

Proteasesonden, die Spaltung durch Excimeremission anzeigen**

Melanie Fischbach, Ute Resch-Genger und Oliver Seitz*

Abstract: Peptidbasierte Sonden, die nach einer proteolytischen Spaltung fluoreszieren, sind unschätzbare Hilfsmittel für Untersuchungen von Proteaseaktivitäten. Eine Signalerzeugung durch Pyrenexcimere ist vorteilhaft, da die große Stokes-Verschiebung und die lange Lebensdauer der Excimeremission Messungen in autofluoreszierenden Medien wie Blutserum erleichtern. Die proteolytische Spaltung stört jedoch die Proximitätsbeziehungen, die für eine excimerbasierte Signalgebung notwendig sind. Wir stellen eine neue Sondenarchitektur vor, bei der die Pyrenexcimeremission durch Spaltung eingeschaltet wird. Die Methode beruht auf haarnadelartigen Peptidnukleinsäure (PNA)-Peptid-Hybriden. Im PNA-Stamm werden Pyreneinheiten und Anthrachinonlöscher reißverschlussartig positioniert. Die Excimer Hairpin Peptide Beacons erbringen eine bis zu 50-fache Verstärkung der Pyrenexcimeremission. Zeitaufgelöste Messungen ermöglichen die Detektion der Matrixmetalloprotease 7 im humanen Blutserum.

Stimuli-responsive Fluoreszenzsonden ermöglichen es, Biomoleküle in komplexer natürlicher Umgebung zu detektieren.^[1] Typischerweise beruht das Design solcher Sonden entweder auf 1) der Verwendung von umgebungsempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen oder auf 2) der Störung von Energie- oder Elektronenübertragungsprozessen durch eine Änderung der Abstände zwischen zwei oder mehreren wechselwirkenden Farbstoffen.^[2] In beiden Ansätzen wurde Pyren häufig verwendet.^[3] Besonders nützlich ist die abstandsabhängige Bildung von Excimeren. Typischerweise werden hierbei biomolekulare Wechselwirkungen mit dem Zielmolekül genutzt, um zwei Pyreneinheiten, die für die Bildung von Dimeren im angeregten Zustand (= Excimer) nötig sind, in enge Nachbarschaft zu bringen. Die große Stokes-Verschiebung (ca. 140 nm) und die lange Fluoreszenzlebensdauer (40–60 ns) der Pyrenexcimeremission erleichtern Messungen bei hohem Signalhintergrund durch Autofluoreszenz von biologischen Spezies. Dieser Vorteil wurde bereits für die Detektion/Visualisierung von Nukleinsäuren^[3c,4] und in der Membranbiophysik/-bildung^[5] er-

kannt. Hingegen wurde die Signalerzeugung durch Pyrenexcimere selten genutzt, um Proteine zu detektieren/visualisieren.^[3b,6] Ein Großteil der in den Proteinwissenschaften eingesetzten Fluoreszenzsonden ist für den Nachweis von Proteasen ausgelegt, die zu den häufigsten Wirkstofftargets zählen.^[7] Proteasen katalysieren die Spaltung einer Peptidbindung und heben dadurch Proximitätsbeziehungen auf. Dies steht im Widerspruch zur Ermöglichung von Proximität, die für die Bildung von Pyrenexcimeren erforderlich ist. Das erklärt möglicherweise, warum dieser Mechanismus der Signalgebung bisher nicht beim Design von Proteasereportern berücksichtigt wurde.

Wir stellen hier einen konzeptionell neuen und auf den ersten Blick der Intuition widersprechenden Ansatz vor, der es ermöglicht, die Pyrenexcimeremission durch proteasekatalysierte Spaltung eines Peptidsubstrats anzuschalten (Abbildung 1). Die Proteasesonden mit excimerbasierter Signalgebung beruhen auf dem Konstruktionsprinzip der Hairpin Peptide Beacons.^[8] Ein Peptidsegment, das als Proteasesubstrat fungiert, wird mit selbstkomplementären PNA-Armen ausgestattet. Der sich bildende PNA-Duplex führt zu einer haarnadelartigen Anordnung, in der kontrolliert eingebaute Reporter in eine enge Proximität gezwungen werden (Abbildung 1a). Inspiriert durch DNA-basierte Hybridisierungs-sonden führten wir zwei Pyreneinheiten in den helikalen Basenstapel des N-terminalen PNA-Arms ein.^[9] Wir vermuteten, dass eine Anthrachinoneinheit an einer geeigneten Position im C-terminalen Arm die Pyrenemission löschen und die excitonische Wechselwirkung unterbinden würde.^[10] Die proteolytische Spaltung innerhalb des Peptidsegments sollte den entropischen Vorteil der intramolekularen Hybridisierung aufheben und dadurch eine Dissoziation des PNA-PNA-Duplexstamms induzieren. Die damit einhergehende Entfernung des Anthrachinondisruptors sollte die Bildung eines Pyrenexcimers ermöglichen, sodass die Peptidspaltung mithilfe eines charakteristischen Emissionssignals angezeigt werden kann.

Die Pyren- und Anthrachinoneinheiten wurden in Form von Basensurrogaten eingeführt (Abbildung 1a).^[10,11] Wir gingen davon aus, dass dies eine koaxiale Stapelwechselwirkung erleichtert, was zum einen die Haarnadelbildung und zum anderen die Stoßlöschung der Pyrenemission unterstützen sollte. Im Rahmen dieser Studie entwickelten wir eine Sonde zur Detektion der Aktivität der extrazellulären Matrixmetalloprotease 7 (MMP-7).^[12] MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen und wichtige Biomarker für Entzündungen und Tumprogression.^[13] Erhöhte Spiegel von MMP-7 wurden unter anderem bei Dickdarmkrebs und Drüsengeschwülsten sowie in Mastdarm- und Leberzellkarzinomen und diversen Gliomen festgestellt. Unsere Sonden enthalten das Peptid RPLALWRS, ein bekanntes Substrat für MMP-7 (Abbildung 1b).^[14] In einer Festphasensynthese wurde das

[*] M. Fischbach, Prof. Dr. O. Seitz
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

Dr. U. Resch-Genger
Bundesamt für Materialforschung und -prüfung
Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. Daniel Geißler, Bundesamt für Materialforschung und -prüfung, für die Unterstützung bei den zeitaufgelösten Messungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406909> zu finden.

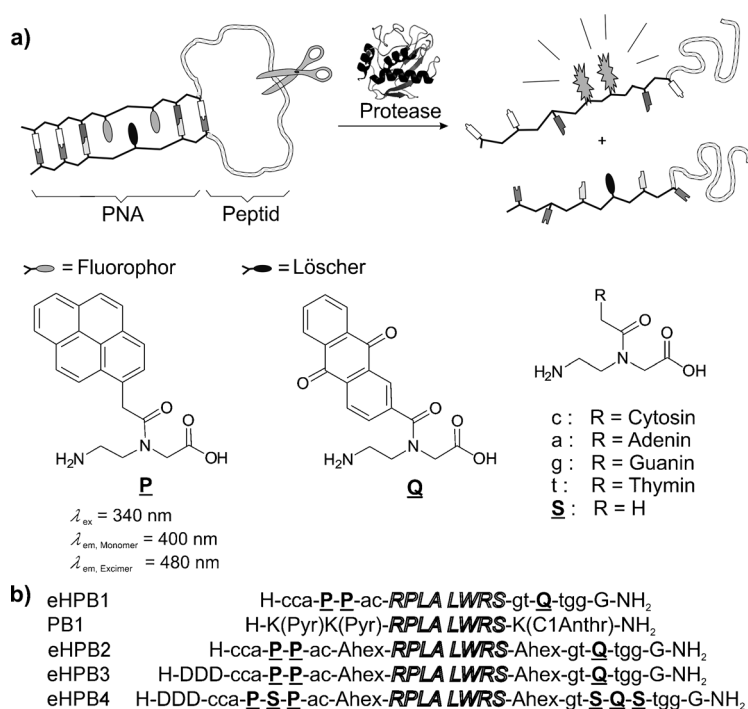


Abbildung 1. a) Spaltung des Excimer Hairpin Peptide Beacon (eHPB) durch das Zielprotein = MMP-7 (PDB: 1MMQ) und Strukturen der PNA-Monomere. b) In dieser Untersuchung verwendete Sequenzen; Kleinbuchstaben = PNA-Monomer; Großbuchstaben = Aminosäuren; **P**, **Q**, **S** = modifizierte PNA-Monomere; Ahex = Aminohexansäure.

Peptid mit PNA-Armen ausgestattet. Für die Basenpaarung enthielt jeder PNA-Arm fünf Nukleobasen. Die Pyren- und Anthrachinoneinheiten wurden mithilfe Aminoethylglycin-basierter PNA-Submonomere und anschließender Kupplung der Chromophore an einer festen Phase eingeführt.

Wir untersuchten, ob die sequenzinternen Pyren- und Anthrachinoneinheiten in der Sonde eHPB1 die PNA-PNA-Wechselwirkungen unterstützen. Fluorimetrisch detektierte Schmelzexperimente bei verschiedenen Konzentrationen zeigten einen sigmoidalen Kurvenverlauf ($T_M = 44^\circ\text{C}$), der auf eine intramolekulare PNA-PNA-Hybridisierung schließen lässt (Abbildung S9a, S: Hintergrundinformationen). Als nächstes ermittelten wir die Emissionsspektren von eHPB1 bei 25°C (Abbildung 2a). Monomer- und Excimeremission waren im geschlossenen Zustand der Sonde gering. Nach Inkubation mit MMP-7 wurde ein 48-facher Anstieg der Excimeremission bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym die haarnadelartige Struktur öffnen konnte. HPLC-Analysen der Sonde vor und nach Inkubation mit MMP-7 bestätigten die quantitative Spaltung der Ala-Leu-Peptidbindung (Abbildung 2b, Abbildung S11). Schmelzexperimente mit den Spaltprodukten belegten die geringe Effektivität der intermolekularen Hybridisierung nach der Spaltung (Abbildung S12). Kinetische Messungen zeigten die zeitabhängige Zunahme des Excimersignals, welche bei Abwesenheit von MMP-7 nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 2c). Zum Vergleich wurde das Peptid PB1 untersucht. Diese Sonde enthielt ebenfalls zwei Pyreneinheiten und einen anthrachinonbasierten Löscher,

jedoch keine für die Haarnadelbildung notwendigen C- und N-terminalen PNA-Arme. In diesem Fall blieb die Emissionsintensität bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ unverändert, was die Bedeutung des Haarnadeldesigns unterstreicht (Abbildung 2a,c).

Kinetische Messungen zeigten, dass eHPB1 mit einer praktisch verwendbaren Geschwindigkeit gespalten wurde. Dennoch wären schnellere Reaktionen wünschenswert. Um die Flexibilität des Peptidteils zu erhöhen und somit den Zugang für MMP-7 zu verbessern, wurde in eHPB2 ein Aminohexansäure(Ahex)-Linker zwischen den Peptid- und PNA-Segmenten eingefügt. Tatsächlich wurde eHPB2 rascher gespalten ($t_{1/2} = 61 \text{ min}$; Tabelle 1 und Abbildung 3a), jedoch auf Kosten der Fluoreszenzverstärkung ($F/F_0(\text{eHPB2}) = 18$ gegenüber $F/F_0(\text{eHPB1}) = 48$).

Konzentrationsabhängige Schmelzexperimente ließen vermuten, dass eHPB2 keine Haarnadelstruktur annimmt (Abbildung S9b). Zur Erhöhung der Löslichkeit wurden in eHPB3 drei Aspartatreste eingeführt. Bemerkenswerterweise reduzierte dies die Zeit für halbmaximale Spaltung auf 32 min. Des Weiteren fanden wir heraus, dass die drei Aspartatreste überraschenderweise die Haarnadel stabilisieren ($T_M = 50^\circ\text{C}$). Die Ursache für diesen Effekt ist gegenwärtig unklar. Ungeachtet dessen ermöglichte die erhöhte Stabilität des PNA-Stamms offensichtlich eine bessere Störung oder Unterdrückung der Excimeremission

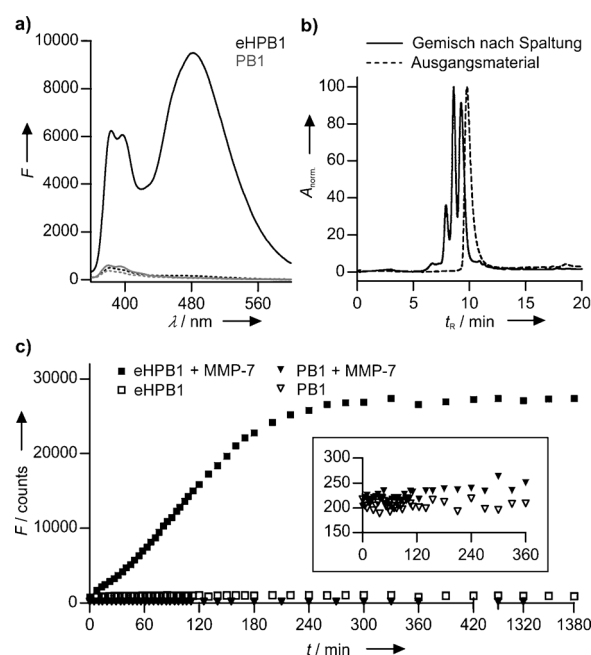


Abbildung 2. a) Emissionsspektren von eHPB1 und PB1 bei 25°C mit (—) und ohne (---) MMP-7. b) HPLC-Diagramme von eHPB1, detektiert bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. c) Zeitverlauf der Emission von eHPB1 und PB1 bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ bei 37°C mit und ohne MMP-7. Einschub: vergrößerte Ansicht. Bedingungen: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4; 1 μM Sonde, 25 nM MMP-7, $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$. HEPES = 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure, CHAPS = 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat.

Tabelle 1: Eigenschaften der hier verwendeten Excimer Hairpin Peptide Beacons.

Sonde	$T_m^{[a]}$	$F_0^{[b]}$	$t_{1/2}^{[c]}$	$F/F_0^{[d]}$
eHPB1	44	408	103	48
eHPB2	/ ^[e]	1477	61	18
eHPB3	50	328	32	29
eHPB4	51	252	24	49

[a] Schmelztemperaturen der intramolekularen Hybridisierung in °C.

[b] Hintergrundsignal (relative Fluoreszenzintensität) der Sonde bei $\lambda = 480$ nm, 25 °C. [c] Zeit für die halbmaximale Spaltung in min.

[d] Quotient der relativen Fluoreszenzintensitäten bei $\lambda = 480$ nm nach (F) und vor (F_0) Sondenspaltung als Maß für die spaltungsinduzierte Fluoreszenzverstärkung bei 25 °C. [e] Diese Sonde weist keine eindeutige Schmelzkurven auf (Abbildung S9b). Bedingungen: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4, 1 μM Sonde, 25 nM MMP-7, $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm.

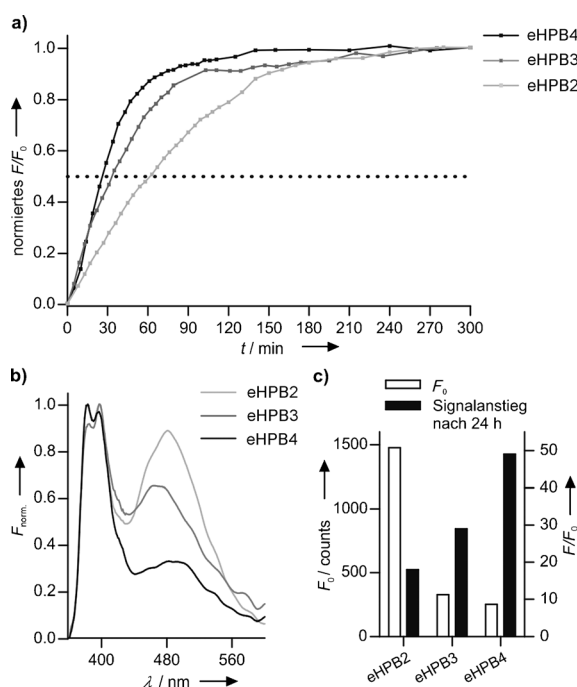


Abbildung 3. a) Zeitverlauf der Emission bei $\lambda = 480$ nm von eHPB2-4, die bei 37 °C mit MMP-7 inkubiert wurden. b) Fluoreszenzspektren von eHPB2-4, normiert bezogen auf die maximale Monomeremission bei $\lambda = 380$ oder 400 nm. c) Verbesserung der eHPBs. Bedingungen: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4; 1 μM Sonde, 25 nM MMP-7, 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm.

in Abwesenheit von MMP-7 ($F_0(\text{eHPB3}) = 328$ gegenüber $F_0(\text{eHPB1}) = 408$). Wir folgerten, dass eine weitere Verbesserung der Fluoreszenzlöschung im geschlossenen Zustand und somit des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses realisierbar sein sollte, wenn es gelänge, den Pyren-Anthrachinon-Kontakt in der Haarnadel zu fördern. In eHPB4 wurden die Pyren- und Anthrachinonchromophore daher mit einem abasischem PNA-Monomer (S) gepaart. Wir nahmen an, dass dies eine extrahelikale Anordnung des Anthrachinons erschwert. Die Effizienz, mit der die Excimerbildung unterdrückt wird, folgt aus dem Verhältnis von Monomer- zu Ex-

cimeremission. Dieses Verhältnis steigt von 1.1 in eHPB2 auf 2.8 in eHPB4 (Abbildung 3b). Tatsächlich weist eHPB4 das niedrigste Hintergrundsignal auf (Abbildung 3c). Dennoch führte die Inkubation mit MMP-7 zur raschen Bildung des Excimersignals, das um das 49fache des Ausgangswertes anstieg. Die halbmaximale Spaltung der Sonde durch MMP-7 war bereits nach 24 min erreicht (Abbildung 3, Tabelle 1).

Als nächstes untersuchten wir die Excimer Hairpin Peptide Beacons in biologischen Medien hoher Autofluoreszenz. Die Inkubation von eHPB4 mit MMP-7 in einem Puffer ging mit einem 49-fachen Anstieg der statisch gemessenen Excimeremission einher. Das mit 10 % fötalen Kälberserum und 1 % Antibiotika komplettierte Dulbecco's Zellwachstumsmedium (DMEM*) zeigte eine starke Autofluoreszenz zwischen $\lambda = 360$ und 500 nm (Abbildung 4a). Der erhöhte Hintergrund bei der Wellenlänge ($\lambda = 480$ nm) der Excimeremission bewirkte eine Verminderung der durch MMP-7 erzielbaren Signalverstärkung von 49-fach im HEPES-Puffer auf 5-fach in DMEM*. Diese Experimente wurden wiederholt, jedoch wurde dieses Mal die Spaltung von eHPB4 mithilfe zeitaufgelöster Fluorometrie verfolgt (Abbildung 4b,c). Die Fluoreszenzsignale des HEPES-Puffers und des Zellmediums klangen schnell innerhalb ≤ 6 ns ab. Nach dieser Zeit lieferte intaktes eHPB4 immer noch detektierbare Fluoreszenzsignale. Entscheidend war jedoch, dass die Fluoreszenz deutlich langsamer abklang, wenn die Sonde eHPB4 mit MMP-7 inkubiert wurde (Abbildung 4d). Die Integration der Fluoreszenzabklingkurven im Zeitintervall von 50–250 ns zeigte, dass eHPB4 die Proteolyse in Zellmedium mit einem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis = 17 signalisiert (Abbildung 4d). Im Vergleich dazu konnte mithilfe statischer Fluoreszenzspektroskopie nur ein 5-facher Signalanstieg erhalten werden (Abbildung 4a).

Wir testeten das Potenzial von eHPB4 für den Nachweis von MMP-7 direkt im Blutserum (Abbildung 5). Eine Konzentration von 1 nM MMP-7 wird als ein kritischer Grenzwert betrachtet, der auf einen metastasierenden Dickdarmkrebs hindeutet.^[15] Humanserum wurde mit 1 nM MMP-7 versetzt und mit 1 μM eHPB4 24 h bei 37 °C inkubiert. Zur Unterdrückung einer unselektiven Spaltung wurde der Proteaseinhibitor Pefabloc SC zugefügt. Detektion mithilfe zeitaufgelöster Fluorimetrie zeigte, dass MMP-7 einen 4-fachen Anstieg der integralen Emissionsintensität (50–200 ns) bewirkt. Dies lässt vermuten, dass Proteasesonden nach dem Prinzip der Excimer Hairpin Peptide Beacons (z. B. eHPB4) in der Lage sind, Proteaseaktivitäten in optisch dichten Matrices wie Blutserum anzuzeigen.

Durch eine neuartige Strategie für das Design von Proteasesonden ist es uns gelungen, die proteolytische Spaltung anhand der Bildung eines langlebigen Excimersignals nachzuweisen. Voraussetzung hierfür war, dass ein Anthrachinonchromophor in den Excimer Hairpin Peptide Beacons (eHPBs) so positioniert werden konnte, dass excitonische Wechselwirkungen zwischen beiden benachbart angeordneten Pyrenchromophoren unterbunden werden konnten. Die Spaltung durch das Protease-Target löst die Haarnadelstruktur auf, entfernt den Anthrachinonfluoreszenzlöcher von den Pyrengruppen und ermöglicht so einen etwa 50-fachen Anstieg der Excimeremission. Interessant ist hier die lange

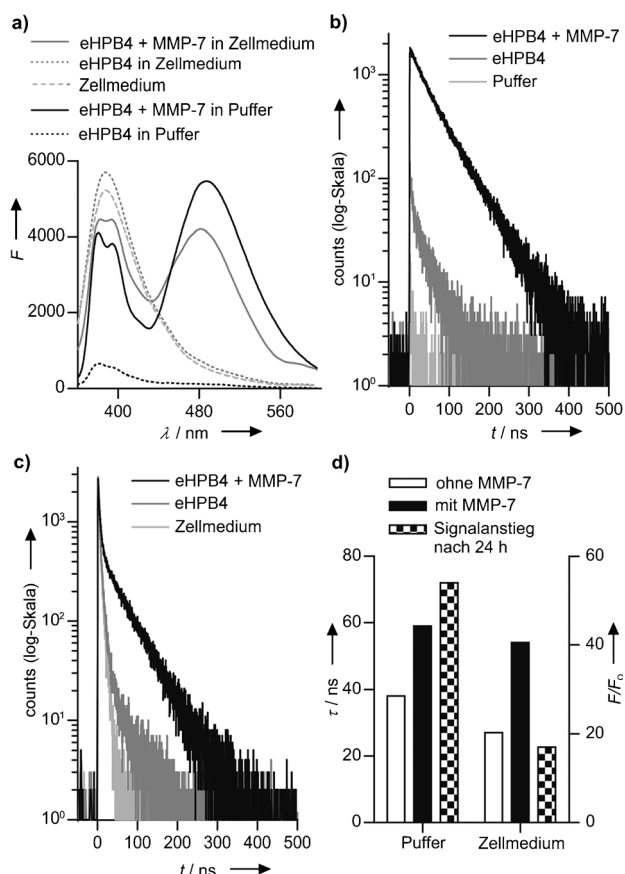


Abbildung 4. a) Statistische Messungen der Fluoreszenzspektren von eHPB4 in Puffer und Zellmedium mit Anregung bei $\lambda = 340$ nm. Emissionsabklingkurven von eHPB4 bei $\lambda = 480$ nm in b) Puffer und c) im Zellmedium mit Anregung bei $\lambda = 280$ nm. d) Lebensdauer von eHPB4 und Signalanstiege unter Berücksichtigung des Zeitintervalls 50–250 ns in Puffer und Zellmedium. Bedingungen: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4; 1 μM Sonde, 25 nM MMP-7, Zellmedium = DMEM*, Dulbecco's Zellwachstumsmedium mit 10 % fötalen Kälberserum und 1 % Streptomycin/Penicillin.

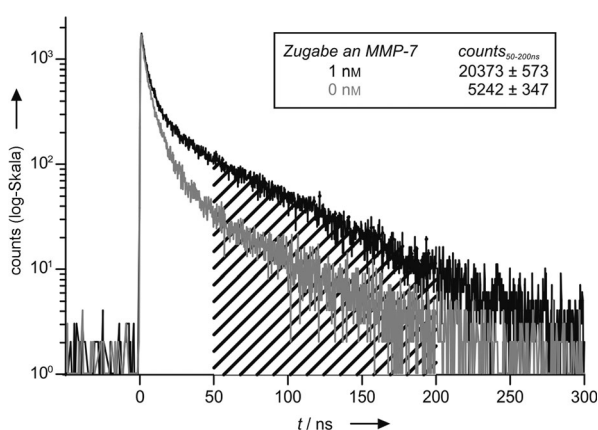


Abbildung 5. Emissionsabklingkurven von eHPB4 in Humanserum bei $\lambda = 480$ nm mit (schwarz) und ohne (grau) 1 nM MMP-7; Einschub: Mittelwerte der Integrale von drei Messungen mit Standardabweichung. Bedingungen: Zugabe von 10 mM Pefabloc SC, 1:10 verdünnt mit 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4; 1 μM Sonde, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm.

Lebensdauer der Pyrenexcimeremission, die trotz der kurzwelligen Anregung die Detektion des Biomarkers Matrixmetalloprotease 7 (MMP-7) bei physiologisch relevanten Konzentrationen in einer optisch dichten, autofluoreszierenden Matrix (Blutserum) ermöglicht. Dieses Sondendesign kann durch die Anpassung der Peptidsequenz innerhalb der Schleifenregion des eHPB auf andere Zielproteine übertragen werden. Zudem sollten die eHPBs nicht auf Pyrenfarbstoffe beschränkt sein, sondern auch auf andere interkalierende Farbstoffe anwendbar sein. In diesem Zusammenhang sowie unter Einbeziehung der Möglichkeiten, die durch Assays eröffnet werden, die ohne Waschschritte in biologischer Umgebung durchgeführt werden können, erwarten wir, dass die Excimer Hairpin Peptide Beacons sich in der Proteinforschung als nützliche fluorogene Hilfsmittel erweisen werden.

Eingegangen am 5. Juli 2014

Online veröffentlicht am 12. September 2014

Stichwörter: Excimere · Fluoreszenzsonden · Peptidnukleinsäuren · Proteasen · Zeitverzögerte Fluoreszenz

- [1] a) J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 906–918; b) L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142–155; c) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2620–2640.
- [2] a) A. P. Demchenko, *Anal. Biochem.* **2005**, 343, 1–22; b) S. M. Borisov, O. S. Wolfbeis, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 423–461; c) K. Rurack, U. Resch-Genger, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 116–127.
- [3] a) Z. Xu, N. J. Singh, J. Lim, J. Pan, H. N. Kim, S. Park, K. S. Kim, J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15528–15533; b) C. J. Yang, S. Jockusch, M. Vicens, N. J. Turro, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 17278–17283; c) J. Huang, Y. Wu, Y. Chen, Z. Zhu, X. Yang, C. J. Yang, K. Wang, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 401–404; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 421–424.
- [4] a) A. A. Martí, X. Li, S. Jockusch, Z. Li, B. Raveendra, S. Kalachikov, J. J. Russo, I. Morozova, S. V. Puthanveetil, J. Ju, N. J. Turro, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 3161–3168; b) K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2005**, 2509–2511; c) M. Masuko, H. Ohtani, K. Ebata, A. Shimadzu, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5409–5416; d) P. L. Paris, J. M. Langenhan, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3789–3793; e) P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Martí, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 336–342.
- [5] a) P. Somerharju, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 116, 57–74; b) H.-J. Galla, E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1974**, 339, 103–115.
- [6] a) G. Bains, A. B. Patel, V. Narayanaswami, *Molecules* **2011**, 16, 7909–7935; b) S. S. Lehrer, *Methods Enzymol.* **1997**, 278, 286–295; c) K. Yamana, Y. Ohtani, H. Nakano, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3429–3431.
- [7] a) B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 785–799; b) M. Funovics, R. Weissleder, C.-H. Tung, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 956–963; c) J. Neefjes, N. P. Dantuma, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 58–69.
- [8] a) S. Thurlay, L. Röglin, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12693–12695; b) K. J. Oh, K. J. Cash, A. A. Lubina, K. W. Plaxco, *Chem. Commun.* **2007**, 4869–4871.

- [9] a) Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X. G. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5502–5506; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5634–5638; b) H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044–7047; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7178–7181; c) R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227–1230; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1249–1252.
- [10] B. Armitage, D. Ly, T. Koch, H. Frydenlund, H. Orum, G. B. Schuster, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9417–9425.
- [11] K. F. MacKinnon, D. F. Qualley, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8074–8077.
- [12] a) N. Borkakoti, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1998**, *70*, 73–94; b) M. D. Sternlicht, Z. Werb, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, *17*, 463–516; c) T. Klein, R. Bischoff, *Amino Acids* **2011**, *41*, 271–290.
- [13] a) L. E. Littlepage, M. D. Sternlicht, N. Rougier, J. Phillips, E. Gallo, Y. Yu, K. Williams, A. Brenot, J. I. Gordon, Z. Werb, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2224–2234; b) M. Egeblad, Z. Werb, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 161–174; c) T. A. Giambernardi, G. M. Grant, G. P. Taylor, R. J. Hay, V. M. Maher, J. J. McCormick, R. J. Klebe, *Matrix Biol.* **1998**, *16*, 483–496; d) M. Pacheco, M. Mourao, E. Mantovani, I. Nishimoto, M. Mitzi Brentani, *Clin. Exp. Metastasis* **1998**, *16*, 577–585; e) E. L. Rosenthal, L. M. Matrisian, *Head Neck* **2006**, *28*, 639–648; f) T. Rath, M. Roderfeld, J. r. Graf, S. Wagner, A.-K. Vehr, C. Dietrich, A. Geier, E. Roeb, *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12*, 1025–1035; g) T. Masaki, H. Matsuoka, M. Sugiyama, N. Abe, A. Goto, A. Sakamoto, Y. Atomi, *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 1317–1321; h) E. Roeb, M. Arndt, B. Jansen, V. Schumpelick, S. Matern, *Int. J. Colorectal Dis.* **2004**, *19*, 518–524.
- [14] a) J. O. McIntyre, B. Fingleton, K. S. Wells, D. W. Piston, C. C. Lynch, S. Gautam, L. M. Matrisian, *Biochem. J.* **2004**, *377*, 617–628; b) A. R. Welch, C. M. Holman, M. F. Browner, M. R. Gehring, C.-C. Kan, H. E. Van Wart, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *324*, 59–64; c) Y.-P. Kim, Y.-H. Oh, E. Oh, S. Ko, M.-K. Han, H.-S. Kim, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4634–4641; d) G. Liu, J. Wang, D. S. Wunschel, Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12382–12383.
- [15] J. Maurel, C. Nadal, X. Garcia-Albeniz, R. Gallego, E. Carcereny, V. Almendro, M. Mármol, E. Gallardo, J. Maria Augé, R. Longarón, A. Martínez-Fernandez, R. Molina, A. Castells, P. Gascón, *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1066–1071.