

Photoaktivierbares Glutathion – lichtgesteuerte Proteinwechselwirkung**

Volker Gatterdam, Tatjana Stoess, Clara Menge, Alexander Heckel* und Robert Tampé*

Das Pseudotripeptid Glutathion (GSH), das aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet wird, ist für die Regulierung des Redoxpotentials wie auch für die Entgiftung in eukaryotischen Zellen essenziell.^[1] Das Verhältnis zwischen reduziertem und oxidiertem GSH kontrolliert das Redoxpotential in zellulären Kompartimenten.^[2] Weiterhin ist GSH ein wichtiger Radikalfänger reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), die für Alterung und Wirt-Erreger-Beziehungen verantwortlich sind. Dieser oxidative Stress steht im kausalen Zusammenhang mit vielen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Lebererkrankungen, Sichelzellenanämie, Parasitenkrankheiten,^[3] AIDS, Krebs,^[4] Schlaganfall und Diabetes.^[5] Darüber hinaus werden Xenobiotika wie ROS, Pharmaka und andere organische Verbindungen mithilfe der Glutathion-S-Transferase (GST) mit Glutathion über dessen nukleophiles Schwefelatom kovalent gebunden.^[6] Diese GSH-Konjugate können mithilfe von Glutathion-S-Konjugat-Transportern zur Entgiftung aus der Zelle ausgeschieden werden.^[7] Die Erkennung von GSH durch GST wird in den Biowissenschaften weit verbreitet eingesetzt, z. B. in der Proteinreinigung,^[8] Hochdurchsatzstudien zu Protein-Protein-Wechselwirkungen^[9] oder Proteinimmobilisierung.^[10]

Wir beschreiben hier eine Möglichkeit, die GSH-Protein-Wechselwirkung durch Licht zu induzieren. Eine optimale Kompatibilität mit Zellen oder gar Tieren ist durch die Nutzung von Wellenlängen im sichtbaren Bereich gegeben, die keinerlei Zellschädigung zur Folge hat. Licht kann sehr genau reguliert werden, was eine räumliche, zeitliche und dosisab-

hängige Kontrolle ermöglicht. In den letzten Jahren wurden viele Ansätze realisiert, die auf einer Photoaktivierung beruhen.^[11] Photolabiles Biotin,^[12] O⁶-Benzylguanin^[13] und photoaktivierbares trisNTA,^[14] aber auch lichtgesteuerte Anwendungen^[15] wie Peptidsynthese,^[16] Genregulierung^[17] und strukturierte Zelladhäsion^[18] sind aktuelle Beispiele.

Photoaktivierbares Glutathion wurde durch Modifikation der Amin- und Carboxygruppen erreicht, welche die Erkennung durch GST und einige weitere GSH-Bindungsproteine stark beeinflussen. Die photoaktivierbare Nitrophenylpropyl(NPP)-Schutzgruppe wurde verwendet.^[19] Basierend auf der Röntgenstrukturanalyse von GST mit gebundenem GSH wurden die Amin- und Carboxygruppe von γ -L-Glutamat wie auch die Carboxygruppe von Glycin als mögliche Wechselwirkungsstellen für chemische Modifikationen identifiziert (Abbildung 1).^[20]

Ein doppelt sowie ein einfach photoaktivierbares GSH, **GSH^{NPP2}** bzw. **GSH^{NPP}**, wurden synthetisiert (siehe die Hintergrundinformationen). Ersteres zeigt eine sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen, besonders nach Modifikation mit Fluorophoren. Deshalb wurde **GSH^{NPP2}** nur für Wechselwirkungsstudien an Oberflächen genutzt. Schutzgruppen am C-Terminus von Glycin wurden ebenfalls realisiert, sind aber hier nicht näher beschrieben. Die Thiolgruppe von GSH wurde zur kovalenten Modifikation mit Fluoro-

[*] V. Gatterdam,^[†] Prof. Dr. R. Tampé
Institut für Biochemie, Biocenter
Cluster of Excellence Frankfurt (CEF)
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: tamp@em.uni-frankfurt.de
Homepage: <http://www.biochem.uni-frankfurt.de>
T. Stoess,^[†] C. Menge, Prof. Dr. A. Heckel
Frankfurt Institute for Molecular Life Sciences
Cluster of Excellence Frankfurt (CEF)
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: heckel@uni-frankfurt.de

[†] Beide Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch die DFG mit dem „Cluster of Excellence – Macromolecular Complexes“ (EXC 115) und durch die Goethe-Universität Frankfurt. Ebenfalls danken wir Wacker-Chemie für die großzügige Spende von Vorstufen für Silyl-Schutzgruppe und Tarmo Nuutinen sowie Prof. Juhani Syväoja (Universität Ostfinland) für den GST-eGFP-Vektor.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108073> zu finden.

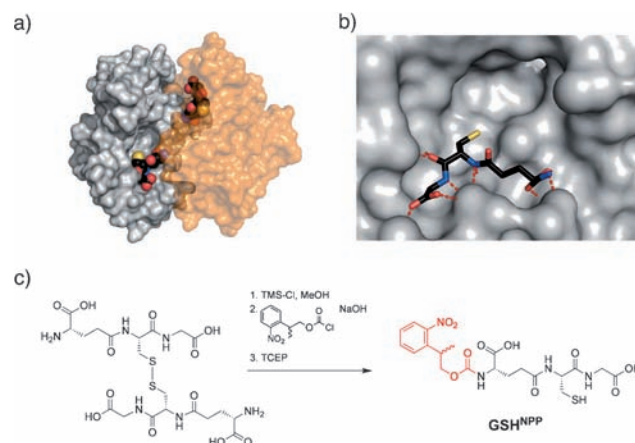


Abbildung 1. a) Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse der humanen Glutathion-S-Transferase M2-2 mit gebundenem GSH (PDB 1XW5).^[21] b) Die GSH-Bindungsstellen des Homodimers befinden sich zwischen beiden Monomeren. Die gepunkteten roten Linien veranschaulichen die Wechselwirkung zwischen GST und GSH. Die SH-Funktion des Cysteins ist für Modifikationen frei zugänglich. c) Synthese und Struktur der photoaktivierbaren GSH-Verbindung **GSH^{NPP}**. TMS-Cl = Trimethylsilylchlorid; TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphan-Hydrochlorid.

phoren und Funktionalisierung von Oberflächen genutzt. Diese Modifikationen sollten die GST-Wechselwirkung nicht beeinträchtigen, da sie vergleichbar mit der Bindung an Xenobiotika in zellulärer Umgebung sind. Die Expression von GST-Fusionsproteinen ist eine gängige Methode,^[8] welche die Fusionierung mit fast jedem beliebigen Zielprotein ermöglicht.

Zu Beginn haben wir die Spezifität und Geschwindigkeit der **GSH^{NPP}**-Entschützung mit Umkehrphasen-HPLC untersucht. Die Photoreaktion wurde mit einer LED (366 nm, 140 mW cm⁻²) durchgeführt. Zur empfindlicheren Detektion wurde der Fluorophor ATTO565 (als Maleimid-Derivat) an das Cystein von **GSH^{NPP}** gekuppelt. Fluoreszierendes **GSH^{NPP}** (10 nmol in TBS-Puffer) wurde unterschiedlich lang belichtet. Nach 60 s wurde bei minimaler Bildung von Nebenprodukten keine Ausgangsverbindung mehr detektiert (Abbildung 2). Die Entschützung folgt einer monoexponen-

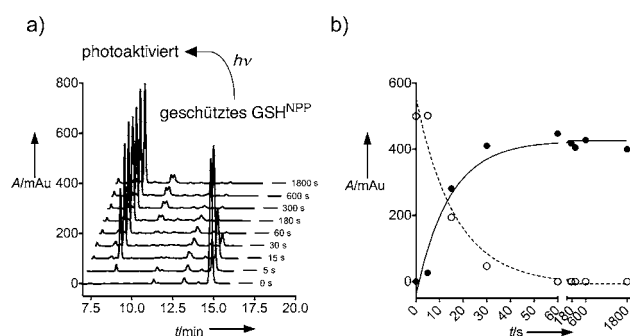


Abbildung 2. Die zeitabhängige Photoaktivierung von ATTO565-markiertem **GSH^{NPP}** wurde mit Umkehrphasen-HPLC verfolgt. a) Ausgangsverbindung und Produkt wurden bei 565 nm detektiert. Geschütztes und ungeschütztes **GSH^{NPP}** eluieren bei 15.0 bzw. 8.5 min (bestätigt durch ESI-MS-Analyse). b) Die Ausgangsverbindung wird mit einer Geschwindigkeitskonstante von $(0.060 \pm 0.013) \text{ s}^{-1}$ umgesetzt (\circ), wobei die Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung bei $(0.071 \pm 0.016) \text{ s}^{-1}$ liegt (\bullet).

tiellen Abnahme der Ausgangsverbindung und ist mit einem monoexponentiellen Wachstum des Produkts verbunden. Im Rahmen der Fehlergrenzen sind die Geschwindigkeitskonstanten des Verbrauchs der Ausgangsverbindung [$(0.060 \pm 0.013) \text{ s}^{-1}$; $\tau_{1/2} = (11.5 \pm 3.1) \text{ s}$] und der Produktbildung [$(0.071 \pm 0.016) \text{ s}^{-1}$; $\tau_{1/2} = (9.8 \pm 2.8) \text{ s}$] identisch, was auf eine vom Zwischenprodukt unabhängige Reaktionsgeschwindigkeit hindeutet. Die Langzeitstabilität wurde mit 30-minütiger Belichtung getestet, wobei keine Photoschädigung des Produkts und auch kein Bleichen des Fluorophors beobachtet werden konnte. Zusammenfassend beschreiben wir eine schnelle direkte Photoaktivierung von **GSH^{NPP}** ohne Begrenzung durch Zwischenprodukte.

Um die GSH-GST-Wechselwirkung in Echtzeit zu verfolgen, haben wir einen Förster-Energietransfer (FRET) etabliert. GST wurde C-terminal mit Grün fluoreszierendem Protein (eGFP) fusioniert und zusammen mit ATTO565-markiertem **GSH^{NPP}** als Donor-Akzeptor-Paar genutzt. GST-eGFP (10 nm in TBS-Puffer) wurde mit unbelichtetem und belichtetem **GSH^{NPP}** (ATTO-markiert) inkubiert. Die Titra-

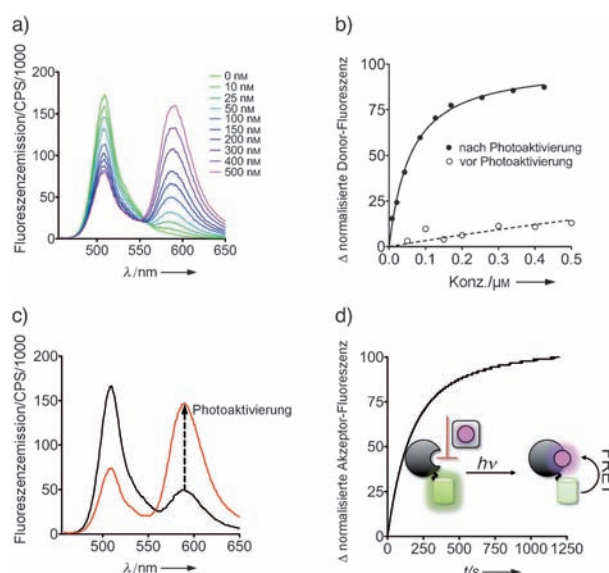


Abbildung 3. Lichtgesteuerte GSH-GST-Wechselwirkung, detektiert mit Hilfe eines FRET. a) Die GSH-Bindung an GST wurde mit GST-eGFP (10 nm) als FRET-Donor, angeregt bei 450 nm, und verschiedenen Konzentrationen von ATTO565-markiertem **GSH^{NPP}** als FRET-Akzeptor vor (siehe die Hintergrundinformationen) und nach Belichtung durchgeführt. Die Photoaktivierung führte zu einer Abnahme der Donor-Fluoreszenz und einer Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz, was eine Komplexbildung bestätigt. b) Die Donor-Fluoreszenz wurde hinsichtlich der Verdünnung und des inneren Filtereffekts korrigiert. Die invertierte und normalisierte Donor-Fluoreszenz bei 511 nm wurde gegen die Akzeptor-Konzentration aufgetragen. Auswertung mit Gleichung (1) (siehe die Hintergrundinformationen) ergab eine K_D von $(53 \pm 2) \text{ nm}$ nach Photoaktivierung (\bullet). Vor der Photoaktivierung konnte nur eine schwache Wechselwirkung festgestellt werden (\circ). c) Eine Verschiebung zwischen den Spektren vor (schwarz) und nach der Photoaktivierung (bei 366 nm, rot) von GST-eGFP (10 nm) und markiertem **GSH^{NPP}** (500 nm) konnte detektiert werden. d) Wechselwirkung von GST-eGFP (10 nm) und markiertem **GSH^{NPP}** (500 nm), verfolgt in Echtzeit durch FRET. Detektion der Akzeptor-Fluoreszenz bei 592 nm und Donor-Anregung bei 366 nm, die gleichzeitig zur Photoaktivierung genutzt wurde. CPS = „counts per second“.

tion mit markiertem **GSH^{NPP}** zeigt keinen signifikanten FRET (siehe die Hintergrundinformationen), dagegen führt die Belichtung des markierten **GSH^{NPP}** zu einem FRET-Signal, das über die Zu- und Abnahme der Akzeptor- und Donor-Fluoreszenz nachgewiesen wird (Abbildung 3a,b). Die K_D des belichteten ATTO565-markiertem **GSH^{NPP}** entspricht $(53 \pm 2) \text{ nm}$, was einer höheren Affinität als GSH entspricht.^[22] Das Ergebnis wurde durch Auswertung der Akzeptor-Fluoreszenz bestätigt.^[23] Die lichtinduzierte GSH-GST-Wechselwirkung konnte ebenfalls in Echtzeit anhand des FRET verfolgt werden. GST-eGFP (10 nm) und ATTO565-markiertes **GSH^{NPP}** (500 nm) wurden mit 366 nm belichtet. Ein Anstieg bzw. Abfall der Akzeptor- und Donor-Fluoreszenz konnte detektiert werden (Abbildung 3c). Aufgrund des kleinen Belichtungsvolumens in der Küvette ist die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Diffusion von **GSH^{NPP}** beschränkt und deshalb nicht vergleichbar mit der tatsächlichen Reaktionsgeschwindigkeit (Abbildung 3d).

Als nächstes wurde der In-situ-Anordnung von GST-Fusionsproteinen an **GSH^{NPP}**- und **GSH^{NPP2}**-funktionalisierten

Glasoberflächen untersucht. Die lichtgesteuerte Proteinorganisation wurde mithilfe einer strukturierten, chrombeschichteten Quarzglasmaske durchgeführt. Die Maske wurde auf die **GSH^{NPP}**- oder **GSH^{NPP2}**-funktionalisierten Glasoberflächen platziert und 3 min mit 366 nm (Xe/Hg-Lampe, 200 W) belichtet. Nach der Belichtung wurden die funktionalisierten Oberflächen mit GST-eGFP (500 nm) inkubiert. Der Prozess der Photoaktivierung und Anordnung wurde mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops („confocal laser scanning microscope“, CLSM) kontrolliert. Hierbei wurden definierte Strukturen von GST-eGFP an den belichteten Stellen beobachtet (Abbildung 4a). Ein herausragender Kontrast spricht für die hohe Spezifität des photoaktivierbaren **GSH^{NPP}**. Aufgrund der größeren Hydrophobie des dop-

pelt geschützten **GSH^{NPP2}** wurde eine erhöhte unspezifische Proteinbindung an entsprechenden Oberflächen beobachtet (siehe die Hintergrundinformationen). Trotz der schnellen Assoziations- und Dissoziationsprozesse waren die Proteinstrukturen an photoaktivierten **GSH^{NPP}**-Oberflächen mehrere Tage lang stabil und konnten für wiederholte Photoexperimente verwendet werden. Die Dissoziation der Proteine konnte durch Inkubation mit Elutionspuffer (10 mM Glycin, pH 2.0) in weniger als 10 s erreicht werden. Nach Äquilibrieren der regenerierten Glasoberflächen in TBS-Puffer konnten identische Strukturen mit GST-eGFP reproduziert werden. Neben Maskenlithographie konnten auch Strukturen in situ mit dem Laserrastermikroskop erzeugt werden. Frei

strukturierte Flächen wurden durch Belichtung mit einem 405-nm-Diodenlaser erzeugt, wobei die GST-eGFP-Bindung mit dem CLSM ($\lambda_{\text{ex/em}} = 488/520 \text{ nm}$) verfolgt wurde. Verschiedene Proteindichten konnten durch Variation der Belichtungsstärke erzielt werden (Abbildung 4b).

Zur Beurteilung der räumlichen Auflösung wurden die Oberflächen mit einem Punktlaser belichtet. Die numerische Apertur des Objektivs und die Wellenlänge des Lasers bestimmen hierbei das fokale Volumen. Beugungsbegrenzte Linien ($0.29 \mu\text{m}$ breit und $58 \mu\text{m}$ lang) wurden mit dem 405-nm-Laser in 41 ms abgetastet. Erkennbare Strukturen, welche eine Halbwertsbreite von 500 nm aufweisen, können bereits nach zwei Iterationen (82 ms) detektiert werden (Abbildung 4c). Ein noch schnelleres Schreiben kann durch Verkleinerung der Strukturen erreicht werden. Wiederholtes Abtasten führt zu einer Sättigung und Unschärfe der Strukturen.

Nachfolgend wurde die Bindung von GST-eGFP (500 nm) in Echtzeit verfolgt. Die Aktivierung fand durch eine Rasterung mit dem 405-nm-Diodenlaser statt (Lichtblitz). Parallel wurde die Fluoreszenz von GST-eGFP detektiert (Abbildung 4d). Die monoex-

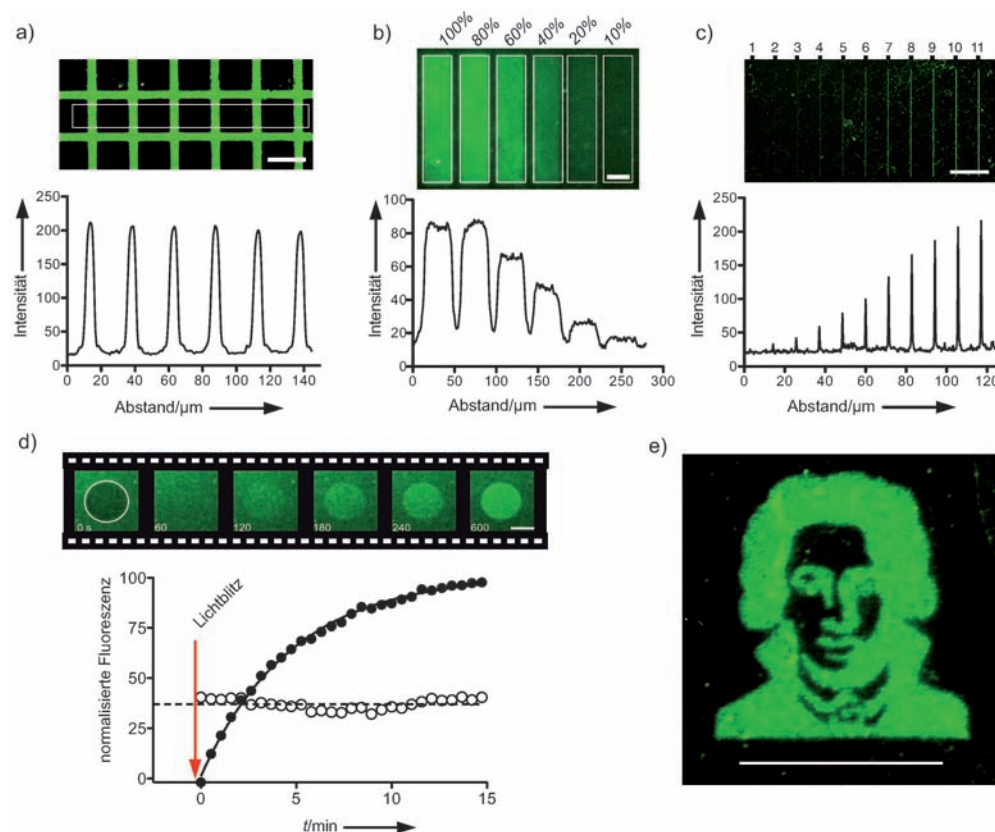


Abbildung 4. Lichtgesteuerte In-situ-Organisation von GST-Fusionsproteinen. a) Proteinabweisende PEGylierte Oberflächen wurden mit **GSH^{NPP}** funktionalisiert und durch Maskenlithographie mit 366 nm strukturiert. Nach Waschen mit TBS-Puffer wurde die GST-eGFP (500 nm)-Bindung mithilfe eines konfokalen Laserrastermikroskops untersucht. Die Anregung des Fluoreszenz-Donors wurde mit einem 488-nm-Argon-Laser (10% max. Leistung, 30 mW) durchgeführt, wobei scharf umgrenzte Strukturen mit hohem Kontrast erzeugt wurden. Ein Intensitätsprofil wurde über den markierten Bereich erstellt. b) Verschiedene laterale Dichten von GST-Fusionsproteinen konnten durch In-situ-Strukturierung mit variierenden Belichtungsstärken des 405-nm-DiodenLasers (100% max. Leistung, 20 mW) erzeugt werden. Diese Strukturen wurden mit einem 488-nm-Argon-Laser gelesen. c) Zur Bestimmung der räumlichen Auflösung wurden einzelne Linien mit unterschiedlich vielen Wiederholungen geschrieben (41 ms für einmal Abtasten, $0.29 \mu\text{m} \times 58.0 \mu\text{m}$). Nach einer Wiederholung (82 ms) konnten erste Proteinstrukturen beobachtet werden. Ein weiteres Abtasten mit dem Laser führt zu einer Unschärfe der Struktur. d) In-situ-Proteinanordnung in Echtzeit. Eine mit **GSH^{NPP}** funktionalisierte proteinabweisende PEGylierte Oberfläche wurde mit einem 405-nm-Laser im markierten Kreis für weniger als 10 s belichtet. Detektion mit einem 488-nm-Laser ergab die Echtzeitbindungskinetik von GST-eGFP (500 nm in TBS-Puffer). Analyse durch eine monoexponentielle Zunahme der GST-eGFP-Fluoreszenz (volle Kreise) ergibt eine Assoziationsgeschwindigkeit von $(0.21 \pm 0.01) \text{ min}^{-1}$ [$\tau_{1/2} = (3.3 \pm 0.1) \text{ min}$]. Offene Kreise stellen die Fluoreszenz von GST-eGFP (500 nm) in Lösung dar. e) Frei gestaltete Proteinmuster können durch einmaliges Rastern mit dem Laser (405 nm; $< 1 \text{ min}$) erzeugt werden. Der weiße Balken entspricht $20 \mu\text{m}$.

ponentielle Bindung ergibt ein k_{on} von 0.2 min^{-1} . Sequenzielles Schreiben von verschiedenen Proteinmustern kann somit realisiert werden. Letztendlich wurde der 405-nm-Laser verwendet, um frei gewählte Strukturen mit GST-Fusionsproteinen zu erzeugen (Abbildung 4e). Durch die Verwendung von verschiedenen GST-Fusionsproteinen können durch Licht gesteuert Multiproteinoberflächen erzeugt werden.^[10] So könnte das GSH-GST-Wechselwirkungsnetz^[24] in der Zelle durch Licht moduliert werden.

Basierend auf der GSH-GST-Wechselwirkung haben wir ein neues photoaktivierbares Schlüssel-Schloss-System entwickelt, das universell einsetzbar ist. Die Substanz **GSH^{NPP}** kann auf verschiedenste Weise am Cystein modifiziert werden, ohne dabei die GST-Bindung gravierend zu stören. Die Funktionalisierung mit Fluorophoren wurde ebenso gezeigt wie die kovalente Immobilisierung an Oberflächen. Die Entschützung mit Licht ist sehr schnell und liegt je nach Anwendung im Bereich von Millisekunden bis Sekunden. Das System weist eine sehr gute zeitliche Auflösung auf, was in Bezug auf Photoschädigung ein großer Vorteil für In-vitro- und In-vivo-Experimente ist. Zusätzlich wurde eine gute räumliche Auflösung durch die Verwendung eines CLSM erreicht; so wird das Schreiben und Lesen von Strukturen mit einer optischen Auflösung unter 500 nm ermöglicht.

Eingegangen am 16. November 2011
Online veröffentlicht am 5. März 2012

Stichwörter: Glutathion-S-Transferase ·
Lichtgesteuerte Chemische Biologie ·
Photoaktivierbare Substanzen · Photoaktivierung ·
Proteinimmobilisierung

- [1] J. D. Hayes, L. I. McLellan, *Free Radical Res.* **1999**, *31*, 273–300.
- [2] a) H. F. Gilbert, *Methods Enzymol.* **1984**, *107*, 330–351; b) F. Q. Schafer, G. R. Buettner, *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *30*, 1191–1212; c) S. Dimmeler, A. M. Zeiher, *Cell* **2007**, *130*, 401–402.
- [3] R. L. Krauth-Siegel, H. Bauer, R. H. Schirmer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 698–724; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 690–715.
- [4] K. J. Ritchie, S. Walsh, O. J. Sansom, C. J. Henderson, C. R. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20859–20864.
- [5] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner, *J. Nutr.* **2004**, *134*, 489–492.

- [6] V. B. Djordjević, *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *237*, 57–89.
- [7] A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, A. F. Casini, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1499–1503.
- [8] D. B. Smith, K. S. Johnson, *Gene* **1988**, *67*, 31–40.
- [9] a) H.-S. Ro, B. H. Koh, S. O. Jung, H. K. Park, Y.-B. Shin, M.-G. Kim, B. H. Chung, *Proteomics* **2006**, *6*, 2108–2111; b) J.-W. Jung, S.-H. Jung, H.-S. Kim, J. S. Yuk, J.-B. Park, Y.-M. Kim, J.-A. Han, P.-H. Kim, K.-S. Ha, *Proteomics* **2006**, *6*, 1110–1120.
- [10] C. M. Kolodziej, C.-W. Chang, H. D. Maynard, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 1457–1461.
- [11] a) A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4785–4791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4707–4712; b) J. M. Alonso, A. Reichel, J. Piehler, A. del Campo, *Langmuir* **2008**, *24*, 448–457; c) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; d) G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628; e) M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic Studies in Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [12] M. C. Pirrung, C. Y. Huang, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 317–321.
- [13] S. Banala, A. Arnold, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 38–41.
- [14] a) C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K. H. Wiesmüller, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6146–6151; b) M. Bhagawati, S. Lata, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5932–5933.
- [15] T. Fehrentz, M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.
- [16] a) S. Fodor, J. Read, M. Pirrung, L. Stryer, A. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773; b) S. Li, D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. J. Luebke, H. R. Garner, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4088–4089.
- [17] a) A. Deiters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 678–686; b) X. Tang, I. J. Dmochowski, *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 100–110.
- [18] S. Petersen, J. M. Alonso, A. Specht, P. Duodu, M. Goeldner, A. del Campo, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3236–3239; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3192–3195.
- [19] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [20] A. E. Adang, J. Brussee, A. van der Gen, G. J. Mulder, *Biochem. J.* **1990**, *269*, 47–54.
- [21] S. Raghunathan, R. J. Chandross, R. H. Kretsinger, T. J. Allison, C. J. Penington, G. S. Rule, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 815–832.
- [22] I. Jakobson, M. Warholm, B. Mannervik, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 7085–7089.
- [23] S. F. Martin, M. H. Tatham, R. T. Hay, I. D. W. Samuel, *Protein Sci.* **2008**, *17*, 777–784.
- [24] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760–1763.