

Visualisierung von Maustumoren mit einem lipidierten Cathepsin-S-Substrat**

Hai-Yu Hu, Divya Vats, Matej Vizovisek, Lovro Kramer, Catherine Germanier, K. Ulrich Wendt, Markus Rudin, Boris Turk,* Oliver Plettenburg* und Carsten Schultz*

Abstract: Die Synthese und Anwendung zweier für Cathepsin S spezifischer Sonden wird beschrieben. Um den langfristigen Verbleib der Sonden am Zielort und eine hohes Signal/Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurde ein Lipidierungsansatz über das Einfügen eines Palmitinsäurerestes eingesetzt. Nach Cathepsin-S-induzierter Spaltung in Zellen und im transplantierten Tumormausmodell stieg die Fluoreszenz durch Entlöschen stark an, und wir beobachteten eine intrazelluläre Anreicherung der Fluoreszenz im Tumorgewebe. Im Vergleich zur nichtlipidierten Sonde lieferte die lipidierte Sonde ein anhaltendes starkes Fluoreszenzsignal im Tumor. Dies zeigt, dass nichtinvasive Tumорidentifikation per Fluoreszenz möglich ist. Das Prinzip der Lipidierungs-vermittelten Verabreichung kann potenziell auch auf zytotoxische Verbindungen erweitert werden, um Tumormasse zu reduzieren.

Ein ultimatives Ziel in der Krebsdiagnose ist es, Tumoren in Patienten früh und minimalinvasiv zu lokalisieren.^[1] In den letzten Jahren haben sich optische Bildgebungstechniken wegen ihrer hohen Selektivität und guten räumlichen Auflösung zu wichtigen nichtinvasiven Techniken in der Tumordetektion und zur Verfolgung von Therapien entwickelt.^[2] Die Grenzen dieser Technik bestehen darin, dass das Fluoreszenzsignal durch Körpermasse, Haut und Haare, anders als bei MRI und CT, stark abgeschwächt wird, vorwiegend durch Lichtabsorption und -streuung. Außerdem reduziert die Autofluoreszenz des Gewebes oft das Signal/Rausch-Verhältnis.

nis.^[3] Eine Maßnahme zur Verringerung dieser Probleme besteht in der Verwendung von tumorspezifischen Enzymsubstraten in Kombination mit Farbstoffen, die im nahen Infrarot (NIR) emittieren. Proteasen sind typische Enzyme, die im direkten Tumorumfeld sowohl von Tumorzellen als auch von tumorassoziierten Zellen abgesondert werden. Sie sind für Tumorwachstum, Gewebeinfiltration und den veränderten Metabolismus der Tumorzellen notwendig.^[4] In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Proteasesonden entwickelt, von denen einige in der klinischen Testphase sind.^[5] Ein typisches Problem dieser Sonden ist das Fehlen einer lokalen Akkumulation des neu erzeugten Signals, oft auch als „Homing“ bezeichnet. Wir erwarten, dass Sonden mit einer spezifischen Anreicherung im Tumorgewebe nach enzymatischer Spaltung ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis liefern sollten.

Unter den Proteasen, denen eine wichtige Rolle beim Krebs zugeschrieben wird, sind Cysteincathepsine, besonders Cathepsin B, L und S, wenn man pharmakologische und genetische Daten zugrunde legt.^[6] Die vorwiegende Quelle dieser Cathepsine in Krebs sind der Tumor selbst sowie tumorassoziierte Zellen, besonders Makrophagen.^[4,7] Mehrere Gruppen haben die mechanistische Rolle von Cathepsin S in In-vitro- und In-vivo-Modellen untersucht.^[7b] Die genetische Ablation von Cathepsin S in einem pankreatischen Inselzellmodell zeigte, dass das Enzym eine Rolle bei der Tumorzersetzung, der Resistenz gegen Apoptose und der Tumorgrowth.^[7c]

[*] Dr. H.-Y. Hu,^[+] Priv.-Doz. Dr. C. Schultz
 Cell Biology & Biophysics Unit
 European Molecular Biology Laboratory
 Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
 E-Mail: schultz@embl.de

Dr. D. Vats,^[+] C. Germanier, Prof. M. Rudin
 Institute for Biomedical Engineering
 ETH Zürich und Universität Zürich Zürich (Schweiz)

M. Vizovisek,^[+] L. Kramer, Prof. B. Turk
 Jozef Stefan Institute
 Department of Biochemistry and Molecular Biology
 Jamova 39, 1000 Ljubljana (Slowenien)
 E-Mail: Boris.Turk@ijs.si

M. Vizovisek,^[+] L. Kramer
 International Postgraduate School Jozef Stefan
 Ljubljana (Slowenien)

M. Vizovisek,^[+] Prof. B. Turk
 Center of Excellence CIPKEBIP
 Ljubljana (Slowenien)

Prof. B. Turk
 Faculty of Chemistry and Chemical Technology
 University of Ljubljana (Slowenien)

Dr. H.-Y. Hu,^[+] Dr. K. U. Wendt, Dr. O. Plettenburg
Sanofi Deutschland GmbH, Diabetes Division, R&D
Industriepark Park Höchst, 65926 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: Oliver.Plettenburg@sanofi.com

† Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen bei.

[**] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch LIVIMODE, ein Gemeinschaftsprojekt des Siebten Rahmenprogramms der EU. Die Arbeit wurde teilweise von der Slovene Research Agency (Fördernr. P1-0140, an B.T.) unterstützt. Wir danken R. Vidmar (JSI) für MS-Analysen der Sondenspaltung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310979> 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 License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

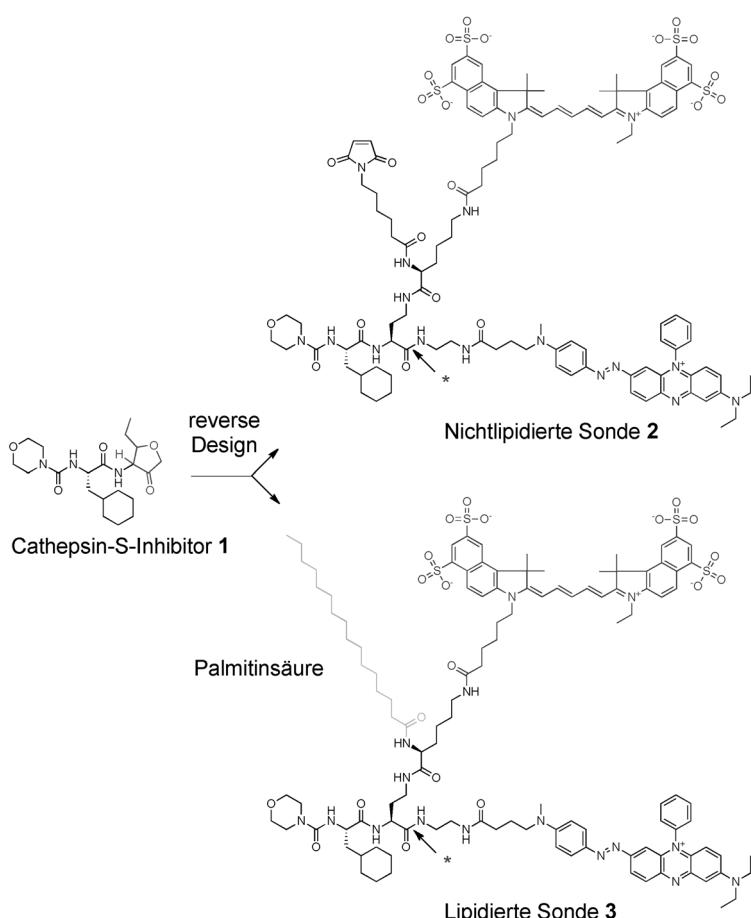
angiogenese spielt.^[7b] Ferner zeigten Kwok et al., dass Cathepsin S auf der Oberfläche von Karzinomzellen exprimiert wird und dort membranassoziiert verbleibt.^[8]

Basierend auf dem Reverse-Design-Prinzip haben wir einen hochspezifischen nichtpeptidischen Cathepsin-S-Inhibitor (**1**) in ein Substrat umgewandelt und mit einem NIR-Fluorophor und einem geeigneten Fluoreszenzlöscher versehen. Wir verwendeten eine Lipidierung, um das fluoreszierende Produkt der Enzymreaktion in der Umgebung der Enzymreaktion, gegebenenfalls also dem Tumor, zu halten (Schema 1). Reverse Design für Proteasesubstrate basiert auf der Idee, dass ein nichtpeptidischer, hochaffiner (oder kovalent bindender) Inhibitor mit optimierter Wechselwirkung mit der Protease in ein enzymatisch umsetzbares Substrat umgewandelt werden kann. Dazu wird dann eine peptidische Bindung so insertiert, dass sie nahe dem katalytischen Zentrum platziert wird.^[9] Wir fügten einen langwelliges Licht emittierenden Fluorophor (Cy5.5 für In-vivo-Nahinfrarotbildung) und einen geeigneten Löscher (BHQ-3) über reaktive Aminogruppen an den molekularen Termini ein. Eine weitere orthogonale geschützte Aminogruppe wurde verwendet, um Palmitinsäure anzuknüpfen (Schema S1 (S =

Hintergrundinformationen)). Solche Lipidierungen waren zuvor bereits eingesetzt worden, um peptidische FRET-Reporter (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer) an die Zelloberfläche von inflammatorischen Makrophagen oder Neutrophilen zu heften. Diese Zellen sekretieren Elastasen, deren hydrolytische Enzymaktivität ausschließlich auf der Zelloberfläche zu finden ist.^[10] In einigen Fällen konnte Internalisierung des fluoreszierenden Fragments beobachtet werden, was auf erfolgreiches Homing schließen lässt.^[10a] Da auch Cathepsin S sekretiert wird und während der Tumorentwicklung an der Zelloberfläche verweilt,^[7b] erwarteten wir, dass das Fluoreszenzsignal auf den Tumor und seine Mikroumgebung beschränkt bleibt. Vorausgesetzt, dass das Reverse Design unspezifische Spaltung verhindert, sollten alle anderen Gewebe sehr niedrige Fluoreszenz aufweisen und so ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis und eine bessere Tumordetektion als bei Verwendung nichtlipidierter Sonden zeigen.^[11]

Aktivitätsbasierte Cathepsin-S-empfindliche Sonden wurden zuvor als Suizidsubstrate beschrieben, die Enzyme kovalent markieren und sie dabei inaktivieren.^[12] Während solche Sonden gut geeignet sind, die Lokalisierung von Cathepsinen zu bestimmen, sind umsatzbasierte Sonden besonders hilfreich für die Bestimmung der Aktivität von Proteasen mit geringer Expression.^[9b] Verbindung **1** hat eine hohe Affinität für Cathepsin S und eine hohe Selektivität für andere Cathepsine. Daher ist **1** ein guter Startpunkt für das Reverse Design von gelöschten NIR-Sonden für Cathepsin S.^[9b] Zusätzlich zur Reportereinheit wurde der P1-Abschnitt mit einem verzweigten Linker zur Anbringung der Palmitinsäure versehen (Schema 1). Ausgehend von der nichtnatürlichen Aminosäure Fmoc-DAB(Boc)-OH (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, DAB = L-2,4-Diaminobuttersäure, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl) wurde das Grundgerüst unter Verwendung von Peptidfestphasensynthese erhalten, gefolgt von der Derivatisierung der orthogonale geschützten Aminogruppen in Lösung (Schema S1). Die resultierende lipidierte Sonde **3** wurde mit dem Fluorophor Cy5.5 und dem Fluoreszenzlöscher BHQ-3 versehen (Details siehe Hintergrundinformationen). Als Vergleich wurde die nichtlipidierte Sonde **2** unter Verwendung des gleichen Linkers synthetisiert, der aber mit einem Maleimid als Verknüpfungspunkt für zukünftige Konjugationen an makromolekulare Transportsysteme ausgestattet war. Für Kontrollexperimente ließen wir Sonde **2** mit Cystein reagieren, um die Michael-Akzeptorfunktion zu entfernen (Sonde **2b**).

Die Spaltung der Sonden erfolgte mit rekombinanten Enzymen. Trotz der großen Fluorophore waren **3** und **2** gute Substrate für Cathepsin S mit Umsatzraten (k_{cat}/K_m) von 2700 bzw. 41 700 M⁻¹ s⁻¹. Die Sonden zeigten eine ausgeprägte Selektivität für Cathepsin S gegenüber den Cathepsinen B, K, L und V, die alle eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Es wurde keine Spaltung mit den Cat-



Schema 1. Der hochspezifische Cathepsin-S-Inhibitor **1** wurde in ein nichtlipidiertes (**2**) und ein lipidiertes Substrat (**3**) für Cathepsin S umgewandelt (Reverse Design) und mit einem langwelliges Licht emittierenden Fluorophor sowie einem geeigneten Fluoreszenzlöscher ausgestattet. Die Spaltstelle der Sonde ist mit einem Pfeil markiert.

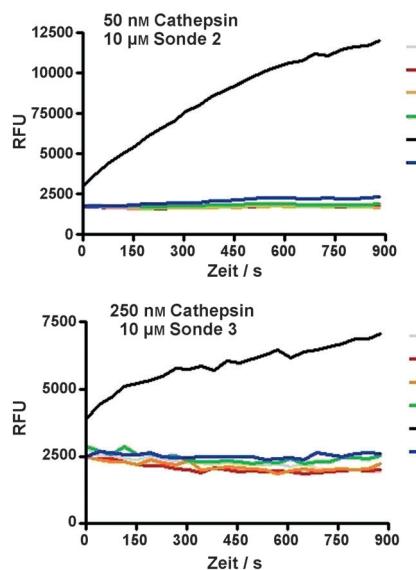


Abbildung 1. Spaltung des Cathepsin-S-Reporters in vitro. Änderung der Emissionsintensität $\lambda_{\text{em}} = 695 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 670 \text{ nm}$) von **2** (oben) und der lipidierten Sonde **3** (unten) nach Zugabe verschiedener Cathepsine. RFU = relative Fluoreszenzeinheiten.

hepsinen B, K, L und V detektiert, mit Ausnahme von Sonde **2**, die von Cathepsin V mit einem k_{cat}/K_m -Wert von ca. $500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, d.h. ca. 80-mal schwächer als von Cathepsin S, gespalten wurde (Abbildung 1). Das kinetische Profil zeigte keine signifikanten Auswirkungen der Lipidierung auf den K_m -Wert ($K_m \approx 2 \mu\text{M}$ für beide Sonden), allerdings eine ca. 15-fach reduzierte Umsatzrate, wahrscheinlich wegen der verminderten Wasserlöslichkeit durch die Anbringung der Fettsäure. Beide Sonden **2** und **3** wurden von Cathepsin S an der gleichen Stelle geschnitten, wie durch Massenspektrometrie nachgewiesen wurde (Abbildungen S1 und S2). Da für die Lipidierung anderer Sonden bereits eine Anreicherung in der Membran von weißen Blutzellen nachgewiesen worden war,^[10a] wurde **3** in der Gegenwart von Liposomen als Modellmembran getestet, um die Umsatzkinetiken zu bestimmen. Während für Sonde **2** keine Änderung eintrat, wurde ein leichtes, aber schnelles Entlöschen von **3** beobachtet, was auf einen Einbau in die Membran schließen lässt (Abbildung S3). Ferner erhöhte sich in der Gegenwart von Liposomen der k_{cat}/K_m -Wert der Hydrolyse von **3** ca. 7-fach auf einen Wert von $19500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, während für **2** keine signifikante Änderung gefunden wurde. Offensichtlich erleichtert der liposomale Einbau von **3** die Hydrolyse durch Cathepsin S. Ähnliche Befunde wurden in Gegenwart von Rinderserumalbumin gefunden, was auf eine Bindung der Sonde an Serumalbumine hindeutet.

Makrophagen sind als die Hauptquelle von Cathepsin S in der Tumorumgebung bekannt.^[7a] Wir untersuchten daher die Enzymaktivität in Makrophagen differenzierter THP-1-Zellen, da diese Zellen sowohl intra- als auch extrazelluläres Cathepsin S exprimieren. Dazu wurden die Zellen mit **2** oder **3** inkubiert, und die Reporterspaltung wurde mikroskopisch bestimmt. Beide Sonden wurden rasch gespalten und von den Zellen aufgenommen, wobei längere Inkubationszeiten für Sonde **3** benötigt wurden (Abbildung 2a). Vorbehandlung

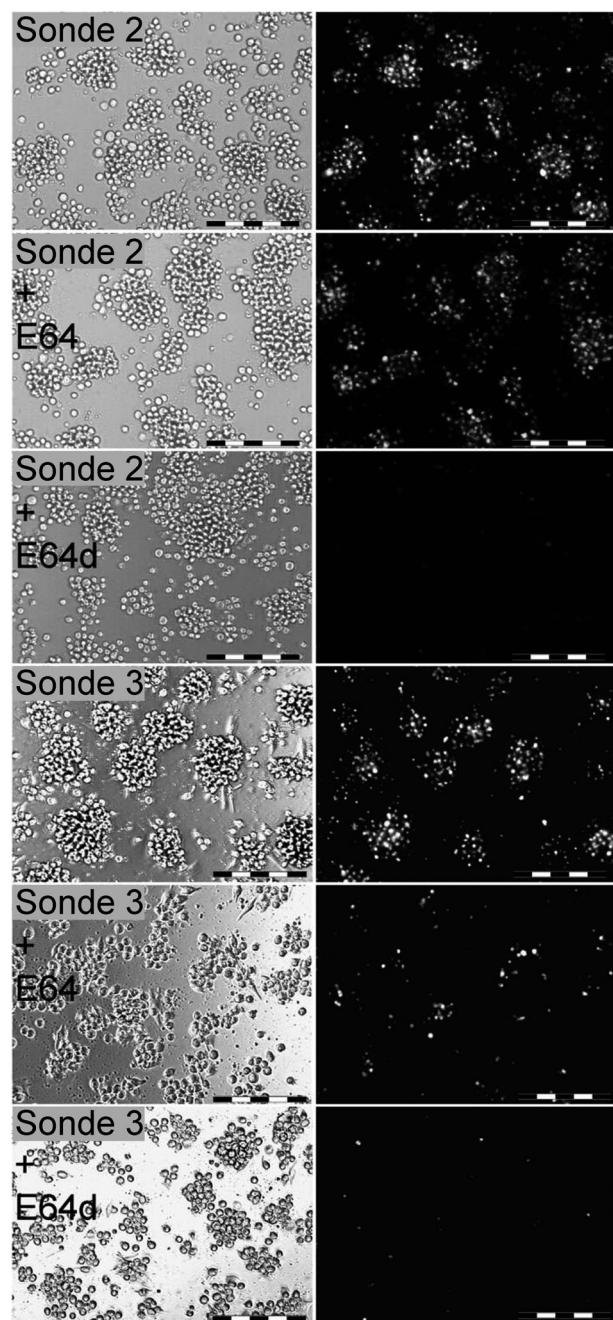


Abbildung 2. Durchlicht- (links) und NIR-Fluoreszenzbilder (rechts, $\lambda_{\text{ex}} = 635\text{--}675 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 696\text{--}736 \text{ nm}$) von PMA-differenzierten (PMA = Phorbol-ester) THP-1-Zellen, inkubiert mit Reporter **2** ($t = 1 \text{ h}$) oder der lipidierten Sonde **3** ($t = 4 \text{ h}$). Sonde **3** benötigte längere Inkubationszeiten, um Effekte wie Eigenlöschung der Fluoreszenz zu vermeiden. Zellen wurden 1 h mit dem zellimpermanenten Cathepsininhibitor E64 oder der zellpermeablen Form E64d inkubiert, bevor der Reporter zugegeben wurde. Maßstabsbalken = 200 μm .

der Zellen mit dem nicht membrangängigen Breitbandinhibitor E64 hatte kaum Einfluss auf die Hydrolyse von **2**. Dies lässt vermuten, dass die Sonde vorwiegend nach Internalisierung im Zellinneren gespalten wurde. Im Unterschied dazu schützte E64 die lipidierte Sonde gegen Hydrolyse, was nahelegt, dass diese auf der Zelloberfläche von extrazellulärem Cathepsin S gespalten wird, bevor das lipidierte Fragment mit

dem Fluorophor internalisiert wird. Die zellgängige Form des Inhibitors, E64d, blockierte dagegen die Hydrolyse beider Sonden und weist damit auf eine spezifische Spaltung der Sonde durch Cathepsine gegenüber der durch andere Proteasen hin (Abbildung 2b). Außerdem verhinderte die Blockierung der Endozytose durch 30 min Abkühlen auf 4°C die Hydrolyse von **2**, während das Signal für **3** nun ausschließlich auf der Zellmembran beobachtet wurde (Abbildung S4).

Als nächstes untersuchten wir, ob das Homing der lipidierten Sonde **3** ausreichte, um eine Akkumulation in einem In-vivo-Tumormodell zu ermöglichen und ob der Unterschied in der Sondenverteilung die Dauer des Signals beeinflusste. Daher verabreichten wir die Sonden **2** und **3** in vivo in einem Maus-Xenograft-Modell (4T1-Zellen, Umsatz der Sonden in einzelnen Zellen siehe Abbildung S5a,b). Ganzkörperfluoreszenzbilder wurden mit einem Fluoreszenzbildgebungssystem (Cri Maestro 500, Wolburn) nach intravenöser Gabe der Sonden **3** oder **2** erhalten. Bereits nach 30 min wurde für

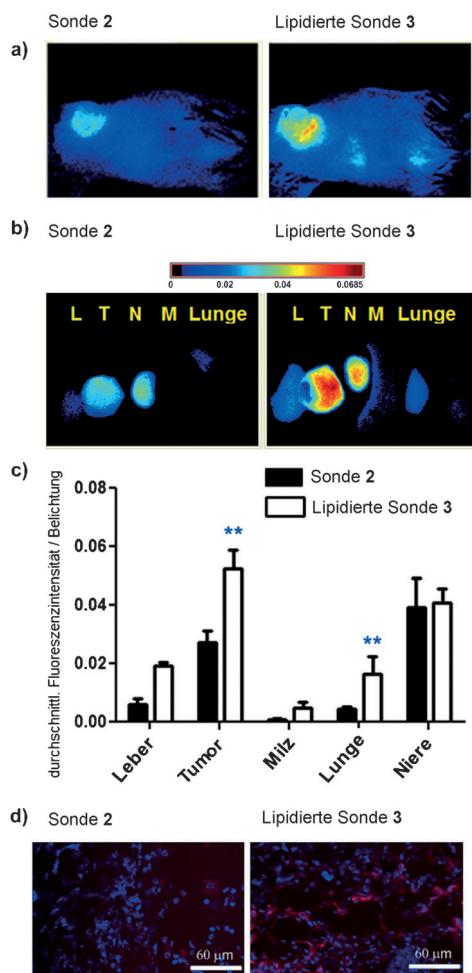


Abbildung 3. a) Optische Bilder einer 4T1-Tumormaus 24 h nach i.v.-Injektion von **2** (links) und **3** (rechts); $n=5$. b,c) Verteilung von **2** und **3** in Organen fünf Tage nach Injektion; L=Lunge, M=Milz, N=Niere, T=Tumor. d) Cy5.5-Fluoreszenzbilder von tiefgefrorenen Tumorschnitten von Mäusen, die mit **2** (links) oder **3** (rechts) injiziert wurden; 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; blau) wurde ins Medium gegeben ($\lambda_{\text{ex}}=405/680 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=425/700 \text{ nm}$, Maßstabsbalken=60 μm).
** $p < 0.003$.

beide Sonden ein deutliches Signal im Tumor detektiert. Das Cy5.5-Signal im Tumor erhöhte sich signifikant über die nächsten 6 h, was die Spaltung der Sonde widerspiegelt. Alle Tiere zeigten ein deutliches und stabiles Fluoreszenzsignal 24 h nach der Injektion (Abbildung 3a) und nachfolgend einen Abfall (Abbildungen S6–S8). Die mit Cystein umgesetzte Sonde **2b** verhielt sich identisch zu Sonde **2** (Abbildung S6). Die lipidierte Sonde **3** zeigte zu allen Zeitpunkten eine erhöhte tumorspezifische Fluoreszenz, was zu einem substanzIELL verbesserten Kontrast gegenüber dem der nichtlipidierten Sonde **2** führte. Das Verhältnis von Tumor zu gesundem Gewebe war fünf Tage nach der Injektion von Sonde **3** am stärksten ausgeprägt, mit Cy5.5-Intensitäten, die ca. 6-mal höher als die der umgebenden Haut in vivo und bis zu 18-mal höher als ex vivo im Muskelgewebe waren (Tabelle S2). Ferner zeigte die lipidierte Sonde **3** ein ca. zweifach höheres Signal nach 24 h (Abbildung 3a) und ermöglichte eine effektive Tumorentifikation auch nach fünf und acht Tagen, wenn das Signal von Sonde **2** bereits nahe der Detektionsgrenze war (Abbildungen S7 und S8). Diese signifikanten Unterschiede zeigen den Vorteil der lipidierten Sonde **3** für die Tumordetektion in vivo auf. Da sich der transplantierte Tumor dicht unter der Haut befindet, kann die Akkumulation der Fluoreszenz in Organen wegen der schwachen Penetration des Signals durch tieferes Gewebe nur unzureichend gemessen werden. Daher wurde eine Ex-vivo-Analyse der isolierten Tumoren und Organe nach fünf Tagen vorgenommen und der Verbleib der geschnittenen Sonde untersucht. Wie in Abbildung 3b gezeigt, wurde die nichtlipidierte Sonde **2** vorwiegend im Tumor und in geringerem Maße in den Nieren nachgewiesen, aber kaum in anderen Organen. Die lipidierte Sonde **3** hingegen wurde im Tumor und bis zu einem gewissen Grad in der Niere detektiert (Abbildung 3b,c), ohne nachweisbare Spiegel in anderen Organen. Um zu bestätigen, dass sich die geschnittenen Sonden im Zellinneren anreicherten, wurden die Tumoren entnommen, fixiert, gefroren und geschnitten. Die Tumorschnitte wurden mit NIR-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Das Signal der lipidierten Sonde **3** war wesentlich stärker als das der nichtlipidierten und bestätigte die Befunde der In-vivo-Bildgebung (Abbildung 3d).

Hier beschreiben wir die Synthese und Evaluierung zweier Cathepsin-Spezifischer Sonden, die auf dem Konzept des Reverse Design basieren. Um eine langfristige Anreicherung der Sonde am Zielort zu erreichen, haben wir eine Lipidierung durch Einführen eines Palmitinsäurerestes in das Reportermolekül genutzt. Wir erwarteten, dass die Lipidierung die Sonde vorwiegend auf der Zelloberfläche und als Ligand für Serumalbumine lokalisieren würde. Die erfolgreiche Anwendung in Mäusen durch Injektion in die Schwanzvene war eine Überraschung, da wir damit rechneten, vorwiegend das Endothel nahe der Injektionsstelle zu färben, was jedoch nicht beobachtet wurde. Wir vermuten, dass die Albumine eine spontane Anheftung an Zelloberflächen verhindern und die lipidierten Sonden für längere Zeit im Blutkreislauf halten. Dies mag auch erklären, warum das erfolgreiche Homing des fluoreszierenden Fragments tage lang anhielt. Nach Cathepsin-Spezifischer Spaltung stieg die Fluoreszenz infolge von Entlöschen an, und wir beobachteten eine intrazelluläre Akkumulation der Fluoreszenz im Ziel-

gewebe. Es scheint, dass nur ein kleiner Teil des fluoreszierenden Fragments die Tumormasse verlassen kann und partiell die Leber (Sonde **3**) oder die Nieren (Sonde **2**) färbt. Gegenüber der nichtlipidierten Sonde **2** erzeugt die lipidierte Sonde **3** eine deutlich verlängerte, starke Fluoreszenz im Tumor (Abbildung S7). Diese Tatsache belegt, dass die nichtinvasive Tumordiagnostik mit **3** in Zukunft möglich sein könnte. Dasselbe Prinzip der Lipidierung könnte auch für die Verabreichung von Tumor-spezifischen cytotoxischen Verbindungen eingesetzt werden, um Tumormasse zu reduzieren.

Eingegangen am 18. Dezember 2013,
veränderte Fassung am 24. Februar 2014
Online veröffentlicht am 30. Mai 2014

Stichwörter: FRET · Fluoreszenzsonden · Homing · Lipidierung · Tumordiagnose

-
- [1] A. C. O'Farrell, S. D. Shnyder, G. Marston, P. L. Coletta, J. H. Gill, *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 719–735.
 - [2] G. Drummen, *Molecules* **2012**, *17*, 14067–14090.
 - [3] D. M. Chudakov, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 605–613.
 - [4] M. M. Mohamed, B. F. Sloane, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 764–775.
 - [5] a) Q. T. Nguyen, E. S. Olson, T. A. Aguilera, T. Jiang, M. Sadding, L. G. Ellies, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4317–4322; b) L. E. Edgington, M. Verdoes, M. Bogyo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 798–805; c) M. Verdoes, K. O. Bender, E. Segal, W. A. van der Linden, S. Syed, N. P. Withana, L. E. Sanman, M. Bogyo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14726–14730.
 - [6] a) F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömmel, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459–4488; b) J. Reiser, B. Adair, T. Reinheckel, *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 3421–3431; c) O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, B. Turk, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 387–403; d) V. Gocheva, J. A. Joyce, *Cell Cycle* **2007**, *6*, 60–64; e) G. Mikhaylov, U. Mikac, A. A. Magaeva, V. I. Itin, E. P. Naiden, I. Psakhye, L. Babes, T. Reinheckel, C. Peters, R. Zeiser, M. Bogyo, V. Turk, S. G. Psakhye, B. Turk, O. Vasiljeva, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 594–602.
 - [7] a) V. Gocheva, H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman, J. A. Joyce, *Genes Dev.* **2010**, *24*, 241–255; b) V. Gocheva, W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan, J. Joyce, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 543–556.
 - [8] H. F. Kwok, R. Buick, D. Kuehn, J. Görmley, D. Doherty, T. Jaquin, A. McClurg, C. Ward, T. Byrne, J. Jaworski, K. L. Leung, P. Snoddy, C. McAnally, R. Burden, B. Gray, J. Lowry, I. Sermadiras, N. Gruszka, N. Courtenay-Luck, A. Kissenpfennig, C. Scott, J. Johnston, S. Olwill, *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 147.
 - [9] a) A. Watzke, G. Kosec, M. Kindermann, V. Jeske, H.-P. Nestler, V. Turk, B. Turk, K. U. Wendt, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 412–415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 406–409; b) D. Caglić, A. Globisch, M. Kindermann, N.-H. Lim, V. Jeske, H.-P. Juretschke, E. Bartnik, K. U. Weithmann, H. Nagase, B. Turk, K. U. Wendt, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1055–1061.
 - [10] a) A. Cobos-Correa, J. B. Trojanek, S. Diemer, M. A. Mall, C. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 628–630; b) S. Gehrig, M. A. Mall, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6363–6366; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6258–6261.
 - [11] T. Jiang, E. S. Olson, Q. T. Nguyen, M. Roy, P. A. Jennings, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17867–17872.
 - [12] M. Verdoes, L. E. Edgington, F. A. Scheeren, M. Leyva, G. Blum, K. Weiskopf, M. H. Bachmann, J. A. Ellman, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 619–628.