese von SUMO1 durch Melnyk und Mitarbeiter mittels NCL.<sup>[8]</sup> Zusätzlich zur Dokumentation eines neuen Synthesewegs für Peptid- $\alpha$ -Ketosäuren zeigt diese Arbeit 1) die Durchführbarkeit der KAHA-Ligation in Gegenwart von ungeschützten Cysteinresten, 2) die Ligation mit Valin- $\alpha$ -Ketosäuren und 3) den Nachweis, dass synthetisches SUMO2 und SUMO3 mit mehreren Homoserin-Resten biologisch aktiv ist.

Eine spurlose Schutzgruppe zur Synthese von C-terminalen Peptid- $\alpha$ -Ketosäuren muss die folgenden Kriterien er-

[\*] T. G. Wucherpennig, Dr. V. R. Pattabiraman, F. R. P. Limberg, Dr. J. Ruiz-Rodríguez, Prof. Dr. J. W. Bode  
Laboratorium für Organische Chemie  
Department of Chemistry and Applied Biosciences  
ETH Zürich, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: bode@org.chem.ethz.ch  
Homepage: <http://www.bode.ethz.ch>

Prof. Dr. J. W. Bode

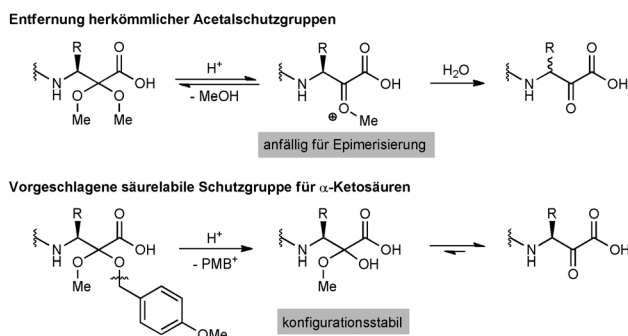
Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM)  
Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8602 (Japan)  
Homepage: <http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp>

[\*\*] Diese Arbeit wurde unterstützt durch ETH Research Grant (ETH-43 13–2) und den Schweizerischen Nationalfonds (200020\_150073). Wir danken dem Massenspektrometrieservice des Laboratoriums für Organische Chemie der ETH Zürich und dem Functional Genomics Center Zürich für Analysen und Michele Mari für die Synthese eines SUMO3-Segments.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407014> zu finden.

füllen: 1) Sie muss stabil gegenüber den Reagentien und basischen Bedingungen der Festphasensynthese sein, 2) sie muss unter den sauren Bedingungen während der Abspaltung von der Festphase entfernt werden, um direkt die C-terminale Peptid- $\alpha$ -Ketosäure mit ungeschützten Seitenketten zu ergeben, 3) sie muss durch einen Mechanismus, der nicht zu Epimerisierung führt, entschützt werden, und 4) sie muss einfach in genügend großem Maßstab herstellbar und mittels eines geeigneten Linkers an die Festphase kuppelbar sein.<sup>[9]</sup> Zur Entwicklung der geschützten  $\alpha$ -Ketosäuren fokussierten wir uns zuerst auf Schützungen der Fmoc-Leucin- $\alpha$ -Ketosäure **1**, da Leucin einerseits die bei weitem häufigste Aminosäure in Proteinen ist<sup>[10]</sup> und andererseits keine Funktionalitäten in der Seitenkette enthält, welche möglicherweise die Schützung der  $\alpha$ -Ketosäure behindern könnten.<sup>[11]</sup>

Zu Beginn unserer Studien waren wir insbesondere wegen einer möglichen Epimerisierung besorgt. Die einfachste Schützung – Maskierung der Ketogruppe als acyclisches Dimethylacetal – war möglich, resultierte jedoch in einigen Fällen in partieller Epimerisierung während der Abspaltung von der Festphase (Schema 2). Wir postulierten, dass eine



**Schema 2.** Design einer Schutzgruppe für  $\alpha$ -Ketosäuren, die ohne Epimerisierung entfernt werden kann.

Schutzgruppe, die durch einen Mechanismus, der ein Halbacetal anstatt eines Oxonium-Ions involviert, dieses Problem vermeiden könnte.<sup>[12]</sup> Trotz vieler Versuche konnten wir die einfachsten Implementationen dieses Designs, Mono- bzw. Di-*para*-methoxybenzylacetale, nicht herstellen. Dies veranlasste uns, verschiedene 1,2 und 1,3-Diole, die cyclische Acetale ergeben würden, zu untersuchen (Tabelle 1).

Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass 1,2-Diol-Derivat **3a** die geschützte Leucin- $\alpha$ -Ketosäure **4a** ergab, jedoch in schlechter Ausbeute.<sup>[13]</sup> Hydroxythiol **3b** ergab das Produkt **4b** ebenfalls in schlechter Ausbeute. Anders als das Oxo-Derivat **4a** war die Entschützung von **4b** unter den gewünschten Bedingungen nicht erfolgreich, was wir auf die höhere Stabilität des O,S-Acetals verglichen mit dem O,O-Acetal zurückführen.<sup>[14]</sup> Der Einsatz des 1,3-Diol-Derivats **3c** brachte keinen Vorteil. Durch Einführung des 4-Brom-Substituenten wurde das aromatische System in **3d** elektronenärmer; dies führte zu einer gesteigerten Ausbeute an **4d**, jedoch war die Entschützung nicht möglich. Versuche, **4d** durch Cu- oder Pd-katalysierte Reaktionen zu derivatisieren, waren nicht erfolgreich.<sup>[15]</sup> Die vom *gem*-Dimethyl-1,3-Diol-

**Tabelle 1:** Untersuchung verschiedener Schutzgruppen für  $\alpha$ -Ketosäuren.<sup>[a]</sup>

Schutzgruppe	2	4a	4b	4c
Ausbeute der Schützung	20% <sup>[b]</sup>	< 5%	< 5%	< 5%
Entschützung	Ja	Ja	Nein	Ja
Epimerisierung <sup>[c]</sup>	Ja	–	–	–

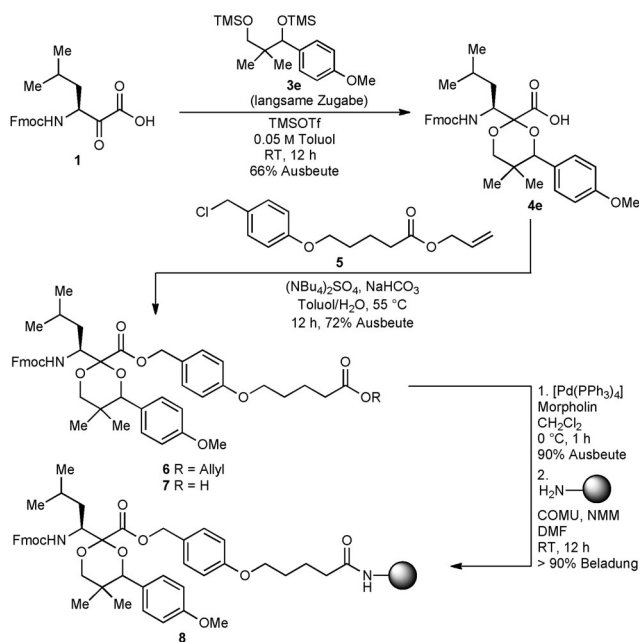
  

Schutzgruppe	4d	4e	4f
Ausbeute der Schützung	29%	28% <sup>[d]</sup>	N.R.
Entschützung	Nein	Ja	–
Epimerisierung <sup>[c]</sup>	–	Nein	–

[a] Siehe die Hintergrundinformationen für eine vollständige Liste untersuchter Schutzgruppen. [b] Hergestellt aus **1**, Orthoameisensäuretrimethylester und Schwefelsäure. [c] Bestimmt durch HPLC nach Ligation der entschützten  $\alpha$ -Ketosäure. [d] Nicht optimierte Ausbeute. [e] Ausbeute nach Optimierung. PMP = 4-Methoxyphenyl.

Derivat **3e** abgeleitete Schutzgruppe ergab die geschützte  $\alpha$ -Ketosäure in besserer Ausbeute und ermöglichte eine einfache Entschützung zurück zur  $\alpha$ -Ketosäure ohne Epimerisierung. Um die Bildung von Diastereomeren aufgrund der racemischen Schutzgruppe zu vermeiden, versuchten wir die Schützung mit dem *meso*-1,3-Diol-Derivat **3f**, diese war jedoch nicht erfolgreich. Aufgrund dieser Ergebnisse entschieden wir uns, die *gem*-Dimethyl-Verbindung **3e** für die weitere Optimierung der Schützungsreaktion zu verwenden (siehe die Hintergrundinformationen). Vorsichtige Justierung der Reaktionsbedingungen und Überprüfung gebildeter Nebenprodukte ergab ein optimiertes Verfahren, wobei die Ausbeute von 28% auf 66% stieg. Zwar wird aufgrund der racemischen Schutzgruppe **3e** die geschützte Leucin- $\alpha$ -Ketosäure **4e** als Gemisch von Diastereomeren erhalten; die Schutzgruppe wird jedoch während der Abspaltung von der Festphase spurlos entfernt, und es wird die enantiomerenreine C-terminale Leucin- $\alpha$ -Ketosäure erhalten. Die einfache Verfügbarkeit sowohl der Leucin- $\alpha$ -Ketosäure **1** als auch der racemischen Schutzgruppe **3e** und die Möglichkeit, die Schützungsreaktion auf Dekagramm-Skala durchzuführen, machen dieses Protokoll geeignet, um genügend geschützte Leucin- $\alpha$ -Ketosäure für den Routineinsatz in der Proteinsynthese herzustellen.

Die geschützte Leucin- $\alpha$ -Ketosäure **4e** wurde durch Alkylierung mit Benzylchlorid **5** an einen Wang-Linker<sup>[16]</sup> ge-



**Schema 3.** Synthese und Immobilisierung der geschützten Leucin- $\alpha$ -Ketosäure **4e**.

kuppelt und anschließend durch Entfernung der Allylgruppe in die freie Carbonsäure **7** umgewandelt (Schema 3). Immobilisierung von **7** auf gewöhnlicher, aminfunktionalisierter Polystyrol- oder Polyethylenglycol-Festphase ergab ein stabiles, lagerbares Harz, das bei saurer Abspaltung direkt Peptide mit C-terminalen  $\alpha$ -Ketosäuren ergibt. Ein wichtiger Aspekt zur Benutzung dieser Strategie in der Fmoc-Festphasensynthese war die Entwicklung eines Reagentiengemisches, welches das ungeschützte  $\alpha$ -Ketosäure-Peptid freisetzt, ohne die  $\alpha$ -Ketosäure zu reduzieren oder anderweitig zu modifizieren.<sup>[17]</sup>

Bestimmte üblicherweise benutzte Abfangreagentien wie Ethanthiol oder Thiophenol führten zu Thioacetaladdukten oder ineffektivem Abfangen. Wir fanden jedoch, dass die geruchlosen Substanzen 2,2'-(Ethyldioxy)diethanthiol (DOT)<sup>[18]</sup> oder 1,2-Ethandithiol (EDT) als effektive Abfangreagentien fungieren und die ungeschützte Peptid- $\alpha$ -Ketosäuren ergeben, die durch HPLC aufgereinigt und für Monate als lyophilisierte Pulver aufbewahrt werden können.

Um die Nützlichkeit der geschützten Leucin- $\alpha$ -Ketosäure zu demonstrieren, nutzten wir sie in der Synthese der Modifikationsproteine SUMO2 und SUMO3. Für SUMO3 entschieden wir uns für Ligationen zwischen Val29-Gln30 und Leu52-Ser53, was bei Benutzung von 5-Oxaprolin in der Ligation zwei Mutationen ergeben würde: Q30T<sup>§</sup> und S53T<sup>§</sup>. Diese Strategie reduziert die Synthese von SUMO3 auf drei Segmente mit jeweils etwa 30 Aminosäureresten. Für die Synthese des etwas längeren SUMO2 mit Propeptid wurde eine Vier-Segment-Strategie mit den Ligationspositionen Val30-Gln31, Leu53-Ser54 und Leu76-Glu77 ausgewählt, was zu insgesamt drei Homoserinen im finalen Protein führen würde.

Die Segmente wurden zum SUMO2/3-Protein mittels Drei- oder Vier-Segment-Ligationen zusammengefügt wie in

Schema 4 A gezeigt. Bei der Synthese von SUMO3 (53–92) **12** und SUMO2 (54–76) **10** war die Benutzung von Fmoc-Asp-(OrBu)-N(Dmb)Gly-OH während der Festphasensynthese von großer Bedeutung, um Aspartimid-Nebenprodukte zu vermeiden. Für das längere SUMO2 mit Propeptid wählten wir eine Vier-Segment-Ligationsstrategie, welche die bifunktionelle  $\alpha$ -Ketosäure **10** – hergestellt mit der geschützten Leucin- $\alpha$ -Ketosäure-Festphase **8** – und das Oxaprolinsegment **9** benötigt. Die Ligation lieferte problemlos das Esterprodukt, und der O-zu-N-Acyltransfer bei pH 9.5 gefolgt von Fmoc-Entschützung ergab nach HPLC-Aufreinigung SUMO2 (54–95) **11**.

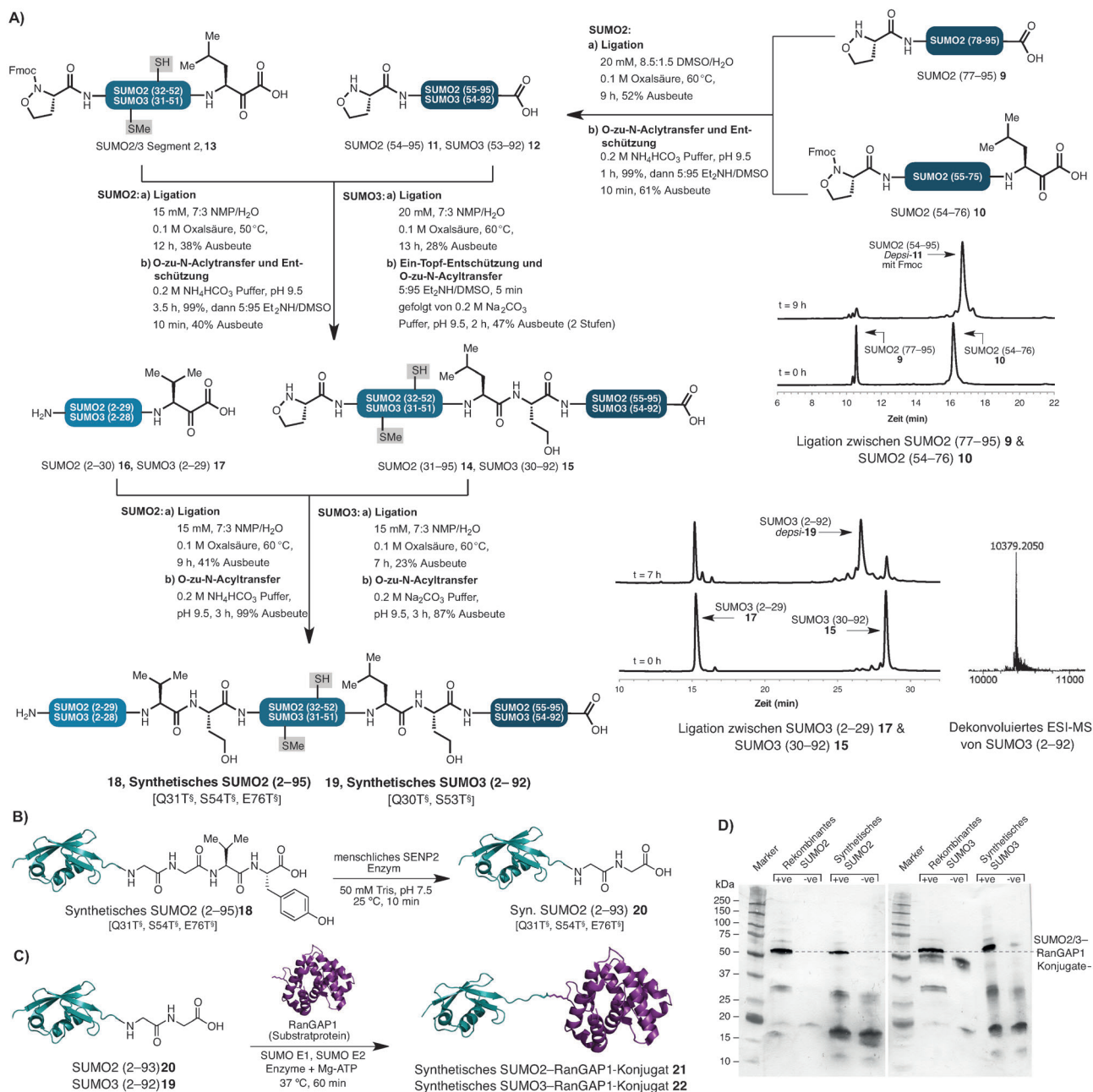
Die mittleren Bereiche von SUMO2 und SUMO3 enthalten Cystein- und Methioninreste und haben eine identische Sequenz gemein. Diese Fmoc-geschützte Peptid- $\alpha$ -Ketosäure **13** wurde mittels unserer neuentwickelten Festphase **8** hergestellt. Die Ligationen mit den entsprechenden Oxaprolinsegmenten von SUMO2 (54–95) **11** beziehungsweise SUMO3 (53–92) **12** verliefen ohne Besonderheiten und ergaben SUMO2 (31–95) *Depsi*-**14** oder SUMO3 (30–92) *Depsi*-**15**. Die Ester wurden problemlos in die Amide umgewandelt, entweder durch eine Ein-Topf-Sequenz von Fmoc-Entschützung und O-zu-N-Acyltransfer oder mittels einer zweistufigen Sequenz. Dies sind die ersten veröffentlichten Beispiele der KAHA-Ligation in Gegenwart von ungeschützten Cysteinresten. Während der Durchführung dieser Ligationen beobachteten wir, dass destilliertes und entgastes NMP/H<sub>2</sub>O meist bessere Ergebnisse erbrachte als DMSO/H<sub>2</sub>O-Mischungen, vermutlich aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von Cystein- und Methioninresten in DMSO.

Die C-terminale Valin- $\alpha$ -Ketosäure SUMO2 (2–30) **16** und SUMO3 (2–29) **17** wurden durch Oxidation der entsprechenden Cyanschweif-Ylide hergestellt, basierend auf unserem zuvor beschriebenen Linker.<sup>[6]</sup> Trotz der sterisch anspruchsvolleren Valin- $\alpha$ -Ketosäure erreichten die finalen Ligationen mit SUMO2 (2–30) **16** oder SUMO3 (2–29) **17** nach 10 Stunden maximalen Umsatz. Die Zielproteine SUMO2 (2–95) **18** und SUMO3 (2–92) **19** wurden nach O-zu-N-Acyltransfer zur Umwandlung der Ester zu den Amidien erhalten. Die Möglichkeit, Valin- $\alpha$ -Ketosäure in der KAHA-Ligation einzusetzen, erhöht die Zahl an möglichen Schnittstellen zur chemischen Proteinsynthese.

Zur Demonstration, dass zwei oder drei Homoserinreste in synthetischem SUMO3 **19** oder SUMO2 **18** weder die Struktur noch die Funktion der Proteine beeinträchtigen, wurden biochemische Studien durchgeführt. Die SUMO-Protease SENP2 benötigt, anders als viele andere Proteasen, die charakteristische SUMO-Faltung um ihre proteolytische Funktion durchführen zu können.<sup>[19]</sup> Zur Prüfung, ob SUMO2 (2–95) **18** mit Propeptid von SENP2 erkannt und prozessiert werden würde, wurde das synthetische Protein **18** bei pH 7.5 in Tris-Puffer inkubiert, um die Proteinfaltung zu ermöglichen, und anschließend wurde menschliche SENP2-Protease zugegeben. Innerhalb von wenigen Minuten wurde pro-SUMO2 (2–95) **18** vollständig in das aktive SUMO2 (2–93) **20** umgewandelt und das C-terminale Gly-Gly-Motiv freigesetzt (Schema 4B). Dies zeigt, dass das synthetische SUMO2-Protein **18** mit drei Homoserinresten die charakteristische SUMO-Faltung, ähnlich wie das Wildtypprotein, einnimmt.



SUMO2: A<sub>2</sub>DEKPKGV<sub>10</sub>KTENNHNIL<sub>20</sub>KVAGQDGSVV<sub>30</sub>-QFKIKRHTPL<sub>40</sub>SKLMKAYCER<sub>50</sub>QGL-SMRQIRF<sub>60</sub>RFDGQPINET<sub>70</sub>TPAQL-EMED<sub>80</sub>EDTIDVFQQQ<sub>90</sub>TGGVY<sub>95</sub> (mit Propeptid)  
SUMO3: S<sub>2</sub>EKKPKGV<sub>10</sub>KTENNHNIL<sub>20</sub>VAGQDGSVV<sub>30</sub>-QFKIKRHTPL<sub>40</sub>SKLMKAYCER<sub>50</sub>QGL-SMRQIRF<sub>60</sub>RFDGQPINET<sub>70</sub>TPAQL-EMED<sub>80</sub>EDTIDVFQQQ<sub>90</sub>TGGVY<sub>95</sub> (ohne Propeptid)



**Schema 4.** A) Synthese von SUMO2- und SUMO3-Proteinen durch sequenzielle KAPA-Ligationen. B) Biochemische Prozessierung von SUMO2 18 mit Propeptid zur aktiven Form durch SENP2-Enzym. C) In-vitro-Konjugation von synthetischen SUMO2/3 an RanGAP1 mit SUMOlierungsenzymen. D) Western-Blot-Analyse von SUMOlierungsreaktionen von synthetischen SUMO-Proteinen mit SUMO2/3-Antikörpern. Die Bande des SUMO2/3-RanGAP1-Konjugates erscheint bei ca. 50 kDa auf dem Western-Blot.

Zur weiteren Bewertung, ob die SUMO-Aktivierungs- und -Konjugationsenzyme das SENP2-prozessierte SUMO2 (2-93) **20** oder das synthetische SUMO3 (2-92) **19** erkennen und ein Protein von Interesse, RanGAP1, SUMOlieren würden, führten wir in vitro SUMOlierungsreaktionen durch (Schema 4C).<sup>[20]</sup> Auftrennung der Produkte der enzymatischen Reaktion gefolgt von Western-Blot mittels eines SUMO2/3-Antikörpers zeigte, dass die synthetischen SUMO2/3-Proteine ohne Weiteres von den SUMOlierungs-

enzymen erkannt und das synthetische SUMO2-RanGAP1-Konjugat **21** bzw. das SUMO3-RanGAP1-Konjugat **22** gebildet wird (Schema 4D). Diese Resultate zeigen weiterhin, dass synthetische SUMO2/3-Proteine mit den Homoserin-Mutationen<sup>[21]</sup> volle Aktivität wie die natürlichen SUMO2/3-Proteine zeigen.

Zusammengefasst haben wir eine Schutzgruppe für  $\alpha$ -Ketosäuren entwickelt, die den Einbau aller kanonischen Aminosäuren, einschließlich Cystein, Methionin und Tryptophan,

während der Festphasensynthese ermöglicht und die nach der Abspaltung von der Festphase direkt C-terminale Peptid- $\alpha$ -Ketosauren ergibt. Wir haben diese neue Festphase erfolgreich für die Synthese von  $\alpha$ -Ketosaure-Segmenten genutzt und daraus SUMO2/3-Proteine mittels sequenzieller KAHALigationen hergestellt. Weiterhin haben wir den biochemischen Nachweis erbracht, dass die durch die KAHALigation eingeführten Homoserinreste die In-vitro-Erkennung und Prozessierung durch die SUMOlierungsmaschinerie nicht beeinträchtigen.

Eingegangen am 8. Juli 2014

Online veröffentlicht am 22. September 2014

**Stichwörter:** Amide · Ligation · Proteinmodifikation · Proteinsynthesen · Schutzgruppen

- [1] a) J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248–1252; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1270–1274; b) J. Wu, J. Ruiz-Rodriguez, J. M. Comstock, J. Z. Dong, J. W. Bode, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1976–1979.
- [2] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779; b) S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338–351; c) P. E. Dawson, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 862–867; d) T. Moyal, H. P. Hemantha, P. Siman, M. Refua, A. Brik, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2496–2501; e) J. S. Zheng, S. Tang, Y. K. Qi, Z. P. Wang, L. Liu, *Nat. Nanotechnol. Nat. Protocols* **2013**, *8*, 2483–2495; f) L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7001–7015; g) H. P. Hemantha, N. Narendra, V. V. Sureshbabu, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9491–9537; h) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228.
- [3] A. O. Ogunkoya, V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9693–9697; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9831–9835.
- [4] V. R. Pattabiraman, A. O. Ogunkoya, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5114–5118; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5204–5208.
- [5] T. G. Wucherpfennig, F. Rohrbacher, V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, DOI: 10.1002/anie.201406097; *Angew. Chem.* **2014**, DOI: 10.1002/ange.201406097.
- [6] 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.
- [7] a) M. Hochstrasser, *Nature* **2009**, *458*, 422–429; b) R. T. Hay, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 1–12; c) A. Flotho, F. Melchior, *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 357–385; d) R. Geiss-Friedlander, F. Melchior, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 947–956.
- [8] E. Boll, H. Drobecq, N. Ollivier, L. Raibaut, R. Desmet, J. Vicoigne, O. Melnyk, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2017–2022.
- [9] a) C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246–249; b) I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247–3256.
- [10] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines in *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, Vol. 34, Annual Reviews, Palo Alto, **2005**, S. 91–118.
- [11] Die Herstellung anderer Peptid- $\alpha$ -Ketosauren wird momentan entwickelt und wird bald veröffentlicht werden.
- [12] E. H. Cordes, H. G. Bull, *Chem. Rev.* **1973**, *74*, 581–603.
- [13] T. Tsunoda, M. Suzuki, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1357–1358.
- [14] a) D. P. N. Satchell, R. S. Satchell, *Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19*, 55–81; b) J. L. Jensen, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1476–1488.
- [15] a) C. W. Cheung, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3998–4001; b) R. A. Altman, A. Shafir, A. Choi, P. A. Lichtor, S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 284–286.
- [16] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328–1333.
- [17] D. S. King, C. G. Fields, G. B. Fields, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 255–266.
- [18] A. Teixeira, W. E. Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. Valentijn, J. W. Drijfhout, *Protein Pept. Lett.* **2002**, *9*, 379–385.
- [19] a) D. Reverter, C. D. Lima, *Structure* **2004**, *12*, 1519–1531; b) D. Reverter, C. D. Lima, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 1060–1068.
- [20] A. Werner, M. C. Moutty, U. Moller, F. Melchior, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *497*, 187–199.
- [21] L. Baumann, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9550–9553; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9729–9732.