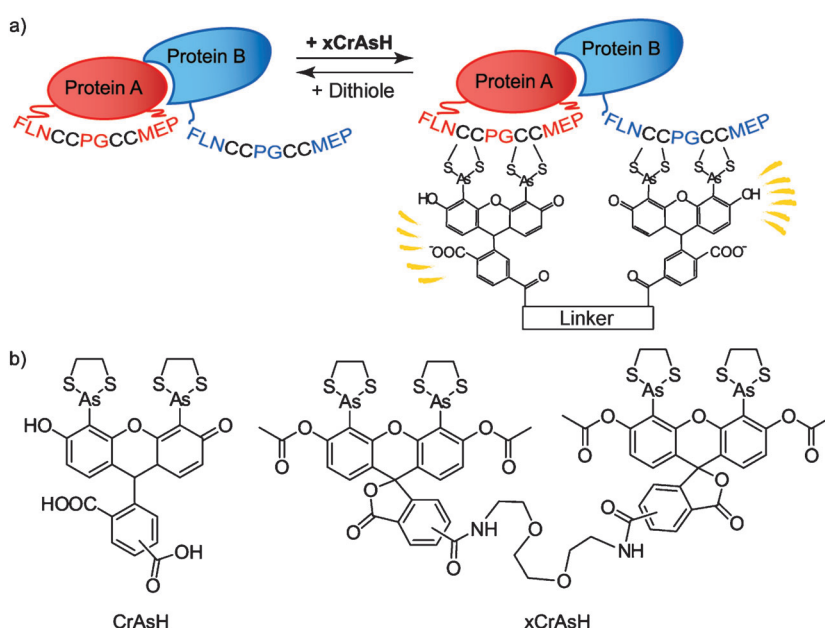


## FLAsH-basierte Verknüpfungen von Proteinen in lebenden Zellen\*\*

Anna Rutkowska, Christian H. Haering\* und Carsten Schultz\*

Die Dynamik von Protein-Protein-Wechselwirkungen spielt eine wesentliche Rolle bei den meisten biologischen Prozessen, unter anderem für die Funktion von Multiproteinkomplexen und die Regulation von Signalübertragungsnetzwerken. Methoden, diese Wechselwirkungen zu messen oder zu manipulieren, sind deshalb von großer Bedeutung für die Untersuchung von Proteinfunktionen in lebenden Zellen. Protein-Protein-Kontakte können z. B. durch kleine membranpermeable Moleküle, die simultan zwei Proteindomänen binden, erzwungen werden.<sup>[1]</sup> Diese außerordentlich nützliche Methode hat allerdings die Einschränkung, dass die bisher verwendeten Bindedomänen verhältnismäßig groß sind (üblicherweise > 18 kDa) und daher unter Umständen die Proteinaktivität und/oder -lokalisierung beeinflussen.<sup>[2]</sup> Ferner sind die Wechselwirkungen meist irreversibel und daher nicht geeignet, transiente Protein-Protein-Verbindungen zu erzeugen. Um diese Nachteile zu umgehen, haben wir eine Methode entwickelt, die die hochspezifische Verknüpfung zweier Proteine in lebenden Zellen ermöglicht und nur ein zwölf Aminosäuren langes Peptidsegment (4cys-tag) pro Protein benötigt. Die Methode basiert auf der Bildung eines stabilen, kovalenten Komplexes zwischen einem dimeren Bisarsenitderivat von Carboxyfluorescein (xCrAsH) und zwei Proteinen, die je das einzigartige Tetracysteinmotiv CCPGCC tragen (Abbildung 1 a).<sup>[3]</sup> Im Unterschied zu anderen Methoden kann die



**Abbildung 1.** Der chemische Verknüpfers xCrAsH. a) Generelles Schema für die kovalente Verknüpfung von zwei wechselwirkenden Proteinen mit 4cys-Sequenzen in internen Schleifen oder an den N- oder C-Termini durch xCrAsH. Der verknüpfte Komplex ist fluoreszierend und kann durch Zugabe von Dithiolen wieder zerlegt werden. b) Chemische Strukturen des CrAsH-Monomers (5(6)-Carboxy-FLAsH) und des xCrAsH-Verknüpfers. Im Unterschied zu CrAsH ist xCrAsH acetyliert, um die Löslichkeit während der Synthese und bei der biologischen Anwendung zu erhöhen. Acetylgruppen werden effizient durch intrazelluläre Esterasen entfernt. Aus analytischen Gründen wurde xCrAsH auch isomerenrein mit zwei 5-Carboxy-fluoresceineinheiten synthetisiert.

Verknüpfung rasch durch Zugabe von membranpermeablen Dithiolen gelöst werden. Zudem wird das Proteinpaar bei der Reaktion mit xCrAsH fluoreszierend, was bei der Detektion und dem Verfolgen der Zielproteine mit Lichtmikroskopie hilfreich ist.

Bisarsenitderivate in Kombination mit einem gespaltenen Tetracysteinmotiv wurden bereits zuvor verwendet, um Teile einer Proteinstruktur zusammenzufügen oder den Aggregationsstatus von Proteinen zu untersuchen.<sup>[4]</sup> Allerdings sind die Anwendungen dieser Verknüpfungsmethode recht limitiert, weil die gespaltenen Motive in direkter Nachbarschaft angeordnet sein müssen, um eine ausreichende Verknüpfung zu erzielen. Um eine stabile Dimerisierung und gleichzeitig eine hohe Flexibilität des Verknüpfungsprozesses zu erreichen, haben wir zwei Bisarsenitderivate mit einem beweglichen Molekülteil verbunden (xCrAsH; Abbildung 1 b). Die Synthese gelang in einer Gesamtausbeute von 53 % ausgehend von Carboxyfluorescein (siehe die Hintergrundinformationen für die Details der Synthese). Um die Löslichkeit während der Reaktion wie auch die Membrangängigkeit zu erhöhen, wurde xCrAsH acetyliert. Das monomere Bisarse-

[\*] Dr. A. Rutkowska, Dr. C. H. Haering, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz  
Cell Biology & Biophysics Unit  
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)  
E-Mail: chaering@embl.de  
schultz@embl.de

[\*\*] Wir danken der Advanced Light Microscopy Facility des EMBL, Heike Stichnoth für Zellen, Andrea Erlbruch und Alen Piljic für PKA-, DAPK1- und Calmodulin-Konstrukte, Birgit Koch für Anti-GFP-Antikörper, Sarah Sternberger für Hilfe bei Experimenten mit gereinigten Proteinen und Stephen R. Adams (UCSD) für Diskussionen. A.R. ist eine Stipendiatin der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung und Mitglied des EMBL Interdisciplinary Postdoc Programme (EIPOD). FLAsH = Fluorescein-basierter Arsen-haltiger Haarnadelbinder.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106404> zu finden.

nitderivat Carboxy-FLAsH (CrAsH, Abbildung 1b) wurde in allen Experimenten als interne Kontrolle verwendet. Um eine hohe Spezifität der Verknüpfung zu gewährleisten, wurde die optimierte Zwölf-Aminosäuren-Sequenz (FLNCCPGCCMEP, 4cys-tag) mit den Zielproteinen fusioniert.<sup>[5]</sup>

Wir wählten zunächst das ProteinpaaR FKBP (FK506-binding protein) und FRB (FKBP-rapamycin binding domain of mTor) als Modell aus, da diese Proteine durch Bindung des Macrolids Rapamycin dimerisiert werden können.<sup>[6]</sup> Basierend auf der Kristallstruktur des FRB-FKBP-Komplexes<sup>[6b]</sup> wurden die C-Termini für die Einführung der 4cys-tags verwendet.

Zunächst wurde die Verknüpfung von gereinigten His<sub>6</sub>-FKBP-4cys- und His<sub>6</sub>-SUMO-FRB-4cys-Proteinen unter den Standardbedingungen für die Proteinmarkierung mit Bisarsenitderivaten durchgeführt.<sup>[3a]</sup> Die Zugabe von xCrAsH, aber nicht die des CrAsH-Monomers, führte zur bevorzugten Bildung des verknüpften FRB-FKBP-Komplexes in Gegenwart von Rapamycin (Abbildung 2a). Ohne Rapamycin wurden das FRB-FKBP-Heterodimer sowie die FRB-FRB- und FKBP-FKBP-Homodimere in etwa gleichen Mengen gebildet. Wie erwartet waren die verknüpften Komplexe fluoreszierend, stabil unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE und empfindlich gegen hohe Dithiol-

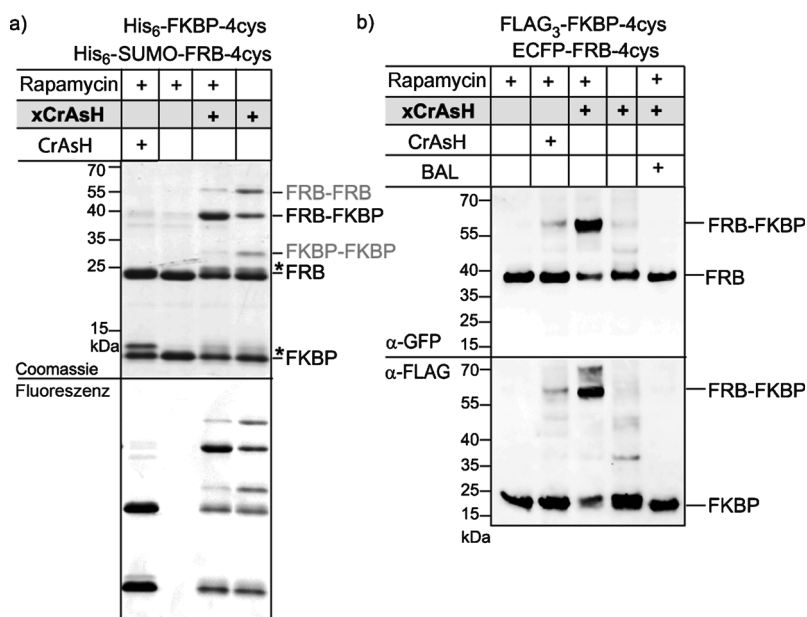
konzentrationen (5 mM 2,3-Dimercapto-1-propanol, BAL) (Abbildung 2a und Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Die Verknüpfungsausbeute nach Optimierung der Bedingungen lag im Deep-Purple-Färbassay bei 80 %. Das beste Verhältnis von Bisarsenitderivat zu Protein lag zwischen 1:1 und 2:1, also im theoretisch erwarteten Rahmen (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Diese Befunde zeigen, dass xCrAsH geeignet ist, zwei Proteine mit Tetracysteinmotiven spezifisch, effizient und reversibel zu verknüpfen.

Als nächstes wurde die Proteinverknüpfung in Lysaten von HeLa-Kyoto-Zellen, die FLAG<sub>3</sub>-FKBP-4cys und ECFP-FRB-4cys transient koexprimierten, getestet (Abbildung 2b). Auch in Lysaten konnten spezifische Verknüpfungen in Gegenwart von xCrAsH erzielt werden. Quantitative Westernblots zeigten Ausbeuten von bis zu 70 % (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Anders als im Fall der gereinigten Proteine konnte nur die Rapamycin-abhängige Bildung des FKBP-FRB-Heterodimers, aber nicht die eines Homodimers detektiert werden. Dies zeigt, dass eine stabile Protein-Protein-Wechselwirkung die Voraussetzung für eine erfolgreiche xCrAsH-Verknüpfung in Zelllysaten ist. xCrAsH ist daher ein hochspezifisches, konditionelles Verknüpfungsreagens, das nicht mit nichtwechselwirkenden

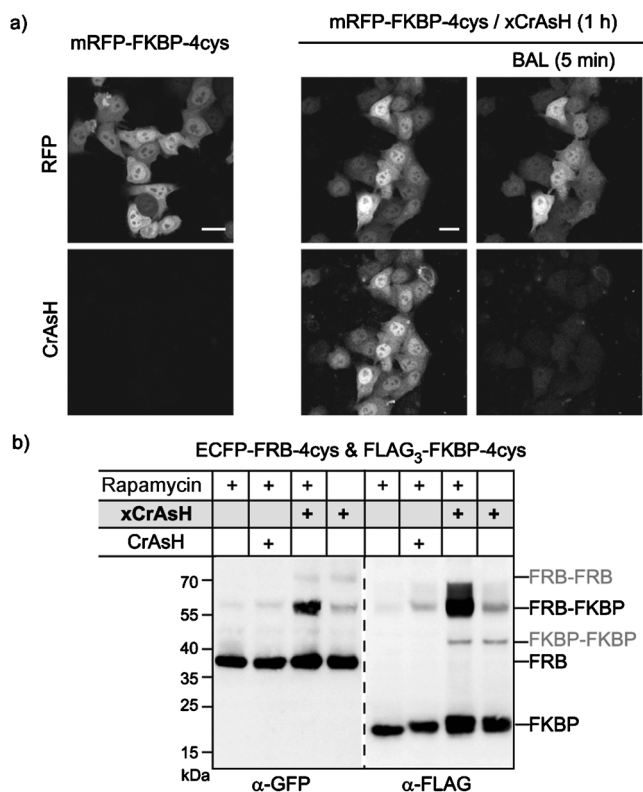
Proteinen reagiert, selbst wenn diese Tetracysteinsequenzen enthalten.

Abschließend wurde die Verknüpfung von 4cys-markierten Proteinen in lebenden Zellen untersucht. Wegen der fluorogenen Eigenschaften der Bisarsenitderivate konnten die Zellpermeabilität der Moleküle des Verfahrens sowie die Dosisabhängigkeit des Verfahrens durch Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen bestimmt werden.<sup>[7]</sup> HeLa- oder U2OS-Zellen, die transient mRFP-FKBP-4cys exprimierten, wurden nach einer Standardvorschrift für die In-vivo-Markierung mit Bisarsenitderivaten<sup>[7]</sup> mit CrAsH oder xCrAsH behandelt. Nur Zellen, die 4cys-tag-haltige Proteine exprimierten, zeigten eine spezifische fluoreszierende Färbung. Der Effekt wurde durch die Zugabe von Dithiolen rasch aufgehoben (Abbildung 3a und Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Dies zeigt, dass xCrAsH effizient die Membranen humaner Zellen überwinden kann und spezifisch an 4cys-markierte Proteine bindet.

Um zu testen, ob xCrAsH auch in lebenden Zellen effizient 4cys-markierte Proteine verknüpfen kann, wurden U2OS- (oder HeLa-) Zellen, die transient FLAG<sub>3</sub>-FKBP-4cys und ECFP-FRB-4cys koexprimierten, 2 h mit mikromolaren Konzentrationen von xCrAsH oder CrAsH mit oder ohne Rapamycin inkubiert. Die Verknüpfungseffizienz wurde per Westernblot bestimmt (Abbildung 3b und nicht gezeigte Daten). Wie bei den Experimenten mit Zelllysaten war das einzige detektierbare Verknüpfungsprodukt das FRB-



**Abbildung 2.** In-vitro-Verknüpfung eines 4cys-markierten ProteinpaaRs. a) Gereinigte Proteine (His<sub>6</sub>-FKBP-4cys und His<sub>6</sub>-SUMO-FRB-4cys, je 15 μM) wurden mit oder ohne Rapamycin vorbehandelt und anschließend 1 h mit CrAsH (30 μM) oder xCrAsH (30 μM) bei 37 °C inkubiert. Proben wurden per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder in-Gel-Fluoreszenz analysiert. Banden, die verknüpfte Proteine repräsentieren, wurden nur in Gegenwart von xCrAsH gefunden. Komplexe von Proteinmonomeren und xCrAsH oder CrAsH sind mit einem Stern (\*) markiert. Durch die Acetylierung von xCrAsH sind dessen Komplexe weit weniger fluoreszierend als CrAsH-Komplexe. b) Westernblot eines ähnlichen Experiments mit Lysaten von HeLa-Kyoto-Zellen, die transient FLAG<sub>3</sub>-FKBP-4cys und ECFP-FRB-4cys koexprimierten; finale Konzentrationen: Rapamycin: 40 μM, xCrAsH und CrAsH: je 5 μM. Wo angezeigt, wurde BAL (5 mM) 50 min nach der Zugabe des Bisarsenitderivates appliziert. Verknüpfte Produkte wurden ausschließlich zwischen wechselwirkenden Proteinen gefunden, und die Verknüpfung konnte durch BAL gelöst werden.

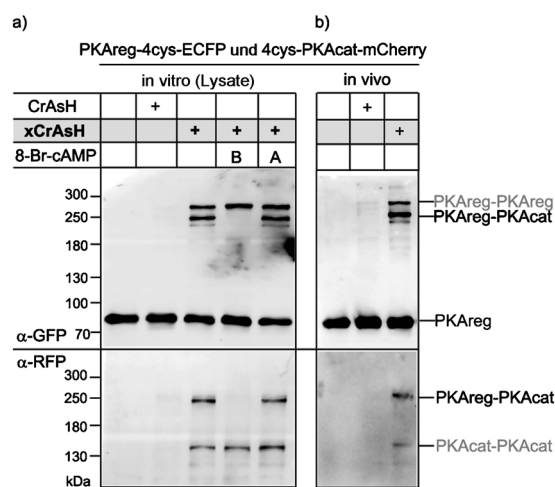


**Abbildung 3.** Verknüpfung von 4cys-markierten Proteinen in lebenden Zellen. a) Membranpermeabilität und spezifisches Färben mit xCrAsH: konfokale Bilder von HeLa-Zellen, die transient mRFP-FKBP-4cys exprimieren, vor (linkes Bild) und nach 1 h Reaktion mit 1  $\mu$ M xCrAsH (mittleres Bild); CrAsH, Anregung 514 nm, Emission 530–600 nm. Zugabe von 5 mM BAL löste die Färbung mit xCrAsH vollständig (rechtes Bild). Quantifizierung siehe Hintergrundinformationen. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. b) Westernblot nach Verknüpfung in Zellen: U2OS-Zellen, die transient FLAG<sub>3</sub>-FKBP-4cys und ECFP-FRB-4cys koexprimierten, wurden mit oder ohne Rapamycin (10  $\mu$ M) vorinkubiert und dann mit xCrAsH (2  $\mu$ M, 2 h) behandelt.

FKBP-Heterodimer in den Zellen, die zuvor auch mit Rapamycin inkubiert worden waren. Unter optimalen Bedingungen (2–5  $\mu\text{M}$  xCrAsH für U2OS- und 10–20  $\mu\text{M}$  für HeLa-Zellen) wurden 50% Verknüpfung erreicht. Dieser Wert war erheblich niedriger, wenn die Zellen anschließend mit BAL behandelt wurden. xCrAsH kann daher als ein induzierbares, konditionales und reversibles Verknüpfungsreagens in lebenden Zellen verwendet werden.

Um die Möglichkeit einer weitreichenden Anwendung der Verknüpfungstechnik mithilfe von xCrAsH sowie insbesondere die Abhängigkeit von Liganden oder Stimuli zur Induktion von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu bestimmen, wurden weiterhin zwei wichtige heterodimere Kinasen, Proteinkinase A (PKA) und death-associated protein kinase 1 (DAPK1), untersucht. In ihrem inaktiven Zustand besteht PKA aus einer homodimeren regulatorischen Unterheit (PKAreg) sowie zwei katalytischen Untereinheiten (PKAcat).<sup>[8]</sup> Nach kooperativer Bindung von vier Molekülen des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) werden die katalytischen Untereinheiten freigesetzt und so aktiviert. xCrAsH sollte daher in der Lage sein, die regulatorischen und

katalytischen Untereinheiten in Abwesenheit, aber nicht in Gegenwart von cAMP zu verknüpfen. Die Verknüpfungsversuche wurden in Lysaten von U2OS-Zellen, die transient PKAreg-4cys-ECFP und 4cys-PKAcat-mCherry koexprimierten, wie oben beschrieben durchgeführt. Ohne Stimulation wurden verknüpfte Heterodimere der regulatorischen und katalytischen Untereinheiten sowie beide Homodimere gefunden (Abbildung 4a und Abbildung S3 der Hintergrundinformationen). Die Zugabe des cAMP-Analogons 8-Br-cAMP zu den Lysaten vor, aber nicht nach der Verknüpfungsreaktion verringerte wie erwartet die Menge an Heterodimer erheblich. Die PKA-Untereinheiten wurden nach Zugabe von xCrAsH nicht nur in Lysaten, sondern auch in lebenden Zellen effizient verknüpft (Abbildung 4b).



**Abbildung 4.** Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen von Kinasen *in vitro* und in lebenden Zellen. a) Westernblots von In-vitro-Verknüpfungsexperimenten in Lysaten von U2OS-Zellen, die transient 4cys-tag-Fusionen der regulatorischen und katalytischen Untereinheiten von PKA (PKAreg-4cys-ECFP und 4cys-PKAcat-mCherry) koexprimieren und die 1 h mit DMSO, CrAsH (5  $\mu$ M) oder xCrAsH (5  $\mu$ M) bei 37°C inkubiert wurden. In einigen Experimenten wurde 8-Br-cAMP (5 mM) 10 min vor (B) oder 50 min nach (A) der Zugabe von xCrAsH verwendet. Der Holoenzymkomplex zwischen PKAcat und PKAreg wurde nur bei niedrigen cAMP-Spiegeln detektiert. b) U2OS-Zellen wurden 2 h mit CrAsH oder xCrAsH (je 2  $\mu$ M) bei 37°C inkubiert. Zellen wurden lysiert und per Westernblot analysiert. Das ungewöhnliche Verhalten der verknüpften PKAreg im Gel ist auf die unvollständige Denaturierung des ECFP zurückzuführen (Abbildung S3 der Hintergrundinformationen).

Die Bindung von DAPK1 an seinen Aktivator Calmodulin hängt sowohl von seiner Dephosphorylierung als auch vom intrazellulären Calciumspiegel ab.<sup>[9]</sup> Demzufolge konnte eine signifikante Verknüpfung von DAPK1-Calmodulinkomplexen in Lysaten von U2OS-Zellen, die transient DAPK1-4cys-ECFP (katalytische Domäne, 334 Aminosäuren) und FLAG<sub>3</sub>-4cys-Calmodulin exprimierten, nur in Gegenwart von Calciumionen detektiert werden (Abbildung S4 der Hintergrundinformationen). Zugabe eines Calciumchelators (Ethylenglycoltetraessigsäure, EGTA) verhinderte die Protein-Protein-Verknüpfung fast vollständig. Am Beispiel



zweier Kinasen konnte xCrAsH somit als Indikator für Protein-Protein-Wechselwirkungen in Zelllysaten eingeführt werden. Die zukünftige Optimierung der 4cys-Markierung kann unter Umständen die finale Verknüpfungsrates zwischen den bisher untersuchten Proteinen noch weiter erhöhen.

Zusammenfassend wurde hier der neue membranpermeable chemische Verknüpfer xCrAsH als ein Hilfsmittel zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in vitro und in lebenden Zellen vorgestellt. Drei wichtige Eigenschaften unterscheiden diese Technik von den bisher bestehenden: Reversibilität (durch Zugabe von Dithiolen), Konditionalität (die Dimerisierung findet nur statt, wenn die Proteine wechselwirken) und Verwendung einer sehr kleinen Peptidmarkierung (4cys-tag). Anders als die größeren Proteindomänen, die in alternativen Methoden Verwendung finden, nimmt der 4cys-tag eine ungeordnete Proteinkonformation ein. Diese neigt üblicherweise weniger dazu, Proteinfunktionen zu behindern, selbst wenn die Markierung in die Mitte des Proteins eingebaut wird.<sup>[2c,4d,10]</sup> Um das Anwendungsspektrum in der Zukunft zu erhöhen, sind difunktionelle Verknüpfer, die auf einer Kombination des Bisarsenitderivats mit anderen autoreaktiven Gruppen (z.B. Benzylguanin<sup>[1d]</sup> oder Trimethoprimderivate<sup>[1b]</sup>) basieren, vorstellbar. Solche Moleküle sind besonders für Untersuchungen von Multiproteinkomplexen wie PKA wichtig, bei denen Homo- und Heterodimerbildung getrennt werden müssen. Ein weiterer wichtiger Aspekt wäre die gleichzeitige Einführung zweier verschiedener fluorogener Bisarsenitfarbstoffe für Lokalisationsstudien in lebenden Zellen. Weiterhin könnten photospaltbare Gruppen in die Brücke zwischen den beiden Bisarseniten eingebaut werden, um die Trennung der Protein-Protein-Wechselwirkung mit räumlicher Auflösung durchführen zu können. Daher kann die hier präsentierte Technik als ein erster Schritt zur Entwicklung einer neuen Generation von Proteindimerisierern (chemical inducers of dimerization) angesehen werden, mit denen Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen manipuliert werden können.

## Experimentelles

Alle Proben der Verknüpfungstests wurden mit Standard-SDS-PAGE mit 2 × SDS-Probenpuffer, der 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) enthielt, durchgeführt. Vor der Verknüpfung wurden die Expression und Aktivität aller Konstrukte durch Mikroskopie an lebenden Zellen überprüft. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente. Detaillierte Beschreibungen der Experimente sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 9. September 2011  
Online veröffentlicht am 16. November 2011

**Stichwörter:** Arsenverbindungen · Dimerisierungen · Niedermolekulare Verbindungen · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Proteinverknüpfungen

- [1] a) E. A. Althoff, V. W. Cornish, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2433–2436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2327–2330; b) J. L. Czapinski, M. W. Schelle, L. W. Miller, S. T. Laughlin, J. J. Kohler, V. W. Cornish, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13186–13187; c) S. Gendreizig, M. Kindermann, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14970–14971; d) G. Lemercier, S. Gendreizig, M. Kindermann, K. Johnsson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4359–4362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4281–4284; e) E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12817–12821; f) D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024.
- [2] a) B. N. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217–224; b) C. Hoffmann, G. Gaietta, M. Bunemann, S. R. Adams, S. Oberdorff-Maass, B. Behr, J. P. Vilarlaga, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, M. J. Lohse, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 171–176; c) S. Chaumont, B. S. Khakh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12063–12068.
- [3] a) S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063–6076; b) B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- [4] a) B. Krishnan, L. M. Gierasch, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1104–1115; b) N. W. Luedtke, R. J. Dexter, D. B. Fried, A. Schepartz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 779–784; c) S. Ray-Saha, A. Schepartz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2089–2091; d) T. M. Webber, A. C. Allen, W. K. Ma, R. G. Molloy, C. N. Kettelkamp, C. A. Dow, M. J. Gage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *384*, 66–70.
- [5] B. R. Martin, B. N. Giepmans, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1308–1314.
- [6] a) L. A. Banaszynski, C. W. Liu, T. J. Wandless, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4715–4721; b) J. Choi, J. Chen, S. L. Schreiber, J. Clardy, *Science* **1996**, *273*, 239–242; c) S. N. Ho, S. R. Biggar, D. M. Spencer, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Nature* **1996**, *382*, 822–826.
- [7] C. Hoffmann, G. Gaietta, A. Zurn, S. R. Adams, S. Terrillon, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, M. J. Lohse, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1666–1677.
- [8] a) A. J. Boettcher, J. Wu, C. Kim, J. Yang, J. Bruystens, N. Cheung, J. K. Pennypacker, D. A. Blumenthal, A. P. Kornev, S. S. Taylor, *Structure* **2011**, *19*, 265–276; b) C. Kim, D. Vigil, G. Anand, S. S. Taylor, *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 651–654; c) M. Zaccolo, F. De Giorgi, C. Y. Cho, L. Feng, T. Knapp, P. A. Negulescu, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, T. Pozzan, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 25–29.
- [9] a) I. de Diego, J. Kuper, N. Bakalova, P. Kursula, M. Wilmanns, *Sci. Signal* **2010**, *3*, ra6; b) D. Gozuacik, A. Kimchi, *Autophagy* **2006**, *2*, 74–79; c) A. Piljic, I. de Diego, M. Wilmanns, C. Schultz, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 685–691.
- [10] a) O. Erster, M. Eisenstein, M. Liscovitch, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 393–395; b) B. A. Griffin, S. R. Adams, J. Jones, R. Y. Tsien, *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 565–578; c) S. L. Robia, N. C. Flohr, D. D. Thomas, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4302–4311; d) X. Y. Zhang, A. C. Bishop, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3812–3813.