

Ein zellpermeables und photospaltbares Reagens für die selektive intrazelluläre Protein-Protein-Dimerisierung**

Mirjam Zimmermann, Ruben Cal, Elia Janett, Viktor Hoffmann, Christian G. Bochet, Edwin Constable, Florent Beaufils* und Matthias P. Wymann*

Abstract: Selektive Dimerisierungsreagentien (CIDs; *chemical inducers of dimerization*) wurden entwickelt, um die Protein-Dimerisierung und -Translokation chemisch zu steuern. Wir stellen hier ein neues, photospaltbares CID (*MeNV-HaXS*) vor, das *HaloTag*- und *SNAP-tag*-Fusionsproteine bindet und eine exzellente Selektivität und intrazelluläre Reaktivität besitzt. Die Anregung bei 360 nm spaltet die Methyl-6-nitroveratryl-Gruppe von *MeNV-HaXS*, und das „Dimere“, wieder in die beiden Proteine. *MeNV-HaXS* verknüpft *HaloTag*- und *SNAP-tag*-Fusionsproteine und erlaubt ihre zielgerichtete Verschiebung an Membranen und Zellorganellen, z.B. Plasmamembran, Endosomen, Lysosomen, Golgi, Mitochondrien und das Aktin Zytoskeletton. Die photolytische Spaltung von *MeNV-HaXS* setzt Zielproteine frei und ermöglicht die optische Manipulation der Proteinlokalisation mit hoher subzellulärer Präzision in Raum und Zeit. *MeNV-HaXS* ermöglicht so kinetische Studien, Manipulation der Proteindynamik und der subzellulärer Enzymaktivität. Demonstriert wurde die Anwendung von *MeNV-HaXS* für die zielgerichtete Protein-Translokation an den Golgi und die kinetische Erhebung von Importprozessen in den Zellkern.

Die Lokalisierung von Signalenzymen ist eine essentielle Voraussetzung, um die durch Protein- und Lipidkinasen gesteuerten Signalkaskaden in physiologischen und krankhaften Vorgängen steuern zu können.^[1] Die lichtinduzierte Steuerung der Proteinlokalisation und Enzymaktivität eröffnet einen einmaligen, zeitgenauen und lokalisierten Zugang zur Manipulation von biologischen Prozessen in lebenden Zellen. Durch Licht freigesetzte kleine Moleküle und Enzymsubstrate wurden für viele Anwendungen entwickelt.^[2]

Natürlich vorkommende, lichtempfindliche Proteindomänen wurden kürzlich eingesetzt, um genetisch kodierte lichtkontrollierte Protein-Protein-Interaktionsmodule herzustellen. Diese sogenannten optogenetischen Systeme enthalten einen photoisomerisierbaren Chromophor, der bei Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge seine Konformation ändert. Optogenetische Systeme wurde bereits genutzt, um Signalproteine zu aktivieren (z.B. lichtinduzierbare GTPase Rac)^[3] oder zelluläre Signalwege durch lichtinduzierte Dimerisierung zweier Proteinmodule indirekt zu manipulieren.^[4] Optogenetische lichtaktivierte Systeme sind wertvolle Werkzeuge, umfassen aber große, photosensorische Proteindomänen,^[4,5] benötigen exogene Cofaktoren,^[4] reagieren oft langsam,^[5] bilden unerwünschte Homodimere^[6] und können empfindlich gegenüber Umgebungslicht sein. Darüber hinaus überlappen ihre Spektren mit den Wellenlängen häufig eingesetzter fluoreszierender Reportersysteme.^[6,7]

Ein alternativer Ansatz zur Steuerung der Proteinlokalisierung und Enzymaktivität ist die Verwendung von chemischen Dimerisierungsreagentien (CIDs)^[8] oder „selbstlokalisierenden“ Liganden,^[9] die erfolgreich zur Manipulation von Signalwegen, z.B. dem Phosphoinositid-Umsatz,^[10] und kleinen GTPasen^[11] eingesetzt wurden.

Zellpermeable CIDs, die intrazellulär manipuliert werden können, existieren zurzeit nicht.^[8] Eine begrenzte räumliche Selektivität wurde mit photolysierbarem biotinyliertem α-Methylnitrobenzylrapamycin erreicht, das benutzt wurde, um die Aktivität kleiner GTPasen zu steuern.^[12] Dieses geschützte Rapamycin wurde mittels der Biotingruppe extrazellulär deponiert, und Rapamycin konnte erst nach Photolyse in die Zelle diffundieren.^[12] Ein weiteres photospaltbares Rapamycin-Derivat ist pRap.^[13] Beide dieser nichtkovalenten, photospaltbaren CIDs stellen eine Quelle für ein hoch difusibles Dimerisierungsreagens dar, was eine räumlich präzise Steuerung der Zielproteine schwierig macht.

Hier präsentieren wir ein neuartiges, photospaltbares CID, das eine Verknüpfung von Proteinen durch *HaloTag*^[14] und *SNAP-tag*^[15] herstellt. Die photospaltbare Methyl-6-nitroveratryl(MeNV)-Gruppe wurde so zwischen den mit Ha-

[*] M. Zimmermann,^[+] R. Cal,^[+] V. Hoffmann, Dr. F. Beaufils, Prof. Dr. M. P. Wymann
Universität Basel, Dept. Biomedizin
Mattenstrasse 28, Basel (Schweiz)
E-Mail: Florent.Beaufils@Unibas.CH
Matthias.Wymann@Unibas.CH

E. Janett, Prof. Dr. C. G. Bochet
Universität Fribourg, Dept. Chemie
Chemin du Musée 9, Fribourg (Schweiz)
Prof. Dr. E. Constable
University of Basel, Department für Chemistry
Spitalstrasse 51, Basel (Schweiz)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Takanari Inoue für FRB-YFP-Giantin und Stephan Hübner für NLS-CFP-FKBP-Expressionskonstrukte. Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds (205320-138302, 205320-143699), das ESF EuroMEMBRANE-Programm (31EM30-126143) und die Novartis (Jubilé) Stiftung unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310969> zu finden.

© 2014 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

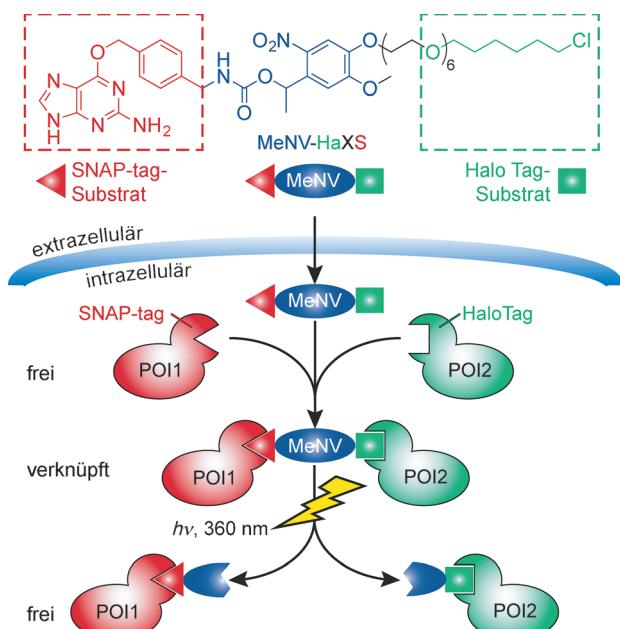


Abbildung 1. Photospaltbares zellpermeables HaloTag- und SNAP-tag-reaktives Dimerisierungsreagens (CID) mit Methyl-6-nitroveratryl (MeNV) als Strukturkern (MeNV-HaXS). Im Zellinnern dimerisiert MeNV-HaXS HaloTag- und SNAP-tag-fusionierte Proteine (proteins of interest, POI). Bestrahlung von MeNV-HaXS (360 nm; $\epsilon = 4058\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$; Quantenausbeute = 0.075) spaltet die Verknüpfung zwischen den POIs und entlässt sie aus dem kovalenten Komplex. Die Synthese von MeNV-HaXS ist in den Hintergrundinformationen detailliert beschrieben.

IoTag bzw. SNAP-tag reagierenden Gruppen eingefügt, dass die Zellpermeabilität des resultierenden CID-Moleküls (MeNV-HaXS; siehe Abbildung 1) erhalten blieb. Diese Kombination von chemisch induzierter Dimerisierung und der Möglichkeit einer nachträglichen lichtinduzierten Trennung der Protein-Protein-Dimere vereint die Vorteile genetisch kodierbarer Proteinmodule mit der zeitlich steuerbaren optischen und räumlichen Kontrolle von Proteinkomplexen.

Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, dringt MeNV-HaXS in Zellen ein und bewirkt die Verknüpfung von HaloTag und SNAP-tag zu einem kovalent stabilisierten Komplex. Lichtbestrahlung (bei 360 nm) verursacht die Spaltung der MeNV-Gruppe und die Dissoziation des Komplexes, sodass die Proteinlasten freigesetzt werden.

MeNV-HaXS wurde so optimiert, dass seine Zellpermeabilität der eines nicht photospaltbaren Dimerisierungsreagens von HaloTag- und SNAP-tag-Fusionsproteinen (HaXS8)^[16] nahekommt. Die zeitabhängige Dimerisierung von in HeLa-Zellen exprimierten HaloTag-GFP- und SNAP-tag-GFP-Fusionsproteinen wurde nach Zugabe von MeNV-HaXS und HaXS8 verfolgt. Es zeigte sich, dass MeNV-HaXS in der Lage ist, Dimere mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie HaXS8 zu bilden. Kleine Unterschiede waren bei frühen Zeitpunkten ($t < 10\text{ min}$) messbar, waren aber 15 min nach Zugabe nicht mehr signifikant (Abbildung 2a). Die kleinen Differenzen können mit dem größeren Molekulargewicht und der größeren Polarität von MeNV-HaXS aufgrund der Integration des PEG6-Bausteins erklärt werden. MeNV-

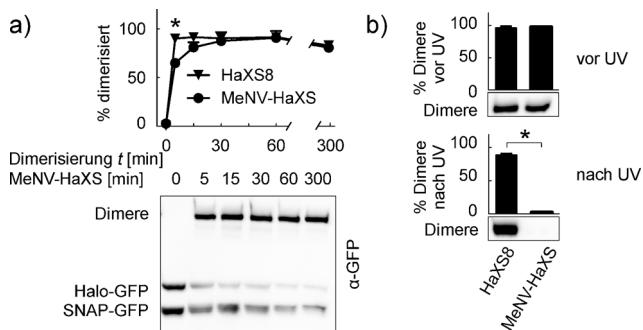


Abbildung 2. Durch MeNV-HaXS induzierte Bildung intrazellulärer Dimere aus HaloTag- und SNAP-tag-Fusionsproteinen sowie deren anschließende Spaltung durch UV-Bestrahlung. a) HeLa-Zellen, transfiziert mit Expressionskonstrukten für SNAP-tag-GFP- (SNAP-GFP) und HaloTag-GFP(Halo-GFP)-Fusionsproteine wurden mit 5 μM MeNV-HaXS oder 5 μM lichtunempfindlichen HaXS8 für die gegebene Zeitdauer in Zellkulturmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, und Proteine wurden mit SDS-PAGE und Immunblotting analysiert. Die Fusionsproteine wurden schließlich mit anti-GFP- (primären) und Meerrettichperoxidase-markierten (sekundären) Antikörpern und Chemilumineszenz detektiert (Mittelwert \pm SEM, $n=3$). * steht für $p < 0.05$. b) SNAP-GFP und Halo-GFP exprimierende HeLa-Zellen wie in (a) wurden mit 5 μM MeNV-HaXS oder 5 μM HaXS8 für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, in physiologischen Phosphatpuffer (PBS) überführt (um überschüssige CIDs zu entfernen) und schließlich mit einer UV-Lampe (100 Watt, 5 cm Abstand) für 10 min bestrahlt. Die Dimerisierung wurde dann wie in (a) analysiert. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, $n=3$; * steht für $p < 0.05$.

HaXS-induzierte HaloTag-SNAP-tag-Dimere waren mehr als 5 h stabil, und Umgebungslicht hatte keinen Einfluss auf die Beständigkeit der Dimere.

Aufgrund der vergleichbaren Dimerisierungseigenschaften von MeNV-HaXS und HaXS8 kann das nicht spaltbare HaXS8 als Referenzsubstanz verwendet werden, um die Effizienz der photolytischen Spaltung und eventuelle unerwünschte Nebeneffekte der UV-Bestrahlung aufzufinden. Die Effizienz der photolytischen Spaltung von MeNV-HaXS wurde in HeLa-Zellen, die HaloTag- und SNAP-tag-Fusionsproteine coexprimierten, getestet. Ein mit MeNV-HaXS vorgängig gebildeter HaloTag-SNAP-tag-Komplex konnte in Petri-Schalen großflächig durch UV-Beleuchtung (360 nm; Blak-Ray, B-100A, UVP) gespalten werden. Die Quantifizierung der Proteindimere vor und nach UV-Bestrahlung ergab, dass die MeNV-HaXS-induzierten Dimere durch 10 min Bestrahlung vollständig gespalten wurden, während die HaXS8-induzierten Dimere intakt blieben (Abbildung 2b).

MeNV-HaXS eröffnet deshalb die Möglichkeit, eine kovalente Dimerisierung zu induzieren und die assoziierten Proteine anschließend kontrolliert freizusetzen. Dies ermöglicht eine Manipulation der Proteinlokalisierung und kann genutzt werden, um zelluläre Signale zeitlich und räumlich zu simulieren. Viele Ereignisse in der zellulären Signalausbreitung finden räumlich begrenzt statt. Mittels HaloTag- oder SNAP-tag-fusionierten Ankerproteinen und MeNV-HaXS-Zugabe kann es gelingen, Signallenzyme aus ihren produktiven Kompartimenten abzuschöpfen. Die Anwendung von

MeNV-HaXS wurde für die zielgerichtete Translokation von Fusionsproteinen auf intrazelluläre Organellen wie Golgi (Abbildung 3a), die Plasmamembran, Lysosomen, Mitochondrien und das Actinzytoskelett validiert (Abbildung S2).

Tatsächlich konnten durch räumlich definierte Bestrahlung von MeNV-HaXS-verankerten Proteinkomplexen (mit einem mit XY-Rasterlaser für FRAP (fluorescence recovery after photobleaching; 355 nm) ausgestatteten Mikroskop) Fusionsproteine selektiv freigesetzt werden. HeLa-Zellen wurden hierfür mit dem zytosolischen Fusionsprotein SNAP-

mTFP1 [teal fluorescent (cyan) SNAP-tag fusion protein] und dem Golgi-Ankerprotein Halo-RFP-Giantin [konstruiert durch Fusion von rot fluoreszierendem Protein (monomeres RFP, TagRFP), einem HaloTag, und einem C-terminalen Golgi-targetierenden Giantin-abgeleiteten Motiv]^[17] cotransfiziert.

Die Inkubation mit 5 μM MeNV-HaXS oder 5 μM HaXS8 führte zu einer effizienten Translokation des vorher zytosolischen SNAP-mTFP1 an die Oberfläche von Golgi-Membranen (Abbildung 3a). Nach lokalisierter Anregung (8×5 ms bei 355 nm) einer Subpopulation von Golgi-Vesikeln wurde SNAP-mTFP1 quantitativ und selektiv von bestrahlten, aber nicht von unbestrahlten Vesikeln freigesetzt (Abbildung 3a,c). Keine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität wurde beobachtet, wenn das lichtunempfindliche HaXS8 verwendet wurde, um SNAP-mTFP1 auf Golgi-Membranen zu verankern (Abbildung 3b,c). Dies bestätigt, dass die lichtinduzierte lokale Abnahme der Fluoreszenzintensität von MeNV-HaXS-gebundenem SNAP-mTFP1 durch die Freisetzung der Probe und nicht durch Ausbleichung der SNAP-mTFP1-Fluoreszenz verursacht wird. Darüber hinaus wird das membranverankerte SNAP-mTFP1 durch einen Laserpuls sehr schnell von Membranen freigesetzt ($t < 1$ s). Das demonstriert, dass MeNV-HaXS geeignet ist, die Lokalisierung von Proteinen räumlich präzise und im Sekundenbereich zu kontrollieren.

Da ein Raster-FRAP-Laser nicht zur Standardausrüstung eines Fluoreszenzmikroskops gehört, haben wir die Möglichkeit untersucht, konventionelle DAPI-Anregungsfilter (377 ± 25 nm; Standard-Quecksilberhalogenidlampe) zur Anregung der Photolyse der MeNV-HaXS-induzierten Proteinkomplexe zu verwenden. Dabei konnten wir bestätigen, dass eine Bestrahlungsdauer von < 20 s ausreicht, um SNAP-mTFP1 vollständig von Golgi-Membranen freizusetzen (Abbildung 3d,e). Die gleichzeitige Zunahme der mTFP1-Fluoreszenzintensität im Zytoplasma zeigt auch, dass der lichtinduzierte Abfall der vesikulären SNAP-mTFP1-Intensität wiederum durch SNAP-mTFP1-Freisetzung anstatt einer globalen Photobleichung verursacht wird.

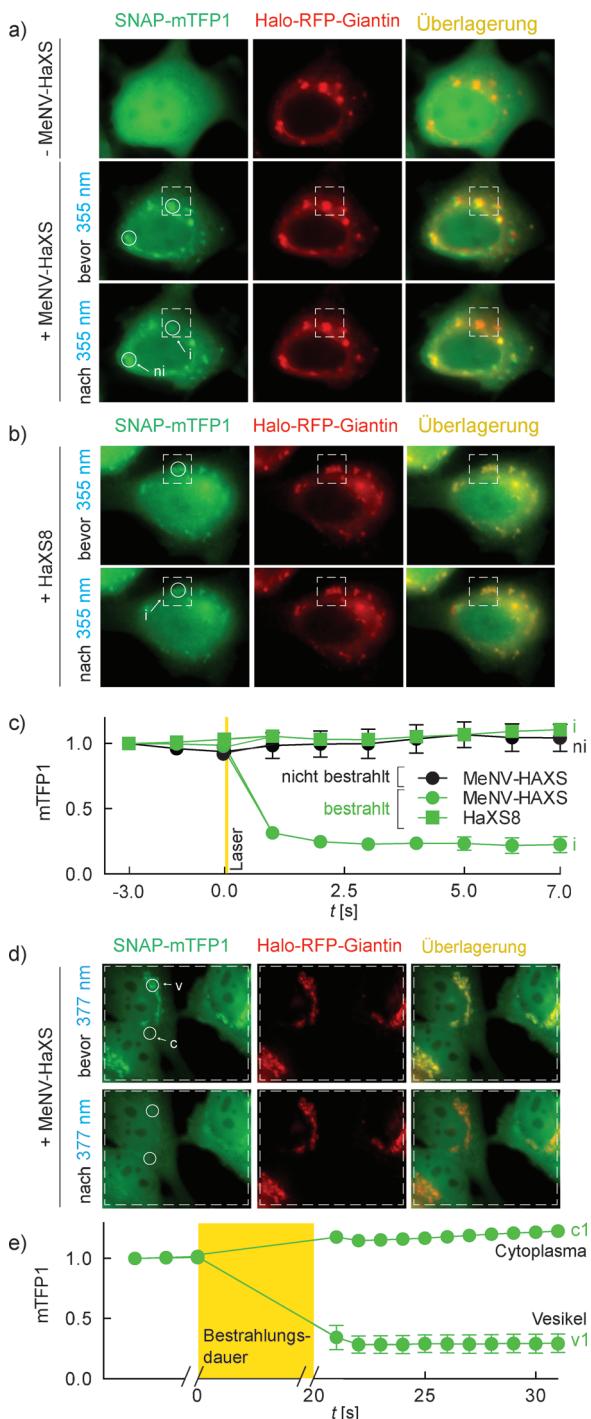


Abbildung 3. Translokation des zytosolischen SNAP-mTFP1-Proteins an den Golgi und seine UV-induzierte Freisetzung. a,b) HeLa-Zellen, die SNAP-mTFP1 und Halo-RFP-Giantin exprimieren, wurden mit a) 5 μM MeNV-HaXS oder b) 5 μM HaXS8 in Zellkulturmedium für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dies führte zur induzierten Translokation von SNAP-mTFP1 an Golgi-Membranen. a,b) Die Intensität von SNAP-mTFP1 in den eingekreisten Bereichen wurde vor und nach Bestrahlung einer subzellulären Region gemessen (mit FRAP-Laser; 8 Bereiche $\times 5$ ms bei 355 nm; innerhalb der weiß gestrichelten Quadrate). c) Quantifizierung der mTFP1-Fluoreszenzintensität in den eingekreisten Regionen in (a) und (b) für SNAP-mTFP1 nach Zugabe von MeNV-HaXS (runde Symbole) oder HaXS8 (Quadrate). Die mTFP1-Intensität in bestrahlten (grüne Kurven) und unbestrahlten Golgi-Vesikeln (schwarze Kurven) sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 10$, Fehlerbalken nicht gezeigt wenn kleiner als Symbole). d) HeLa-Zellen wie in (a) wurden mit 5 μM MeNV-HaXS inkubiert und anschließend 20 s durch ein Standard-DAPI-Filterset auf einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop ($t = 20$ s, 377 ± 25 nm) bestrahlt. e) Quantifizierung der mTFP1-Fluoreszenz auf Golgi-Vesikeln (v1) und im Zytoplasma (c1) vor und nach Bestrahlung, wie in (d) (Mittelwerte \pm SEM, $n = 10$, Fehlerbalken nicht gezeigt wenn kleiner als Symbole; weitere Kontrollen in Abbildung S3).

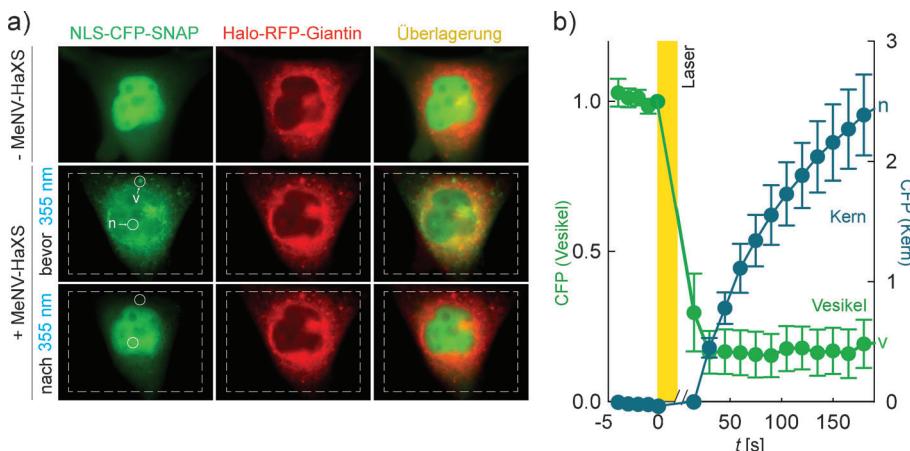


Abbildung 4. Steuerung des nukleären Imports und Exports mit MeNV-HaXS. Die Translokation einer NLS-CFP-SNAP-Sonde aus dem Kern an den Golgi wurde durch Zugabe von MeNV-HaXS ausgelöst und durch anschließende UV-Bestrahlung umgekehrt. a) HeLa-Zellen, die Halo-RFP-Giantin und NLS-CFP-SNAP coexprimieren, wurden mit 5 μ M MeNV-HaXS in Zellkulturmedium für 15 min bei 37°C inkubiert, was den Export von NLS-CFP-SNAP zur Folge hatte. Die CFP-Fluoreszenzintensität wurde in den eingekreisten Regionen vor und nach UV-Bestrahlung gemessen (innerhalb der weiß gestrichelten Rechtecke; FRAP-Laser, 150 Bereiche \times 5 ms bei 355 nm). b) Bestimmung der CFP-Fluoreszenz von NLS-CFP-SNAP in den eingekreisten Regionen in (a) auf Vesikeln (grüne Kurve) und im Zellkern (blaue Kurve) vor und nach UV-Bestrahlung (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$, Fehlerbalken nicht gezeigt wenn kleiner als Symbole).

Zwar ist die Photospaltung mittels konventioneller DAPI-Anregungsfilter langsamer als mit dem oben beschriebenen FRAP-System (bedingt durch die limitierten Anregungsenergien), allerdings ist zu bedenken, dass die Verwendung solcher Filter mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopen die Grundlage für ein breites Anwendungsfeld des MeNV-HaXS-Systems schafft.

Anders als bisher beschriebene CIDs bietet MeNV-HaXS die Möglichkeit, Lasten durch UV-Anregung sofortig freizusetzen. Um das Konzept weiter zu testen, wurde eine normalerweise im Kern lokalisierte Sonde gezwungen, an Golgi-Ankerproteine anzudocken. Die Fluoreszenzsonde NLS-CFP-SNAP (NLS = nuclear localization sequence) reichert sich normalerweise im Zellkern an, wenn sie in HeLa-Zellen exprimiert wird. Wurden hingegen der Golgi-Anker Giantin-RFP-Halo coexprimiert und MeNV-HaXS zugegeben, so wurde NLS-CFP-SNAP in perinukleären Depots auf dem Golgi eingefangen (Abbildung 4a). Anschließende Bestrahlung der Zellen führte dann zur Freisetzung von NLS-CFP-SNAP vom Golgi, und NLS-CFP-SNAP konnte innerhalb von Sekunden im Zytosol nachgewiesen werden (Abbildung 4b). Der nukleäre Import des freigesetzten NLS-CFP-SNAP war (verzögert) zu beobachten (Abbildung 4b).^[18] Dieses Ergebnis illustriert, dass die Photolyse von MeNV-HaXS schnell vollzogen werden kann, und dass das System geeignet ist, nukleäre Importkinetiken in Echtzeit in einem einfachen experimentellen System zu bestimmen.

MeNV-HaXS ist ein zellpermeables CID, das die Bildung von kovalent stabilisierten, aber photospaltbaren Proteinkomplexen ermöglicht. Wie auch für andere CID-Anwendungen ist das Design der Fusionsproteine mit interagierenden Proteindomänen ein wichtiger Faktor. Die kovalente Bindung, die durch MeNV-HaXS vermittelt wird, vereinfacht

die Überwachung und Validierung der Proteinkomplexe enorm. MeNV-HaXS ist deshalb ein wertvolles Werkzeug, das die intrazelluläre Proteindimerisierung mit einer effizienten, kontrollierten Photolyse verbindet. Zudem ist die Photolyse kompatibel mit häufig verwendeten fluoreszenten Reporterproteinen. Die Möglichkeit, Proteinkalisation durch zwei unabhängige Vorgänge zu steuern, kann zur De-lokalisierung von Signalproteinen genutzt werden. Die CID-abhängige Konzentration von Signallenzymen in nicht-funktionellen Kompartimenten wurde bereits als elegante Methode zur Unterbrechung von Signalwegen beschrieben.^[19,20] Die optisch gesteuerte Spaltung von MeNV-HaXS kann verankerte Proteine freisetzen und ihre Funktion wiederherstellen. Dies eröffnet viele mögliche Szenarien, z.B. könnten „Ein-Aus-Ein“- oder „Aus-Ein-Aus“-Protokolle oder auch der

orthogonale Einsatz von MeNV-HaXS mit anderen CIDs realisiert werden. Mit der möglichen Wahl zwischen einer globalen oder lokalisierter Lichteinstrahlung zur Dissoziation CID-abhängiger Proteinkomplexe eröffnen sich viele weitere Entwicklungen, z.B. die Untersuchung der Zellkompartment-assoziierten Signalübertragung oder die Simulation von lokalisierten dynamischen physiologischen und pathologischen zellulären Prozessen.

Eingegangen am 18. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 26. März 2014

Stichwörter: Dimerisierungsreagentien · Fusionsproteine · Photospaltbare Linker · Photolyse · Protein-Protein-Wechselwirkungen

- [1] M. P. Wymann, R. Schneiter, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 162.
- [2] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900; C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446.
- [3] Y. I. Wu, X. Wang, L. He, D. Montell, K. M. Hahn, *Methods Enzymol.* **2011**, *497*, 393.
- [4] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, C. A. Voigt, *Nature* **2009**, *461*, 997.
- [5] M. Yazawa, A. M. Sadaghiani, B. Hsueh, R. E. Dolmetsch, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 941.
- [6] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, C. L. Tucker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 973.
- [7] D. Strickland, Y. Lin, E. Wagner, C. M. Hope, J. Zayner, C. Antoniou, T. R. Sosnick, E. L. Weiss, M. Glotzer, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 379.

- [8] T. W. Corson, N. Aberle, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 677.
- [9] M. Ishida, H. Watanabe, K. Takigawa, Y. Kurishita, C. Oki, A. Nakamura, I. Hamachi, S. Tsukiji, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12684.
- [10] P. Varnai, B. Thyagarajan, T. Rohacs, T. Balla, *J. Cell Biol.* **2006**, *175*, 377; T. Inoue, T. Meyer, *PLoS One* **2008**, *3*, e3068; B. C. Suh, T. Inoue, T. Meyer, B. Hille, *Science* **2006**, *314*, 1454.
- [11] F. Castellano, P. Montcourrier, P. Chavrier, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 2955; T. Inoue, W. D. Heo, J. S. Grimley, T. J. Wandless, T. Meyer, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 415.
- [12] N. Umeda, T. Ueno, C. Pohlmeier, T. Nagano, T. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12.
- [13] A. V. Karginov, Y. Zou, D. Shirvanyants, P. Kota, N. V. Dokholyan, D. D. Young, K. M. Hahn, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 420.
- [14] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohane, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373.
- [15] M. J. Hinner, K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 766.
- [16] D. Erhart, M. Zimmermann, O. Jacques, M. B. Wittwer, B. Ernst, E. Constable, M. Zvelebil, F. Beaufils, M. P. Wymann, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 549.
- [17] T. Komatsu, I. Kukelyansky, J. M. McCaffery, T. Ueno, L. C. Varela, T. Inoue, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 206.
- [18] M. Stewart, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 195.
- [19] M. S. Robinson, D. A. Sahlender, S. D. Foster, *Dev. Cell* **2010**, *18*, 324.
- [20] H. Haruki, J. Nishikawa, U. K. Laemmli, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 925.