

Rekrutierung Sulfhydryl-haltiger Peptide an Lipid- und biologische Membranen durch eine Maleimid-funktionalisierte Palmitinsäure**

Ivan Haralampiev, Monique Mertens, Roland Schwarzer, Andreas Herrmann, Rudolf Volkmer, Pablo Wessig* und Peter Müller*

Abstract: Diese Studie präsentiert einen neuen und leicht anwendbaren Ansatz, um Sulfhydryl-enthaltende Biomoleküle unter Verwendung einer Maleimid-funktionalisierten Palmitinsäure an Membranen zu rekrutieren. Insbesondere können auch vorgeformte (biologische) Membranen durch diese Strategie manipuliert werden. Die Anwendungsmöglichkeit der Methode wird durch Bindung eines Rhodamin-markierten Peptids an Lipid- und zelluläre Membranen mittels Fluoreszenzspektroskopie, Fluoreszenzlebensdauermessungen und Fluoreszenzmikroskopie demonstriert. Unser Ansatz eröffnet neue Möglichkeiten für die Herstellung biologisch aktiver Liposomen und die Manipulation lebender Zellen.

Die Rekrutierung löslicher Moleküle an Membranen ist für biologische, medizinische und pharmakologische Studien von Interesse. Etliche biologische Prozesse werden durch die Assoziation von Proteinen oder Peptiden an Membranen ausgelöst, und oft ist das Bindungsergebnis die Voraussetzung für anschließende membranassoziierte Prozesse und/oder Wechselwirkungen. Solche Membranassoziationen können durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden.^[1] Zu ihnen zählen 1) spezifische Wechselwirkungen mit Membranlipiden,^[2] 2) Konformationsänderungen und Membranpenetration durch lösliche Proteine,^[3] 3) die Bindung durch elektrostatische Wechselwirkungen^[1b,4] und 4) die Ausstattung eines löslichen Proteins mit einem Lipidanker (z. B. einer Fettsäurekette).^[5] Um solche Prozesse auf molekularer Ebene studieren und bewusst nutzen zu können, müssen Systeme entwickelt werden, die die Membranbindung eines entsprechenden Proteins oder Peptids nachahmen können.

Weiterhin wurden viele Anwendungen von Lipidvesikeln (Liposomen) entwickelt, welche mit biologisch aktiven Mo-

lekülen dekoriert wurden, um z. B. immunogene Medikamente oder Tumorthерапeutika sowie Wirkstoffträgersysteme herzustellen.^[6] In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Strategien für die kovalente Verknüpfung von Proteinen/Peptiden und Vesikeln entwickelt.^[6a,7] Im Allgemeinen wird ein funktionalisierter Membrananker verwendet, der mit dem entsprechenden Biomolekül chemisch reagiert. Das kann entweder dadurch erreicht werden, dass zuerst der Anker in die Membran eingebaut und dann das entsprechende Protein/Peptid zugegeben wird, oder dadurch, dass zuerst der Membrananker mit dem Protein/Peptid reagiert und anschließend der gebildete Komplex zur Membran gegeben wird. Die Struktur des Membranankers bestimmt entscheidend seine Fähigkeit, in die Membran eingebaut zu werden. Verwendet man beispielsweise von Phospholipiden abgeleitete Anker, die zwei Fettsäureketten tragen, dann ist ein Einbau in Lipidmembranen ausschließlich während deren Herstellung möglich.^[6a,8] Der Einbau solcher Moleküle in vorgebildete künstliche und vor allem biologische Membranen ist kaum möglich, weil diese Moleküle in wässriger Pufferlösung aufgrund ihrer geringen Löslichkeit selbst stabile Membranstrukturen ausbilden, was deren Einbau in eine Wirtmembran erschwert. Es ist eine herausfordernde Aufgabe, Membrananker zu finden, die teilweise wasserlöslich sind und damit auch den Einbau in vorgebildete Membranen ermöglichen.

In dieser Studie haben wir die Nutzung von Fettsäuren als reaktive Membrananker wieder aufgegriffen und Palmitinsäure mit einer Maleimid-Einheit funktionalisiert (PAEM) (Abbildung 1). Dies erlaubt die Rekrutierung Sulfhydryl-

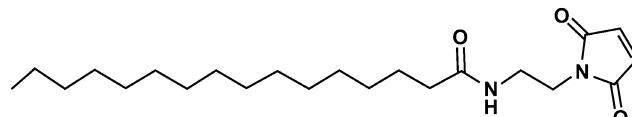


Abbildung 1. Struktur von N-(2-(N-Palmitoylaminooethyl)maleimid (PAEM).

yl(SH)-haltiger Peptide an Membranen. Einige frühere Studien verwendeten bereits Fettsäuren für die Rekrutierung von Peptiden an Membranen und zum Auslösen biologischer Effekte.^[9] Die Verknüpfung der Fettsäure an das entsprechende Biomolekül ist jedoch meist anspruchsvoll und zeitaufwändig. So wurde beispielsweise eine Fettsäure an den Lysin-Rest eines Peptids gekoppelt, welches nach Festphasenpeptidsynthese an die Säule gebunden war.^[9d] Wir zeigen hier, dass PAEM die effektive und schnelle Bindung Rhodamin-markierter Peptide an Membranen ermöglicht.

[*] I. Haralampiev, Dr. R. Schwarzer, Prof. Dr. A. Herrmann, Dr. P. Müller

Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin
Invalidenstraße 42, 10115-Berlin (Deutschland)
E-Mail: peter.mueller.3@rz.hu-berlin.de

M. Mertens, Prof. Dr. P. Wessig
Institut für Chemie, Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24-25, 14476 Potsdam (Deutschland)
E-Mail: wessig@uni-potsdam.de

Dr. R. Volkmer
Institut für Medizinische Immunologie, Charité
Universitätsmedizin Berlin
Hessische Straße 3, 10115 Berlin (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. Jörg Nikolaus für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408089> zu finden.

damin-markierter Peptide (Rhodamin- β A- β A-FWDTN- β A-C (RLP), siehe Hintergrundinformationen) an Lipidvesikel und biologische Membranen vermittelt. Prinzipiell sollte es mit dieser Methode möglich sein, jedes lösliche Molekül/Konstrukt, das eine zugängliche SH-Gruppe enthält, an der Oberfläche (vorgebildeter) Membranen zu binden.

Die Synthese von PAEM und die experimentellen Bedingungen aller Experimente sind in den Hintergrundinformationen angegeben. Die Reaktion zwischen PAEM und RLP in wässriger Pufferlösung wurde durch Massenspektrometrie verfolgt, und es zeigte sich, dass bereits 15 min nach Mischen der Substanzen signifikante Mengen des RLP-PAEM-Komplexes nachweisbar waren (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1).

Um zu zeigen, dass PAEM in der Lage ist, RLP an Lipidmembranen zu rekrutieren, wurden große unilamellare Vesikel (LUVs) bestehend aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) unter Zusatz von 0.5% des fluoreszierenden Phospholipids 1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-*sn*-glycero-3-phosphocholin (C_{12} -NBD-PC) hergestellt. Das erlaubt, die Assoziation von RLP an die Membranoberfläche durch Messung des resonanten Förster-Energietransfers (FRET) zwischen den Fluorophoren zu verfolgen. Das Ausmaß des FRET wurde durch Verfolgung der Fluoreszenzintensität der Vesikel suspension in Abwesenheit von RLP und in Gegenwart des Peptids oder einer Peptid-PAEM-Mischung bestimmt und zeigte, dass PAEM die Bindung von RLP an LUV-Membranen vermittelt (Abbildung S2).

Um die Bindung von RLP an Lipidmembranen besser quantifizieren zu können, wurde die FRET-Effizienz auch durch Messung der NBD-Fluoreszenzlebensdauer der DOPC/ C_{12} -NBD-PC-LUVs bestimmt. PAEM wurde entweder nach oder während der LUV-Präparation zugegeben. Im letzteren Fall wurde eine signifikante FRET-Effizienz von 56% bei Zugabe von RLP zu den Vesikeln gemessen, während die FRET-Effizienz auf 12% verringert war, wenn das Peptid mit DL-Dithiothreitol (DTT) vorbehandelt wurde (Abbildung 2). DTT reagiert mit den SH-Gruppen des RLP und verhindert damit eine Reaktion zwischen PAEM und RLP. Die aufeinanderfolgende Zugabe von RLP und DTT zu den DOPC/ C_{12} -NBD-PC/PAEM-Vesikeln beeinflusste hingegen die hohe FRET-Effizienz nicht. Offenbar ist DTT nicht in der Lage, die Bindung zwischen PAEM und RLP zu brechen.

Wenn PAEM in die LUVs nach der Vesikelpräparation eingebaut und anschließend RLP zugegeben wird, beobachtet man eine hohe FRET-Effizienz von 65%. Eine ähnlich hohe FRET-Effizienz wird beobachtet, wenn PAEM und RLP zunächst in einer kleinen Menge Pufferlösung inkubiert und dann die Mischung zu den Vesikeln gegeben wird. Die anschließende Zugabe von DTT zu dieser Lösung hatte keinen Einfluss auf diese Effizienz. Eine sehr geringe FRET-Effizienz wird hingegen gemessen, wenn 1) die Vesikel mit RLP in Abwesenheit von PAEM gemischt werden und 2) die Vesikel erst mit PAEM gemischt werden und anschließend mit RLP, das mit DTT vorinkubiert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PAEM die Rekrutierung von RLP an LUV-Membranen vermittelt, welches von der Reaktion zwischen

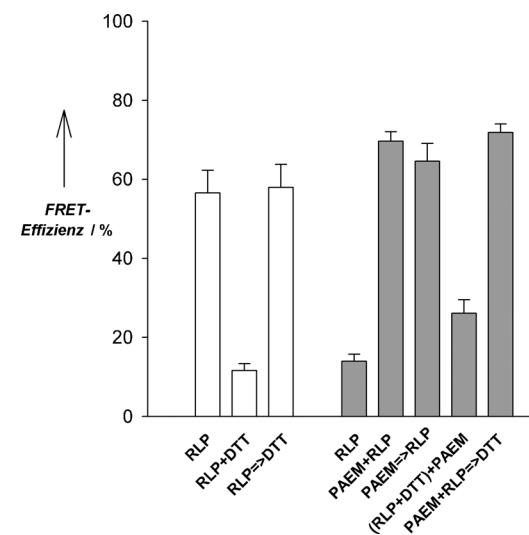


Abbildung 2. FRET-Effizienz zwischen NBD in C_{12} -NBD-PC und Rhodamin in RLP. PAEM (4 μ M) wurde zu 200 μ M DOPC/ C_{12} -NBD-PC (1 Mol-%)-LUVs entweder während (weiße Balken) oder nach der LUV-Präparation (graue Balken) zugegeben. Die Substanzen (8 μ M RLP, 140 μ M DTT) wurden wie angegeben zugegeben (+, Zugabe nach Vormischung; => aufeinanderfolgende Zugabe). Die Fluoreszenzlebensdauer von NBD wurde bei 25 °C gemessen und die FRET-Effizienz wie in den Hintergrundinformationen beschrieben bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (7 Messungen von jeweils 3 Vesikelpräparationen).

der Maleimidgruppe der PAEM und der Thiolgruppe des RLP abhängt.

Wenn PAEM und das Peptid zu einer vorgebildeten Membran gegeben werden, wird ausschließlich die äußere Membranlamelle funktionalisiert, während die Zugabe von PAEM während der Vesikelpräparation zu einer Verteilung in beiden Membranlamellen führt, sodass nur die Hälfte der PAEM-Moleküle für eine Reaktion mit RLP zugänglich sind. Es sei darauf hingewiesen, dass bei beiden Protokollen dieselbe Menge PAEM zugegeben wurde. Die Differenz der PAEM-Lokalisation wird quantitativ durch die gemessenen FRET-Effizienzen wiedergegeben. Die FRET-Effizienz war bei Vesikeln geringer, die PAEM in beiden Membranschichten enthielten, verglichen mit Vesikeln, bei denen PAEM ausschließlich in der äußeren Membranschicht lokalisiert war. Diese Erklärung setzt voraus, dass die Transmembranbewegung von PAEM sehr langsam ist im Vergleich zu unmodifizierter Palmitinsäure, bei der diese Bewegung sehr schnell mit Halbwertszeiten von wenigen Sekunden erfolgt.^[10] Zusätzliche Experimente wurden durchgeführt, um den Einfluss des RLP/PAEM-Verhältnisses auf die PAEM-vermittelte Bindung von RLP an LUVs zu untersuchen (Abbildung S3). Es konnte gezeigt werden, dass die FRET-Effizienz bei konstanter PAEM-Konzentration mit ansteigender RLP-Konzentration einem Grenzwert zustrebt.

Die Bindung von RLP an riesige unilamellare Vesikel (GUVs) wurde durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Zur besseren Visualisierung der Membranen wurden die GUVs zusätzlich mit dem Membran-eingebetteten Fluorophor C_{12} -NBD-PC markiert. Wieder wurden zwei Strategien zur Rekrutierung von RLP an die Membran verfolgt, nämlich durch

Zugabe von PAEM vor oder nach der GUV-Bildung. In letzterem Fall wurde eine signifikante Rhodamin-Fluoreszenz an der GUV-Membran beobachtet, wenn RLP mit PAEM vorinkubiert wurde, während die GUVs keine Markierung zeigten, wenn das Peptid 1) ohne PAEM oder 2) vorinkubiert mit DTT und PAEM zugegeben wurde (Abbildung 3). Eine ähnliche Abhängigkeit der Peptidbindung von der Anwesenheit von PAEM wurde gefunden, wenn PAEM in die GUV-Membran während der Präparation eingebaut wurde. Bei Zugabe von RLP zu diesen Vesikeln zeigen deren Membranen eine deutliche Rhodamin-Fluoreszenz, während eine Vorinkubation des Peptids mit DTT die Markierung verhinderte (Abbildung S4). Auch diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass PAEM die Rekrutierung von RLP an GUV-Membranen über eine Reaktion mit der Thiolgruppe vermittelt.

PAEM vermittelt auch die Bindung von RLP an biologische Membranen. So wurde das Peptid in Ab- oder Anwesenheit von PAEM zu Makrophagen gegeben und die Markierung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (Abbildung 4). Bei Zugabe von RLP in Anwesenheit von PAEM zeigte ein Großteil der Zellmembranen eine signifikante Rhodamin-Fluoreszenz, was auf

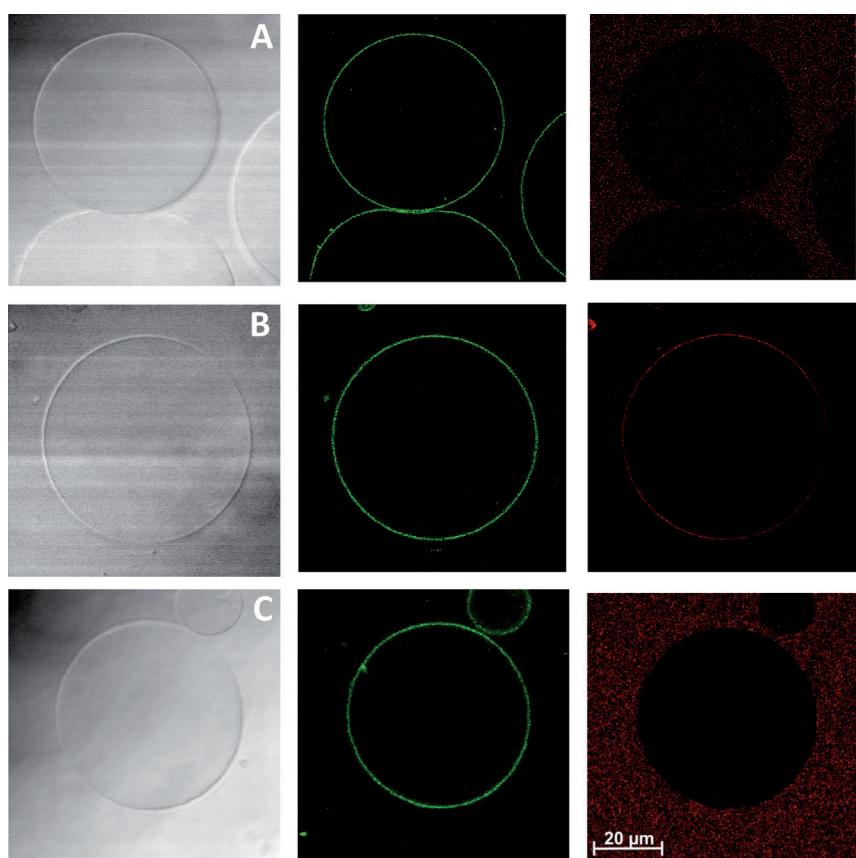


Abbildung 3. Bindung von RLP an GUV-Membranen. 50 µM GUVs bestehend aus DOPC und C₁₂-NBD-PC (0.5 Mol-%) wurden gemischt mit: A) 1 µM RLP, B) 1 µM RLP, vorinkubiert mit 1 µM PAEM oder C) 1 µM RLP, vorinkubiert mit 50 µM DTT und 1 µM PAEM. Die Vesikel wurden durch Differentialinterferenzkontrastmikroskopie (linke Spalte), konfokale Laser-Rastermikroskopie im grünen Kanal (mittlere Spalte) oder im roten Kanal (rechte Spalte) bei 25 °C beobachtet. Der Maßstab (20 µm) gilt für alle Bilder.

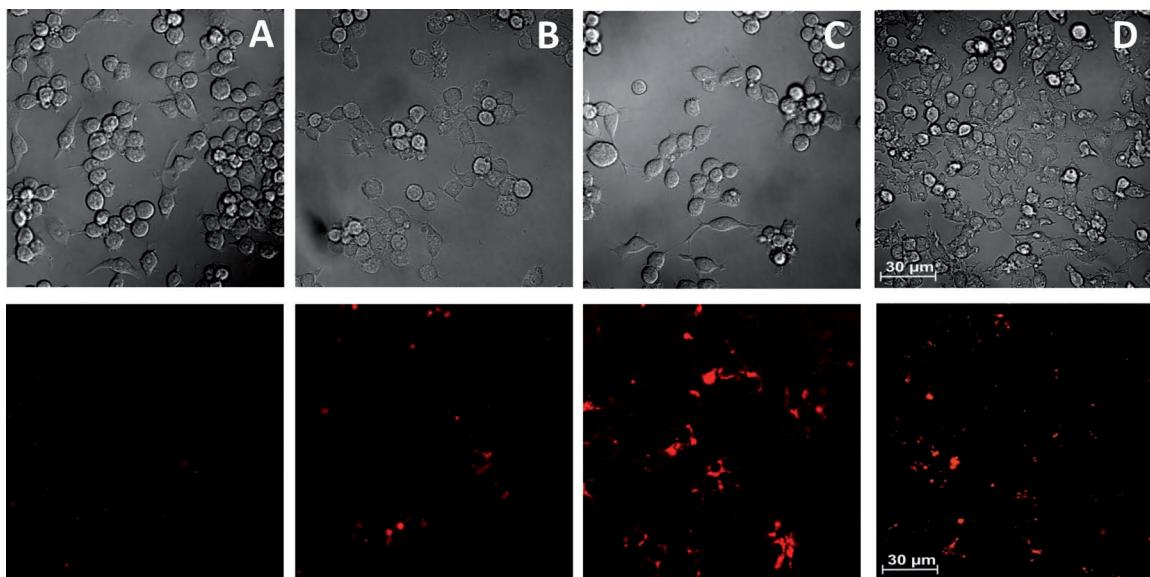


Abbildung 4. Bindung von RLP an Makrophagen. Die Zellen wurden mit A) Puffer, B) 10 µM RLP, C) 10 µM RLP, vorinkubiert mit 3 µM PAEM oder D) 10 µM RLP, vorinkubiert mit 50 µM DTT und 3 µM PAEM, für 5 min auf Eis inkubiert und dann mit Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Differentialinterferenzkontrastmikroskopie (obere Reihe) und konfokale Laser-Rastermikroskopie im roten Kanal (untere Reihe) bei 25 °C beobachtet. Der Maßstab (30 µm) gilt für alle Bilder.

eine PAEM-vermittelte Bindung des Peptids an die Plasmamembran hindeutet. Unter diesen Bedingungen wurde teilweise auch eine helle extrazelluläre Markierung beobachtet, die durch RLP/PAEM-Mizellen und/oder durch RLP-Aggregate, die an der Membranoberfläche anhaften, verursacht worden sein könnte. Wenn RLP allein oder RLP mit DTT und PAEM zu den Zellen gegeben wurde, konnte keine homogene Markierung der Plasmamembran beobachtet werden. Es konnten nur einige fluoreszierende extrazelluläre Partikel beobachtet werden, die von membrangebundenen RLP-Aggregaten herrühren könnten.

Die vorgestellte Methode ermöglicht eine schnelle und effektive Rekrutierung SH-haltiger Moleküle an Membranen, insbesondere auch an biologische Membranen. Grundsätzlich kann PAEM nach zwei Protokollen in die Membran eingebaut werden. Zum einen kann PAEM zu Modellmembranen (LUVs, GUVs) während deren Präparation zugegeben werden, und das Peptid wird dann an das in die Membran eingebettete Fettsäurederivat gebunden. Zum anderen können PAEM und das entsprechende Molekül im Puffer vorinkubiert werden, und anschließend wird der gebildete Komplex zur entsprechenden Membran gegeben. Dadurch können die Biomoleküle auch an vorgebildete Membranen rekrutiert werden, was die Anwendung bei biologischen Membranen ermöglicht. Die Methode bedient sich des Verhaltens von Fettsäuren in wässrigem Milieu, die als Monomere (unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration, cmc) oder als Gemisch von Mizellen und Monomeren (oberhalb der cmc) vorliegen. Unter unseren Bedingungen bildet der PAEM-RLP-Komplex (und PAEM selbst) keine Mizellen und liegt als Monomer vor (siehe Hintergrundinformationen). Der Transfer dieser Monomere in die Membran ermöglicht einen schnellen und effizienten Einbau des Komplexes.

Die PAEM-vermittelte Bindung von RLP an Membranen basiert auf der Reaktion zwischen der Maleimid-Einheit und der Sulfhydrylgruppe, da eine Blockierung der SH-Gruppe durch Vorinkubation mit DTT die Peptidbindung verhindert, wie durch die FRET-Untersuchungen an Membranen (siehe Abbildung 2) und die Mikroskopie an GUVs und Makrophagen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4) gezeigt wurde. Wir möchten anmerken, dass bei einer Anwendung der Methode in biologischen Systemen eine mögliche Reaktion von PAEM bzw. der SH-haltigen Peptide/Moleküle mit Thiolgruppen zellulärer Proteine berücksichtigt werden muss.^[11]

In zukünftigen Experimenten wird die Struktur der Fettsäurekette hinsichtlich der Länge und des Sättigungsgrades modifiziert werden. Diese Modifikationen werden Auswirkungen auf die Wasserlöslichkeit des Komplexes (was den Membraneinbau beeinflusst) und/oder dessen Anordnung in der Membran (was z.B. die laterale Verteilung beeinflusst) haben. Neben einer Markierung der Peptide ist es auch denkbar, die Fettsäurekette von PAEM mit einem Fluorophor zu versehen, indem bei der PAEM-Synthese eine entsprechend markierte Fettsäure verwendet wird. Dadurch wird es möglich sein, sowohl das Peptid als auch die Fettsäurekette z.B. bei deren intrazellulärer Bewegung zu verfolgen. Biologische Zellen nehmen ständig einen Teil ihrer Plasmamembran durch Endozytoseprozesse auf, was die intrazelluläre

Aufnahme der membranverankerten Peptide und damit die Auslösung entsprechender biologischer Effekte erlaubt.

Ein besonderer Vorteil unseres Ansatzes ist die starke Analogie zum physiologischen Palmitoylierungsprozess.^[12] Es wurde gezeigt, dass De- und Repalmitoylierungen von Proteinen eine wichtige Rolle spielen, weil diese die Lokalisation und Funktion von Proteinen steuern.^[13] Wie bei der zellulären Palmitoylierungs-Maschinerie nutzen wir Cysteine, um Biomoleküle mit Fettsäure-Ankern zu modifizieren. Wir glauben deshalb, dass dieser Ansatz auch genutzt werden kann, um nicht nur die biologische Palmitoylierung, sondern auch andere Lipidmodifikationen, wie die Myristoylierung, die Cholesteroylierung oder die Farnesylierung in In-vitro-Methoden mit gereinigten Proteinen und Peptiden in verschiedenen Membranmodellsystemen nachzuahmen.

Eingegangen am 8. August 2014,
veränderte Fassung am 17. Oktober 2014
Online veröffentlicht am 21. November 2014

Stichwörter: Liposomen · Maleimid · Membranen · Palmitinsäure · Palmitoylierung

- [1] a) A. Watts, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 959–965; b) D. Murray, N. BenTal, B. Honig, S. McLaughlin, *Structure* **1997**, *5*, 985–989; c) R. A. Dick, V. M. Vogt, *Front. Microbiol.* **2014**, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00187; d) J. H. Hurley, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2006**, *1761*, 805–811.
- [2] R. M. Epand, *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 279–294.
- [3] P. Müller, K. R. Erlemann, K. Müller, J. J. Calvete, E. Töpfer-Petersen, K. Marienfeld, A. Herrmann, *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 33–41.
- [4] a) M. Langner, K. Kubica, *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *101*, 3–35; b) M. Wilmes, B. P. A. Cammue, H.-G. Sahl, K. Thevissen, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1350–1358; c) A. Mulgrew-Nesbitt, K. Diraviyam, J. Wang, S. Singh, P. Murray, Z. Li, L. Rogers, N. Mirkovic, D. Murray, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2006**, *1761*, 812–826.
- [5] a) A. Arbuzova, D. Murray, S. McLaughlin, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1998**, *1376*, 369–379; b) M. D. Resh, *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 206–214; c) K. Weise, D. Huster, S. Kapoor, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 549–561; d) M. D. Resh, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 584–590.
- [6] a) L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, E. Allémann, *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1980–1992; b) E. Bourseau-Guilmaina, J. Béjauda, A. Griveau, N. Lautrama, F. Hindréa, M. Weylanda, J. P. Benoit, E. Garciona, *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 93–101.
- [7] P. Schelté, C. Boeckler, B. Frisch, F. Schuber, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 118–123.
- [8] a) H. Zhang, Y. Ma, X.-L. Sun, *Chem. Commun.* **2009**, 3032–3034; b) C. Boeckler, D. Dautel, P. Schelté, B. Frisch, D. Wachsmann, J.-P. Klein, F. Schuber, *Eur. J. Immunol.* **1999**, *30*, 2297–2308.
- [9] a) H. M. Ekrami, A. R. Kennedy, W.-C. Shen, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 283–286; b) A. Huang, L. Huang, S. J. Kennel, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8015–8018; c) T. H. Wright, A. E. S. Brooks, A. J. Didsbury, G. M. Williams, P. W. R. Harris, P. R. Dunbar, M. A. Brimble, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10616–10619; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10810–10813; d) D. Missirlis, H. Khant, M. Tirrell, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3304–3314.
- [10] A. M. Kleinfeld, P. Chu, J. Storch, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5702–5711.

- [11] A. G. Torres, M. J. Gait, *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 185–190.
- [12] M. D. Resh, *Curr. Biol.* **2013**, *23*, R431–R435.
- [13] a) O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*, 1746–1752; b) O. Rocks, M. Geerauer, N. Vartak, S. Koch, Z. P. Huang, M. Pechlivanis, J. Kuhlmann, L. Brunsved, A. Chandra, B. Ellinger, H. Waldmann, P. I.

-
- Bastiaens, *Cell* **2010**, *141*, 458–471; c) A. Lorentzen, A. Kinkhabwala, O. Rocks, N. Vartak, P. I. Bastiaens, *Sci. Signaling* **2012**, *3*, ra68; d) K. Görmer, M. Bürger, J. A. Kruijzer, I. Vetter, N. Vartak, L. Brunsved, P. I. Bastiaens, R. M. Liskamp, G. Triola, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1017–1023; e) N. Vartak, B. Papke, H. E. Grecco, L. Rossmannek, H. Waldmann, C. Hedberg, P. I. Bastiaens, *Biophys. J.* **2014**, *106*, 93–105.