

# Strategien zur Proteinsynthese vereinigen sich mit der nativen chemischen Ligation

Derek Macmillan\*

### Stichwörter:

Festphasensynthesen · Native chemische Ligation · Peptide · Proteinsynthese · Thiol-Hilfsgruppen

In den letzten Jahren stieg das Interesse an Technologien zum Aufbau von Proteinen, wie der nativen chemischen Ligation (NCL)<sup>[1]</sup> und der Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL).<sup>[2]</sup> NCL umfasst die chemoselektive Kupplung zweier Proteinfragmente, bei der das eine Fragment einen C-terminalen Thioester und das andere einen N-terminalen Cysteinrest trägt. Durch die Kupplungsreaktion wird an der Ligationsstelle eine native Peptidbindung eingeführt (Schema 1a). Die NCL hat sich als leistungsstarke Technologie in der Proteinsynthese durchgesetzt, da die Reaktion ohne Schutzgruppen und in wässriger Lösung ausgeführt werden kann. Im Jahr 1999 wurde über eine Modifikation des „Safety-catch“-Sulfonamidlinkers von Kenner berichtet, durch die es gelang, Peptide, die unter Anwendung von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppen synthetisiert worden waren, als Thioester von der Festphase abzuspalten. Dadurch wurde das Problem gelöst, dass Thioester gewöhnlich an Thioesterharzen als Festphasen mit *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppen präpariert wurden. Die stark sauren Bedingungen bei der N- $\alpha$ -Entschützung und der Abspaltung der Peptide von der Festphase sind selten kompatibel mit modifizierten Peptiden wie Glycopeptiden. Fmoc-Verfahren für die Glycopeptidsynthese sind wiederum nicht mit

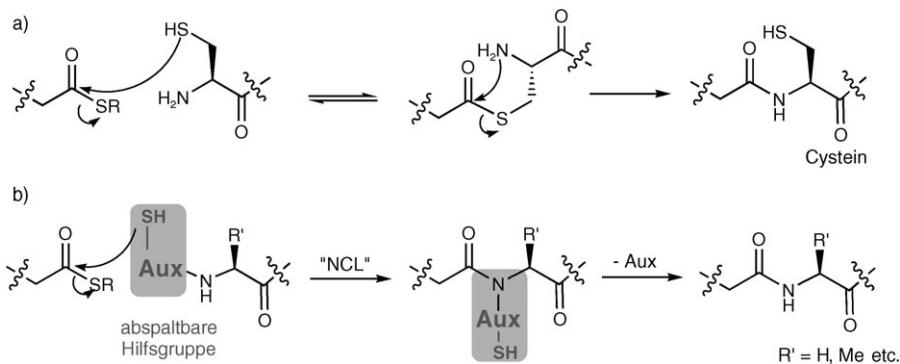
Thioesterharzen kombinierbar, da Thioester durch Piperidin gespalten wurden. Die Verwendung von „Safety-catch“-Verbindungen öffnete daher einen Zugang zu Glycopeptidthioestern in der NCL durch Fmoc-Protokolle. Dies wurde erstmals von Bertozzi und Mitarbeitern durch die Synthese von Diperticin gezeigt.<sup>[3]</sup> Seitdem wurde über andere indirekte Methoden zur Produktion von Peptidthioestern mit Fmoc-Schutzgruppen berichtet. In Kombination mit der Entwicklung der EPL,<sup>[2]</sup> einer zu NCL analogen Reaktion, die aber mikrobiologisch hergestellte Thioester oder Komponenten mit N-terminalem Cystein verwendet, haben diese Fortschritte zum verbreiteten Einsatz von Proteinchemie in chemischer Biologie und Materialwissenschaft beigetragen, weil die Intoleranz gegen posttranskriptionale Modifikationen und Einschränkungen bezüglich der Fragmentgröße (bislang ungefähr 50 Aminosäuren) überwunden wurden. NCL wurde besonders von Wissenschaftlern aufgegriffen, die sich mit posttranslationalen modifizierten (z. B. glycosylierten oder phosphorylierten) Proteinen beschäftigen, da eine Versorgung mit ausreichend homogenem Material durch biologische Quellen nicht gewährleistet ist. Ein weiterer Vorteil von NCL besteht darin, dass die Konstruktion vollständig nativer Strukturen durch eine chemische Synthese möglich wird. So kann man die Position, Zahl und Art der Oligosaccharide in der Sequenz glycosylierter Proteine genau festlegen. Viele Modifizierungsverfahren für mikrobiologisch gewonnene Proteine sind weder ortsspezifisch (etwa der Angriff von Lysinresten durch reduktive Aminierung) noch führen sie zu nichtnatürlichen Strukturen (z. B. zu Proteinen, die selektiv an Cysteinresten mit  $\alpha$ -Haloacetamiden modifiziert sind).

Trotz dieser Fortschritte bestehen gewisse Einschränkungen der NCL und EPL noch heute. So muss ein N-terminaler Cysteinrest vorliegen, da die Cysteinreste selten in für die NCL geeigneter Weise über die Peptidsequenz verteilt sind. Außerdem ist die Methode nicht vollkommen konvergent, und mehrere Peptidfragmente werden vom C-Terminus zum N-Terminus aneinandergereiht. Dies folgt daraus, dass der C-terminale Thioester unter den typischen Reaktionsbedingungen nicht generell kompatibel mit dem N-terminalen Cysteinrest im selben Molekül ist. Daher werden mehrere Ligations-Entschüttungs-Zyklen benötigt, um lange Peptidsequenzen zu erzeugen. Einige aktuelle Beiträge, die sich mit dieser Problematik auseinandersetzen, werden im Folgenden diskutiert.

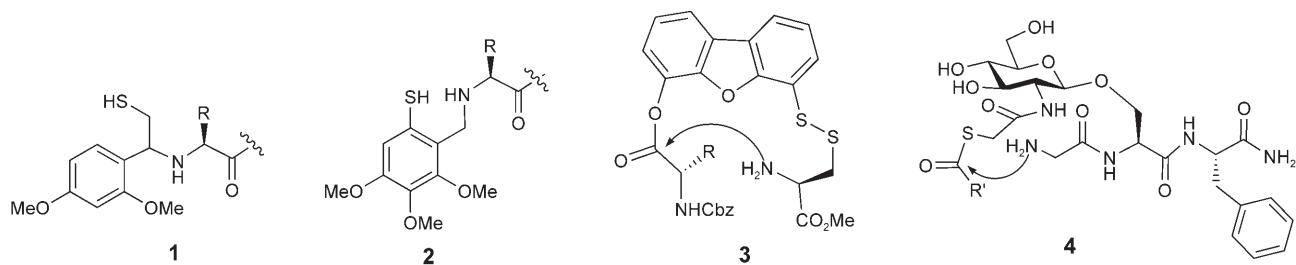
Die erste Einschränkung (das Vorhandensein von Cysteinresten) wurde Ende der 1990er zunächst durch die Entwicklung von Thiol-Hilfsgruppen wie **1**<sup>[4]</sup> und **2**<sup>[5]</sup> umgangen (Abbildung 1). Um die Ligation zu ermöglichen, können diese Hilfsgruppen am N-Terminus eines synthetischen Peptids angebracht werden. Anschließend können sie durch Trifluoressigsäure (TFA) leicht entfernt werden (Schema 1b). Überraschenderweise haben Thiol-Hilfsgruppen keine breite Anwendung gefunden; statt dessen wurde über ihre Substratbreite (welche Aminosäuren werden als endständige Reste an der Thioester- und der Hilfsgruppen-tragenden Komponente toleriert), die Größe des Übergangszustands und ihre Abspaltbarkeit diskutiert. Danishefsky

[\*] Dr. D. Macmillan

Department of Chemistry  
University College London  
Christopher Ingold Laboratories  
20 Gordon Street  
London WC1H 0AJ (Großbritannien)  
E-Mail: d.macmillan@ucl.ac.uk



**Schema 1.** Vergleich von NCL und Hilfsgruppen-vermittelter Ligation. a) Der gemeinhin anerkannte Mechanismus der NCL: Auf die geschwindigkeitsbestimmende Thioesterübertragung folgt eine schnelle S→N-Acylverschiebung durch einen fünfgliedrigen cyclischen Übergangszustand. B) Hilfsgruppen-vermittelter Ligation: Eine Thiol-substituierte Hilfsgruppe steuert die NCL-artige Reaktion und wird schließlich abgespalten. So werden Ligationen auch an anderen Stellen als X-Cys möglich. Aux = Hilfsgruppe.



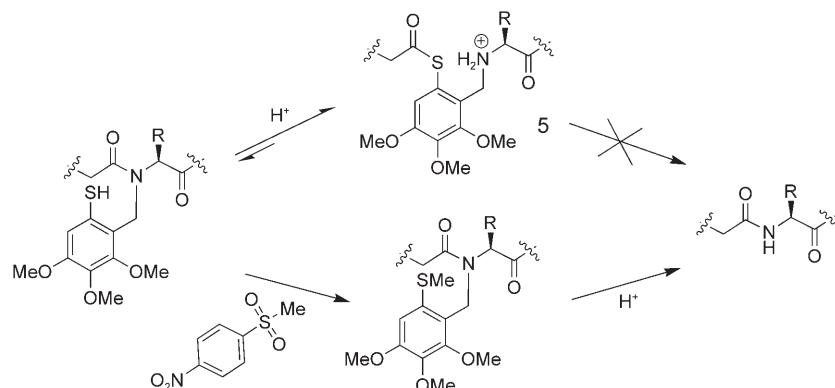
**Abbildung 1.** Hilfsgruppen für die NCL (**1**), 1-Aryl-2-Mercaptoethyl-Hilfsgruppen (**2**),<sup>[4]</sup> Tmb-Hilfsgruppen (**3**)<sup>[5]</sup> und das Dibenzofuran-Gerüst **4** von Kemp et al. zum Studium der Thiol-Ligation.<sup>[8]</sup> Mit Ausnahme von **3** reagieren alle Gruppen gemäß der Sequenz Thiol/Thioester/S→N-Acylverschiebung analog zur NCL. Cbz = Benzoyloxycarbonyl.

und Mitarbeiter haben unlängst die Thiol-Hilfsgruppe 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptopbenzyl (Tmb, **2**) verwendet, die ursprünglich von Dawson und Mitarbeitern entwickelt wurde,<sup>[5]</sup> um Glycopeptide, die an Asparaginreste gebundene Saccharide enthalten, durch Glycin-Glutamin-Ligation zu verketten (über 58% Ausbeute).<sup>[6]</sup> Dadurch wurde nachgewiesen, dass sich solche Hilfsgruppen nicht nur für die Glycin-Glycin-Ligation eignen; mindestens einer der beiden Reste sollte aber Glycin sein. Diese Lösung des Problems, dass ein N-terminales Cystein erforderlich ist, führt zu einer Reihe neuer Einschränkungen. Wenn das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom des Thioesters oder der Aminosäure, die die Hilfsgruppe trägt, substituiert ist, so wird der Acyltransfer (anstelle der Thioesterübertragung) zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, und die Thioesterhydrolyse tritt mit höherer Wahrscheinlichkeit auf. Interessanterweise war das Gly-Gln-Ligationsprodukt nach Abspaltung der Hilfsgruppe mit einer Spezies identischer Masse verunreinigt. Vermutlich führt eine N→

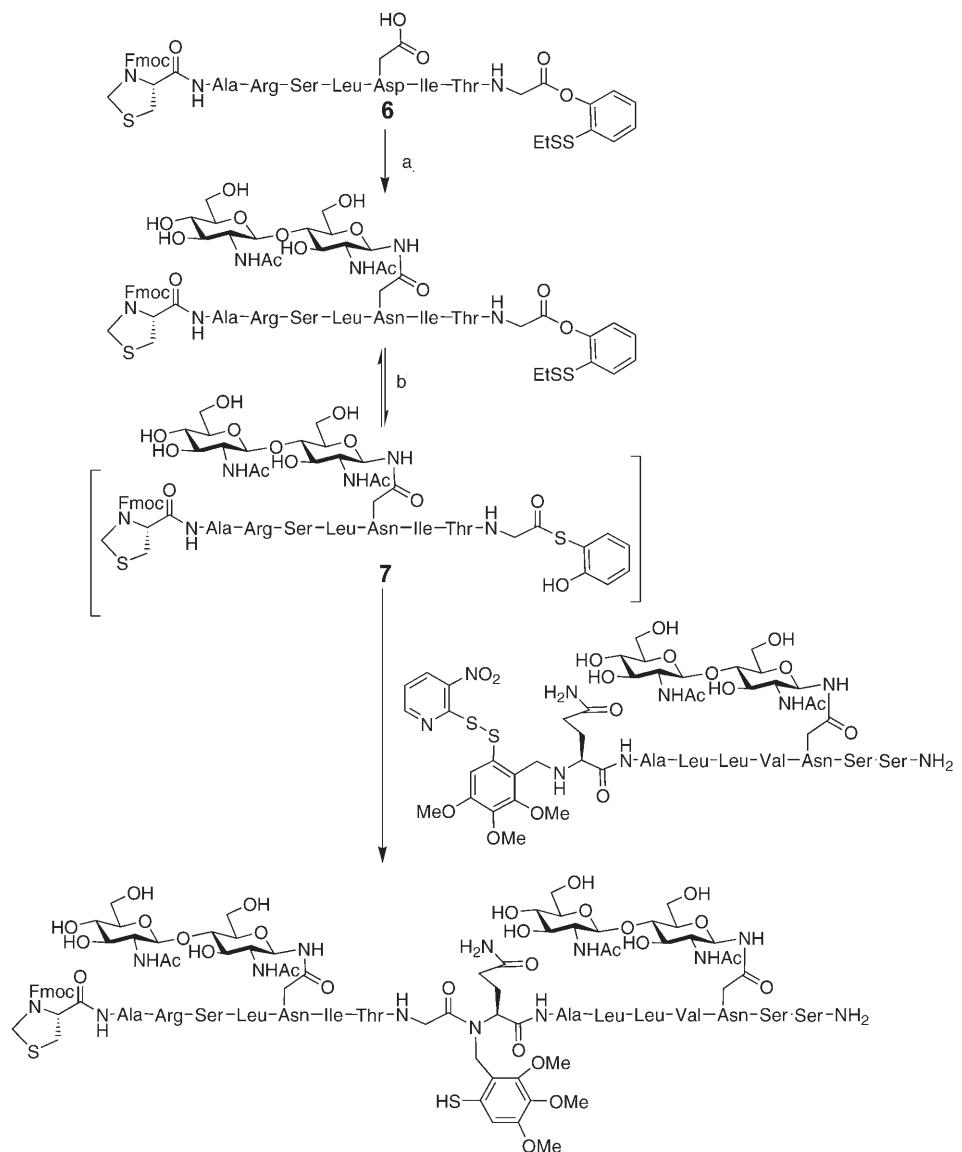
S-Acylverschiebung zum Thioester **5** (Schema 2), da die benzylische Aminogruppe bei der Abspaltung der Hilfsgruppe in saurem Milieu irreversibel protoniert wird. Die Methylierung des Thiols durch *p*-Nitrobenzolsulfonsäure-Methylester vor der Abspaltung der Hilfsgruppe verhinderte diese unerwünschte (doch möglicherweise nutzbringende)<sup>[7]</sup> Nebenreaktion, sodass ein Glycopeptid mit 17 Resten und zwei N-

verknüpften Sacchariden isoliert werden konnte (Schema 3).

Die Maskierung der Thiolfunktion könnte diese Hilfsgruppenklasse wieder attraktiver machen, doch eine wichtige Einschränkung bleibt für alle Hilfsgruppen bestehen: Sie sind momentan nur auf synthetische Peptide anwendbar. Das mag daran liegen, dass noch keine effiziente Methode zur Einführung von Thiol-Hilfsgruppen am N-Ter-



**Schema 2.** Unerwartete N→S-Acylverschiebungen, die zu Struktur **5** führen, resultieren in einer ineffizienten Abspaltung der Trimethoxybenzyl-Hilfsgruppe. Die Methylierung der freien Thiole vor der Spaltung erhöht die Ausbeute an isolierten ligierten Peptiden.<sup>[6]</sup>



**Schema 3.** Ein trifunktionelles Peptid von Danishefsky und Mitarbeitern.<sup>[6]</sup> Der Phenolester ist stabil, während das Glycosamin an den selektiv entschützten Aspartatrest gebunden wird. Die Reduktion der Disulfidbrücke setzt das Thiol frei, das durch eine O→S-Acylverschiebung an das Hilfsgruppen-verknüpfte Glycopeptid gebunden wird. Der nun zugängliche N-terminale Cysteinrest ermöglicht die weitere NCL-Reaktion. Reagenzien und Bedingungen: a) HATU, DIPEA, DMSO, 72 %, b) TCEP, DMF, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 58 %. HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat, DIPEA = Diisopropylethylamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphanhydrochlorid, DMF = N,N-Dimethylformamid.

minus exprimierter Proteine bekannt ist. Frühe Arbeiten von Kemp et al.<sup>[8]</sup> zur Ligationsstrategie mit Thiol-Schutzgruppen legen nahe, dass „Hilfsgruppen“ wie das Dibenzofuran-Gerüst **3** verwendet werden können, um eine hohe lokale Konzentration beider Komponenten zu erreichen. Da Hilfsgruppen effizienter sein sollten, die die Ligation durch einen fünfgliedrigen (wie in der NCL) oder sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustand ermöglichen, konzentrierte man sich zuletzt auf diesen Bereich. Dennoch haben Wong und

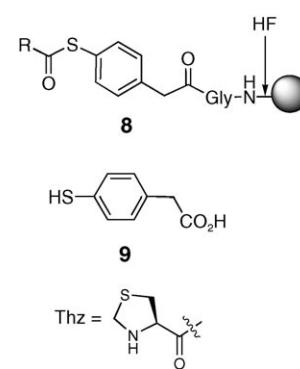
Mitarbeiter kürzlich über eine zuckervermittelte Glycopeptidligation mit einem 14-gliedrigen cyclischen Übergangszustand berichtet (**4**, Abbildung 1).<sup>[9]</sup> Die Ligation wird durch eine Thiolgruppe am N-Acetylrest eines 2-Acetamido-2-Desoxyzuckers ermöglicht, der durch eine β-O-glycosidische Bindung mit einem Serinrest an der vorletzten Stelle der Aminosäuresequenz verknüpft ist. Die Ligation gelang mit Glycin-, Histidin-, Alanin- und Valin-thioestern. In jedem Fall lag ein N-terminaler Glycinrest vor (benachbart

zur Glycoaminosäure), doch die Autoren merkten an, dass auch Alanin oder Serin an dieser Stelle zulässig sind. Ferner sagten sie voraus, dass die Kohlenhydrateinheit als Templat für eine effiziente Ligation sorgt. Obwohl diese Veröffentlichung eine interessante Alternative zum Einsatz von Thiol-Hilfsgruppen beschreibt, die potenziell spurlos verläuft (wenn sie mit einer Glycosidase kombiniert wird), müssen viele Faktoren noch untersucht werden, darunter die Rolle der Konfiguration der glycosidischen Bindung, das Einsatzge-

biet (können auch andere Glycosidbindungen als Template dienen?) und die Bedeutung der N-terminalen Aminosäurereste (die Autoren merkten an, dass die Ligation beim Fehlen des N-terminalen Rests nicht erfolgreich verlief). Wahrscheinlich wird diese Methode nicht generell für die Glycopeptid-synthese anwendbar sein, da die Thiolgruppe entschwert werden muss, um die N-Acetylgruppe des Kohlenhydrats zu regenerieren. Somit ist diese Prozedur nicht auf Peptide anwendbar, die Cysteinreste (mit Thiolseitengruppen) in der Sequenz enthalten. Kürzlich wurde die Konvergenz bei der NCL durch die Arbeitsgruppen von Kent und Danishefsky untersucht. Danishefsky und Mitarbeiter berichteten 2004 über einen C-terminalen peptidischen Phenolester mit einer als Disulfidbrücke geschützten *o*-Thiolgruppe für die Glycopeptidsynthese und die chemische Ligation.<sup>[10]</sup> Mithilfe dieses Phenolesters konnten kurze, aber komplexe Glycopeptidsequenzen in Lösung synthetisiert werden. Dadurch wurden die sauren Spaltungsbedingungen vermieden, die man in den meisten Festphasensynthesen für Peptide antrifft, sodass die teilweise labilen glycosidischen Bindungen keinen Schaden nehmen. Oligosaccharide können anschließend mit selektiv entschützten Asparaginsäureresten innerhalb der Peptidsequenz verknüpft werden. Dies war bedeutsam, da die Kupplung eines Glycosylamins mit der Säureseitenkette einer Aminosäure in Gegenwart eines C-terminalen Thioesters eher unwahrscheinlich ist, während der Phenolester intakt bleibt. Danishefsky und Mitarbeiter<sup>[6]</sup> haben die Präparation eines trifunktionellen

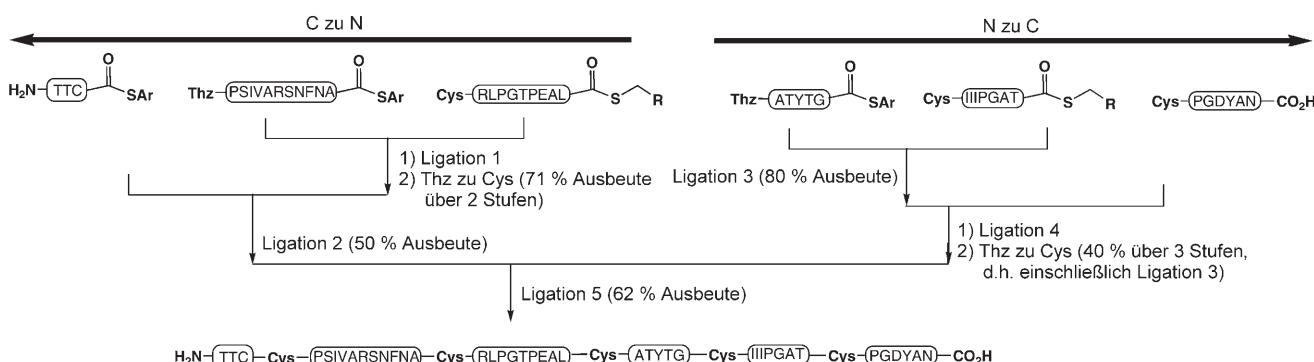
Peptids **6** (Schema 3) für die sequenzielle chemische Ligation beschrieben. Nach der Anlagerung des Disaccharids Chitobiose wurde das Glycopeptid mit Tris(carboxyethyl)phosphan (TCEP) versetzt, das die Disulfidbrücken sowohl am Donor als auch am Hilfsgruppen-verknüpften Acceptor reduziert. Eine anschließende O→S-Acylverschiebung erzeugte den Thioester **7**, der an einer NCL-Reaktion teilnimmt. Eine Festphasensynthese von Thioestern durch O→S-Acylverschiebung wurde ebenfalls beschrieben.<sup>[11]</sup>

Kent und Mitarbeiter konzentrierten sich auf die inhärenten Reaktivitätsunterschiede zwischen Alkylthioestern und Arylthioestern bei der Entwicklung kinetisch kontrollierter Ligations. Diese Unterschiede können hauptsächlich auf den  $pK_s$ -Wert der Thiolkomponente des Thioesters ( $pK_s(\text{Benzolthiol}) = 6.6$ ;  $pK_s(2\text{-Mercaptoethansulfonsäure; MESNA}) = 9.2$ ) zurückgeführt werden, wonach Arylthiole bessere Abgangsgruppen sind. Die reaktiveren Arylthioester werden oft in situ durch die Zugabe eines Überschusses an Benzolthiol zu einem Alkylthioester erzeugt, der aus der Festphasensynthese eines Peptids stammt. Die neue Verknüpfungseinheit **8** vereinfacht die quantitative Bildung von Arylthioestern vor der Reaktion durch Boc-Festphasensynthese. So demonstrierten Kent und Mitarbeiter, dass die Ligation mit hoher Ausbeute voranschreitet und der Alkylthioester intakt bleibt, wenn Peptidkomponenten, die ein N-terminalen Cystein und einen Alkylthioester enthalten, mit einem Arylthioesterfragment reagieren (in Abwesenheit jeglicher Arylthioladditive).<sup>[12]</sup>



Interessanterweise erwies sich 4-Mercaptophenylsäure (**9**), die auch als verknüpfende Einheit in **8** vorliegt, vor kurzem als der effizienteste Arylthiolkatalysator bei regulären NCL-Experimenten.<sup>[13]</sup>

Der Reaktivitätsunterschied zwischen Alkyl- und Arylthioestern wurde für die Synthese des Peptids Crambin (46 Aminosäuren) genutzt. Um das Prinzip zu verdeutlichen, wurde Crambin durch den Einsatz von sechs Fragmenten und nur zwei Schutzgruppen aufgebaut.<sup>[14]</sup> Die Arylthioester wurden durch den Austausch von Alkylthioestern in annähernd 90% Ausbeute erhalten, indem das Reaktionsgemisch 24 h mit Benzolthiol umgesetzt wurde (0.2 Vol-%; pH 6.8). Ausgehend von den gewünschten Alkyl- und Arylthioestern wurde die komplette Peptidsequenz durch fünf sequenzielle Ligations bei pH 6.8 in 6 M Guanidiniumhydrochlorid ohne Zusatz von Benzolthiol zusammengefügt (Schema 4). Die Ausbeute von Ligation 1 war 71% (nach dem Entfernen der Thiazolidin(Thz)-Schutzgruppe im selben Reaktionsgefäß), die Ligation 2 verlief mit 50%



**Schema 4.** Die gesamte Synthese von Crambin durch fünf sequenzielle chemische Ligations.<sup>[14]</sup> Kinetisch kontrollierte Ligations wurden in 6 M Guanidiniumhydrochlorid und Natriumphosphatpuffer (pH 6.8) mit TCEP in entweder N-C-Richtung oder C-N-Richtung durchgeführt. Zur Abspaltung der Thiazolidin(Thz)-Schutzgruppe am N-terminalen Cysteinrest wurde dem Reaktionsgemisch MeO-NH<sub>2</sub>-HCl zugesetzt.

Ausbeute. Ligation 3 ergab 80 % Ausbeute (oder 40 %, wenn Ligation 4 im selben Reaktionsgefäß angeschlossen wurde), und Ligation 5 sowie die Faltung zur nativen Crambinstruktur lieferten insgesamt 62 % Ausbeute. Durch die Addition von Methoxylaminhydrochlorid und Absenken des pH-Werts des Reaktionsgemischs auf 4 wurden die N-terminalen Cysteinreste demaskiert, der C-terminale Thioester wurde aber nicht angegriffen. Cyclische Peptide, die durch eine intramolekulare Reaktion zwischen dem Cysteinrest und dem Thioester entstanden, und oligomere Produkte aus der intermolekularen Verkettung der difunktionellen Reaktanten waren nur in Spuren im Reaktionsgemisch enthalten (<2 %). Es ist zu beachten, dass nicht allein die Thiol-Abgangsgruppe für die kinetisch kontrollierte Synthese von Crambin entscheidend ist. Die Reaktivität der Arylthioester war zusätzlich erhöht, wenn sie in der Nähe kleiner Aminosäuren (Glycin und Alanin) platziert waren, wohingegen die Reaktivität von Alkylthioestern durch die Platzierung in der Nähe von sperrigen und  $\beta$ -verzweigten Aminosäuren (Leucin und Threonin) reduziert wurde. Bei diesen Experimenten sind also komplexe Faktoren zu berücksichtigen.

Durch die Erweiterung der NCL-Methoden um EPL und Thiol-Hilfsgruppen konnten die unmittelbaren Herausforderungen bewältigt werden. Ein besseres Verständnis der Wirkungsweise sollte außerdem den Nutzen neuer und bekannter Thiol-Hilfsgruppen erhöhen und eine effizientere cyssteinfreie NCL ermöglichen. Eine kine-

tisch kontrollierte Ligation kann die Synthese sehr großer Proteine aus zuvor gebildeten Arylthioestern wesentlich effizienter gestalten. Da solche Arylthioester gegenwärtig mithilfe von Boc-Schutzgruppen präpariert werden, muss die Fmoc-basierte Alternative optimiert werden, damit auch glycosylierte und phosphorylierte Proteine mit dieser fortschrittlichen Technik zugänglich werden. Die analoge direkte Synthese der Thioester (z. B. an einem Thioesterharz) mit Fmoc-Schutzgruppen ist trotz ihres Erfolges nicht weit verbreitet.<sup>[15]</sup> Weitere Verbesserungen dieser Technik werden notwendig sein, damit eine Fmoc-Synthese von Arylthioestern verwirklicht werden kann. Angesichts der Fortschritte bei alternativen Ligationsstrategien<sup>[16]</sup> wie der spurlosen Staudinger-Ligation<sup>[17]</sup> und der chemoselektiven decarboxylierenden Peptidligation<sup>[18]</sup> ist es angebracht, dass diese Einschränkungen aufgehoben werden, damit die NCL auch weiterhin gebräuchlich bleibt.

Online veröffentlicht am 8. November 2006

- 
- [1] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776; P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923.
  - [2] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705; C. J. Noren, J. M. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 450; V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, 3, 429.
  - [3] 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.
  - [4] P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1831.
  - [5] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4642.
  - [6] B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4222; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4116.
  - [7] N. Ollivier, J.-B. Behr, Q. El-Mahdi, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2647.
  - [8] D. S. Kemp, N. G. Galakatos, B. Bowen, K. Tan, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 1829.
  - [9] A. Brik, Y. Y. Yang, S. Ficht, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5626.
  - [10] J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6576.
  - [11] P. Botti, M. Villain, S. Manganiello, H. Gaertner, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4861.
  - [12] D. Bang, B. L. Pentelute, Z. P. Gates, S. B. Kent, *Org. Lett.* **2006**, 8, 1049.
  - [13] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640.
  - [14] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4089; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3985; D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2588; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2534.
  - [15] H. Hojo, Y. Matsumoto, Y. Nakahara, E. Ito, Y. Suzuki, M. Suzuki, A. Suzuki, Y. Nakahara, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13720; A. B. Clippingdale, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J. Pept. Sci.* **2000**, 6, 225.
  - [16] Eine ausführliche Übersicht: T. Kimerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, 65, 229.
  - [17] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141; B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, 3, 9; L. Liu, Z.-Y. Hong, C.-H. Wong, *ChemBioChem* **2006**, 7, 429.
  - [18] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1270; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1248.