

Kovalente Verknüpfung cyclischer TAT-Peptide mit GFP resultiert in der direkten Aufnahme in lebende Zellen mit sofortiger biologischer Verfügbarkeit**

Nicole Nischan, Henry D. Herce, Francesco Natale, Nina Bohlke, Nediljko Budisa, M. Cristina Cardoso* und Christian P. R. Hackenberger*

Abstract: Der Transport von freien Molekülen in das Zytoplasma und den Zellkern mittels Arginin-reicher zellpenetrierender Peptide (CPPs) ist auf kleine Substanzen beschränkt, während große Frachten wie Proteine mittels Endozytose aufgenommen werden und nicht aus den Endosomen entkommen können. Vor kurzem entdeckten wir, dass sich die Transduktionseffizienz Arginin-reicher CPPs durch Cyclisierung maßgeblich erhöhen lässt, und prüfen hier ob cyclische CPPs auch den Transport ganzer Proteine, hier GFP, in das Zytosol von lebenden Zellen ermöglichen. GFP-Konjugate cyclischer und linearer CPPs wurden ausgehend von orthogonalen Azid-funktionalisierten CPPs und Alkin-GFP erhalten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nur die cyclischen CPP-GFP-Konjugate von lebenden Zellen in Zytosol und Nukleoli mit sofortiger biologischer Verfügbarkeit aufgenommen werden. Die vorgestellte Methode erweitert die Anwendung von cyclischen CPPs mit dem effizienten Transport von ganzen, funktionalen Proteinen in lebenden Zellen.

Arginin-reiche CPPs verfügen über die Fähigkeit, unabhängig von Endozytose die Zellmembran zu durchqueren und dabei molekulare Frachten zu transportieren.^[1] Dieser Modus der Zellaufnahme, fortan Transduktion genannt, ermöglicht den direkten freien Zugang zu Zytoplasma und Zellkern und ist somit ideal für den Transport von Wirkstoffen und Biomarkern.^[2] Die Effizienz des Transportes ist jedoch abhängig von der Größe der Fracht,^[3] weshalb die Anwendung von CPPs auf die Transduktion von kleinen Frachten wie Fluorophoren und kleinen bis mittleren Peptiden beschränkt ist. Kovalent an CPPs gebundene Proteine werden weitestgehend über zytoplasmatische Vesikel aufgenommen, was zu endosomalem Einschluss und lysosomaler Zersetzung führt; somit

können Proteine intrazelluläre Ziele kaum oder gar nicht erreichen. Um diese Barriere zu überwinden und ganze Proteine mittels CPPs in lebende Zellen zu transportieren, wurden und werden verschiedene Strategien untersucht. Frühe Studien berichteten über den Transport eines Arginin-reichen GFP-Fusionsproteins mit scheinbar freiem intrazellulären GFP,^[4] jedoch wurde später gezeigt, dass diese Ergebnisse auf Fixierungsartefakten beruhen.^[5] In aktuelleren Berichten wurde die Zellaufnahme von GFP durch die Einführung zusätzlicher Arginine auf der Proteinoberfläche erreicht, wobei GFP jedoch in endozytotischen Vesikeln gefangen ist.^[6] Alternative Ansätze für die Proteinaufnahme bedienen sich der physikalischen Öffnung der Plasmamembran mittels Elektroporation, Mikroinjektion oder der Zugabe von Transportadditiva.^[7]

Hier verwenden wir eine chemoselektive Strategie zur Konjugation synthetischer CPPs, um Proteine auf passivem Weg in Zellen zu transportieren, denn ein solcher Transport bewirkt minimalen zellulären Stress und hat somit großes Potenzial für pharmazeutische Anwendungen. Ausschlaggebend für diese Arbeit war unsere Entdeckung, dass sich die Transduktionseffizienz Arginin-reicher Peptide, z.B. TAT-Peptid,^[8] durch Cyclisierung maßgeblich erhöhen lässt.^[9] Dadurch ergab sich die Frage, ob die Cyclisierung neben einer Erhöhung der kinetischen Effizienz auch die Transduktion größerer Frachten ermöglicht und somit das Größenlimit für Frachtransport durch Transduktion überwinden kann.^[3] Des Weiteren untersuchen wir, ob eine einfache Strukturänderung, nämlich die Cyclisierung, von CPPs genügt, um die Transduktion ganzer Proteine zu ermöglichen. Für die Untersuchung der zellulären Aufnahme ist GFP ein etabliertes Modellprotein, da seine intrazelluläre Verteilung in lebenden

[*] N. Nischan,^[+] Prof. C. P. R. Hackenberger^[+]
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@fmp-berlin.de

N. Nischan^[+]
Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

Dr. H. D. Herce,^[+] Dr. F. Natale, Prof. M. C. Cardoso^[+]
Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie
Schnittspahnstraße 10, 64287 Darmstadt (Deutschland)
E-Mail: Cardoso@bio.tu-darmstadt.de

Dr. H. D. Herce^[+]
Department of Physics, Applied Physics, and Astronomy
Rensselaer Polytechnic Institute
110 Eighth Street, Troy, NY, 12180 (USA)

N. Bohlke, Prof. N. Budisa
Technische Universität Berlin, Institut für Chemie
Müller-Breslau-Straße 10, 10623 Berlin (Deutschland)
Prof. C. P. R. Hackenberger^[+]
Humboldt Universität zu Berlin, Department Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
[+] Diese Autoren haben in gleichem Maße beigetragen.
[**] Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SPP1623, Teilprojekt Prof. Cardoso/Prof. Hackenberger/Prof. Leonhardt, SFB765 B5), des Fonds der Chemischen Industrie, der Einstein Stiftung Berlin und der Boehringer-Ingelheim Foundation (Plus 3 Award) unterstützt. Außerdem danken wir Anne Lehmkühl für exzellente technische Unterstützung.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410006> zu finden.

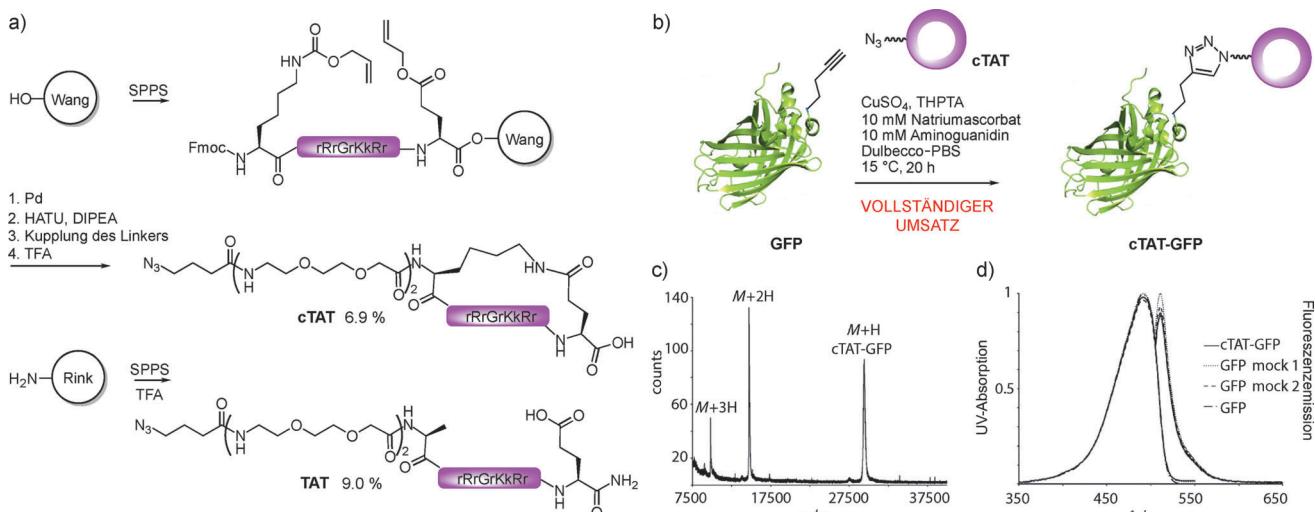


Abbildung 1. Synthese von konjugierbaren cyclischen und linearen TAT-basierten CPPs sowie deren Konjugation an **GFP**. a) Synthese der Peptide **cTAT** und **TAT**. b) CuAAC von Alkinyl-GFP und **cTAT** unter optimierten Bedingungen ergibt **cTAT-GFP**. c) MALDI-Spektrum des Reaktionsprodukts nach Dialyse. d) Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren (Anregung bei 495 nm) von **cTAT-GFP** sowie von unbehandeltem **GFP**, das allen Reagentien außer Azid (**GFP** mock 1) bzw. keinen Reagenzien (**GFP** mock 2) ausgesetzt wurde. Die Graphen wurden auf das Maximum normalisiert.

Zellen direkt mittels Konfokalmikroskopie verfolgt werden kann. Darüber hinaus belegt die Fluoreszenz des GFP auch die richtige Faltung der Proteinstruktur und damit die Funktionalität. Wir zeigen hier, dass GFP durch die Konjugation an ein cyclisches TAT-CPP in lebende Zellen transduziert und sofort frei im Zytosol und im Zellkern verfügbar ist.

Um ortsspezifisch ein cyclisches TAT an GFP zu konjugieren (**cTAT-GFP**, Abbildung 1b), haben wir mittels einer chemoselektiven, optimierten Kupfer-katalysierten Azido-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)^[10] ein cyclisches Azido-TAT-Peptid (**cTAT**) mit einer GFP-Mutante aus auxotropher Expression in *E. coli*^[11] umgesetzt, das ein Homopropargylglycin (HPG) am N-Terminus trägt (**GFP**, siehe die Hintergrundinformationen). Die Chemoselektivität der Proteinmodifikationstechnik^[12] ist hier nicht nur für die Ortsspezifität ziel führend, sie ist auch deshalb notwendig, weil cyclische Peptide nicht mittels Standardverfahren der Proteinbiosynthese eingeführt werden können. Als cyclisches CPP haben wir die vielfach positiv geladene TAT-Sequenz mit abwechselnden L- und D-Aminosäuren gewählt, um maximale Aufnahmeeffizienz zu erhalten;^[9] ein flexibler Spacer trägt die reaktive Azido-Gruppe im notwendigen Abstand für die effektive Konjugation und flexible Präsentation des Peptids.

Das cyclische TAT-Peptid wurde auf einem Standard-Wang-Harz auf der Festphase synthetisiert, wobei orthogonal geschütztes Lys und Glu für die Cyclisierung eingebaut wurden (Abbildung 1a). Zunächst verwendeten wir einen Spacer aus fünf Aminosäuren (GKGNG) mit entweder Azido-benzoësäure oder Azidobutansäure am N-Terminus. Die entsprechenden Peptide wurden mit einer Gesamtausbeute von 3–4 % erhalten (siehe die Hintergrundinformationen). Diese CPPs resultierten jedoch trotz Optimierungsversuchen ausschließlich in unvollständigem Umsatz in der CuAAC (Abbildung S6, S7); darüber hinaus war eine Trennung von

GFP und dem Konjugationsprodukt nicht erfolgreich. Jedoch konnte ein cyclisches Azido-TAT mit einem Oligoethylen-glykol-Spacer (**cTAT**, Abbildung 1a) synthetisiert werden, das ausgezeichnete Resultate in der Konjugation an Alkin-GFP ergab. Trotz seiner extremen Hydrophilie konnte dieser Azido-Peptidbaustein in nur einem Aufreinigungsschritt mittels Umkehrphasen-HPLC bei reduzierter Flussrate in einer Gesamtausbeute von 6.9 % erhalten werden. Für die Optimierung der CuAAC zur Konjugation von **GFP** und **cTAT** begannen wir mit einem generellen Protokoll,^[10c] das wir zuvor für die Glycosylierung von Alkin-funktionalisierten Proteinen genutzt haben.^[13] Wir erzielten reproduzierbar vollständigen Umsatz bei 15 °C in 20 Stunden (Abbildung 1b,c) sowie optimale Rückgewinnung des Proteins mittels Dialyse gegen EDTA in Dulbecco-PBS und schließlich HEPES-Puffer.

Um direkt den Einfluss der Cyclisierung der TAT-Sequenz auf die Proteinaufnahme in Zellen zu testen, synthetisierten wir zusätzlich auf ähnlichem Weg als Kontrolle ein lineares TAT-GFP-Konjugat (**TAT-GFP**; siehe Abbildung 1a und die Hintergrundinformationen). Das lineare Peptid **TAT** und **cTAT** gleichen sich sowohl stereochemisch als bezüglich des Linkers; minimale Veränderungen beinhalten ein Alanin anstelle des cyclisierten Lysins sowie eine Glutaminsäure mit C-terminalem Amid anstelle einer Säure für gleichbleibende Gesamtladung und proteolytische Stabilität. In den Transduktionsexperimenten verwendeten wir außerdem nichtkonjugiertes **GFP** als CPP-freies Kontrollprotein, das identischen chemischen Bedingungen ausgesetzt wurde wie die Konjugate.

Um zu testen, ob die Konjugation von **cTAT** die photo-physikalischen Eigenschaften von GFP verändert, verglichen wir die UV-Absorptions- und Fluoreszenzspektren von isoliertem **cTAT-GFP** mit verschiedenen GFP-Proben (Abbildung 1d). Diese wurden entweder den Reaktionsbedingun-

gen der Konjugation ausgesetzt, jedoch ohne Azid (**GFP** mock 1) bzw. ohne Reagentien (**GFP** mock 2), oder nur wie eine Reaktion aufgearbeitet (**GFP**). Bei gleichen Protein-Konzentrationen zeigten alle Proben gleiche Absorptionsmaxima bei 495 nm sowie Fluoreszenzemissionsmaxima bei 509 nm von gleicher Intensität (Abbildung S12–S14).

In den Zellaufnahmestudien zielten wir auf eine Aufnahme per Transduktion ab. Um dies zu veranschaulichen, verglichen wir die Aufnahme eines linearen TAT-Fluorophorphor-Konjugats und eines Fluorophor-markierten amphipathischen Peptids (PTD4; siehe die Hintergrundinformationen).^[1a,2a,b] Obwohl beide Peptide Affinität für die Plasmamembran aufweisen, wird das PTD4-Peptid in Endosomen gefangen, während das TAT-Peptid transduzieren kann und frei in der gesamten Zelle verteilt ist (Abbildung S15).

Nach diesen Vorbereitungen verglichen wir Zellaufnahme und intrazelluläre Verteilung der beiden GFP-Konjugate **cTAT-GFP** und **TAT-GFP** mit nichtkonjugiertem **GFP** mittels Lebendzellen-Konfokalmikroskopie in menschlichen Zervixkarzinomzellen (HeLa). Dafür wurden die Zellen mit den Proteinen bei jeweils angegebener Konzentration für 40 min in einem HEPES-Puffer inkubiert, der weder Wachstumsfaktoren noch Glukose enthielt, um Endozytose zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen abgebildet (Abbildung S16), gewaschen und nochmals abgebildet (Abbildung 2). Für die Quantifizierung der Transduktionseffizienz wurden all diejenigen Zellen als positiv eingestuft, deren Zytoplasma und Nukleoli homogen gefärbt waren. Die Zellaufnahmeexperimente zeigten, dass nichtkonjugiertes **GFP** bei 150 µM nicht in lebende Zellen transduziert (Abbildung 2a). Auch wenn nichtkonjugiertem **GFP** 5 µM Rhodamin-markiertes TAT-CPP zugesetzt wurde, kann zwar TAT-CPP in die meisten Zellen transduzieren und sich in Zytosol und Nucleoli anreichern, nichtkonjugiertes **GFP** aber wird selbst bei 30 mal so großer Konzentration nicht von den Zellen aufgenommen (Abbildung 2b). Als nächstes untersuchten wir die Effizienz der Zellaufnahme des linearen **TAT-GFP** bei verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 150 µM). Wir detektierten ein sehr schwaches intrazelluläres **GFP**-Signal. Bei der höchsten Konzentration (150 µM) wurden nur 1% der Zellen transduziert (Abbildung 2c,e), was mit unseren früheren Beobachtungen übereinstimmt.^[3] Bei 50 und 100 µM konnte keine Aufnahme festgestellt werden. Dagegen konnte **cTAT-GFP** bei allen getesteten Konzentrationen (50–150 µM) effizient den Großteil der lebenden Zellen transduzieren (Abbildung 2d,e). Wir konnten zuvor zeigen, dass die größere Entfernung der Seitenketten des cyclischen TAT-Peptid im Vergleich zu der linearen Variante zu erhöhter Aufnahmeeffizienz und Kinetik führt.^[9] Unsere neuen Ergebnisse zeigen, dass diese Strukturänderung auch den Transport viel größerer Frachten ermöglicht, was wir hier anhand eines ganzen, gefalteten Proteins von 27.5 kDa demonstriert haben.

Dass das Protein **cTAT-GFP** frei in Zytoplasma und Nukleoli beweglich ist, haben wir mit der FRAP-Methode („fluorescence recovery after photobleaching“) nachgewiesen (Abbildung S17). Bezüglich des Mechanismus der Proteinaufnahme deutet besonders die Lokalisierung des GFP in den Nukleoli auf einen nichtendozytotischen Weg. Deshalb

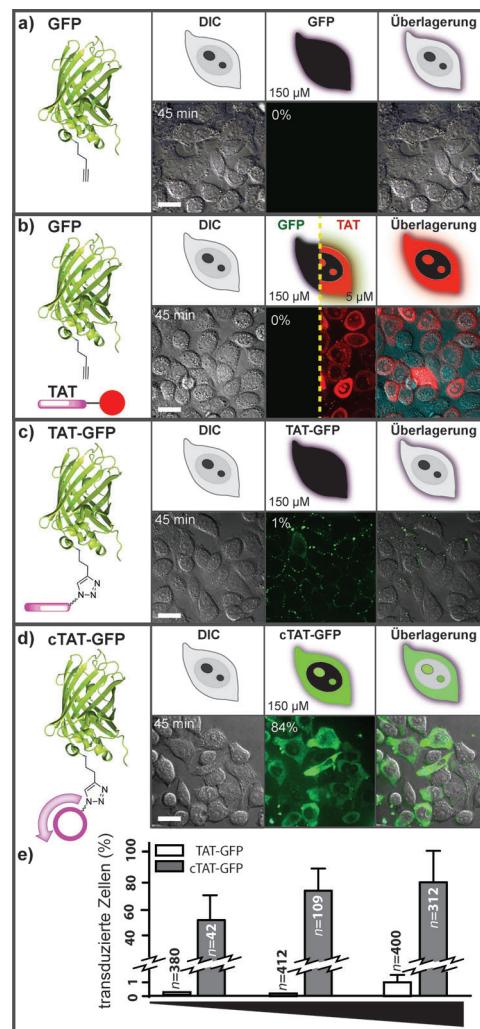


Abbildung 2. Chemoselektive Konjugation von cyclischem **cTAT** an **GFP** bewirkt Transduktion des **GFP** in lebende Zellen. a) Nichtmodifiziertes **GFP** konnte lebende Zellen nicht transduzieren. b) Bei Koinkubation von **GFP** und **TAT**-Peptid kann letzteres effizient in lebende Zellen transduzieren, **GFP** nicht. c) Die Konjugation von linearem **TAT** an **GFP** (**TAT-GFP**) führt nicht zu effizienter Transduktion. Bei 150 µM zeigte 1% der Zellen transduziertes **TAT-GFP**. d) **cTAT-GFP** transduziert lebende Zellen effizient. (e) Quantifizierung des Anteils transduzierter Zellen bei 50, 100 und 150 µM von **TAT-GFP** und **cTAT-GFP**. Zellen wurden als positiv gezählt, wenn sie ein diffuses Signal in Zytoplasma und Nukleoli zeigten. Fehlerbalken: Standardabweichung. Maßstab: 15 µm.

studierten wir den Aufnahmemodus von **cTAT-GFP** in Anwesenheit eines Makropinozytoseinhibitors sowie bei 4 °C (Abbildung S18), mit dem Ergebnis, dass **cTAT-GFP** energieunabhängig aufgenommen wird.

Bei der Transduktion des **TAT**-Peptids ist vor dem Waschen die intrazelluläre Fluoreszenz bedeutend größer als die extrazelluläre. Im Vergleich dazu ist das Verhältnis bei **cTAT-GFP** genau umgekehrt (Abbildung S16b,c). Diese Beobachtung erklären wir mit dem signifikanten Größenunterschied zwischen dem Peptid von 2 kDa und einem Protein von 27.5 kDa. Eine Abschätzung der intrazellulären Konzentration von **GFP** ist in Abbildung S19 gezeigt. Unter Aufnahme von **cTAT-GFP** bleibt die generelle Gestalt der Zellen er-

halten, außerdem migrieren die Zellen weiterhin und durchlaufen Mitose (Film 1), was darauf hindeutet, dass die Aufnahme von **cTAT-GFP** gut toleriert wird und Zellintegrität oder Stoffwechsel nicht gestört werden.

Zusammengefasst haben wir gezeigt, dass die chemoselektive Konjugation von einem cyclischen CPP an ganzes, gefaltetes GFP dessen Transduktion in lebende Zellen mit direkter zytosolischer Verfügbarkeit ermöglicht. Da der Einbau von Alkinen in Proteine gut etabliert ist, lässt sich diese Methode allgemein auf die Transduktion anderer Proteine von vergleichbarer Größe anwenden. Außerdem bietet diese kovalente Methode mehrere Ansatzpunkte für die Verbesserung der Transduktionseffizienz, z.B. durch die mehrfache Konjugation von CPPs an ein Protein, den Einsatz anderer Arginin-reicher CPPs, wie dem cyclischen R10,^[9] oder die Kombination mit anderen Proteintransfermethoden, wie etwa dem Zusatz von Transportadditiva^[7] oder Elektroporation. Die Erschließung dieser Möglichkeiten ist notwendig, um auch unter Wachstumsbedingungen oder bei therapeutischen Anwendungen eine effiziente Proteinaufnahme zu erreichen. Nichtsdestotrotz verfügt die hier gezeigte Konjugation cyclischer CPPs zum Transport ganzer, funktionaler Proteine über eine für kovalente Strategien noch nie dagewesene Effizienz. Sie erschließt neue Anwendungsmöglichkeiten für Proteine, z.B. Zellscreenings.

Experimentelles

Peptidsynthese: Alle Peptide wurden mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt und mit HPLC-UV oder UPLC-UV und hochauflösendem ESI-MS charakterisiert. Detaillierte Synthesevorschriften und Analytik von **cTAT** und **TAT** sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Die entsprechenden Daten für die Peptide **TAT-FITC**, **TAT-TAMRA** und **PTD4-TAMRA** sind in Lit. [9] gegeben.

Genexpression und Aufreinigung von HPG-GFP: Das Plasmid pET30b GFPhs1-RM, das eine mutierte Variante von GFP codiert, die nur das N-terminale Methionin enthält (GFPhs1-RM,^[14] 245 Aminosäuren, 27.6 kDa), wurde freundlicherweise von Soun-drarajan Nagasundarapandian aus der Gruppe von Prof. Sun Gu Lee (Pusan University, South Korea) zur Verfügung gestellt. Für die Entfernung des C-terminalen His-Tags wurde eine Protease-Erken-nungsseite von „Tobacco Etch Virus“ (TEV) eingefügt. Ein Glutamin am N-Terminus sichert, dass das N-terminale Met oder Homopropargylglycin (HPG) nicht abgespalten wird. Für die Expression von GFPhs1-RM TEV wurde der Met-auxotrophe *E. coli*-Stamm B834 (DE3) ($B \rightarrow B834^{[15]} \rightarrow B834$ (DE3)^[16]) mit pET30b GFPhs1-RM TEV transformiert. Die Expression wurde bei einer finalen HPG-Konzentration von 50 mg mL^{-1} durchgeführt. Nach der Zell-Lyse wurde HPG-GFP (**GFP**) mittels Ni-NTA-Säule gereinigt, wonach der HisTag durch TEV-Protease abgespalten und die TEV-Protease durch eine weitere Ni-NTA-Säule abgetrennt wurde.

CPP-GFP-Konjugation: Mutiertes **GFP** wurde mittels CuAAC mit **cTAT**- oder **TAT**-Peptiden konjugiert. Optimierte Reaktionsbedingungen bestanden aus Schütteln bei 1000 Umdrehungen pro Minute bei 15°C für 20 Stunden in Ca/Mg-freiem Dulbecco-PBS bei einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ Protein, $500 \mu\text{M}$ Azidopeptid, $200 \mu\text{M}$ CuSO₄, $1,000 \mu\text{M}$ THPTA-Ligand sowie 10 mM Aminoguanidinium-hydrochlorid und Natriumascorbat (Ansatzvolumen $500 \mu\text{L}$). Die Reaktion wurde mit $50 \mu\text{L}$ von 5 mM EDTA gestoppt. Kupfer wurde mittels Dialyse gegen 2.5 mM EDTA in Ca/Mg-freien Dulbecco-PBS entfernt, daraufhin wurde EDTA mittels Dialyse gegen HEPES-Puffer abgetrennt. Nachweis des vollständigen Umsatzes und Produktcharakterisierung erfolgte mit MALDI-TOF.

Zellaufnahmeexperimente wurden mit Ausnahme minimaler Veränderungen wie vormals beschrieben durchgeführt.^[9] Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Ca²⁺-freiem Medium (ohne Serum) erfolgte die Zugabe von Peptid-/Proteinlösung, die dafür auf die jeweilige Konzentration mit einem Puffer verdünnt wurde (140 mM NaCl , 2.5 mM KCl , 5 mM HEPES , 5 mM Glycin , der pH wurde mit NaOH eingestellt). Die Zellen wurden mit den Proteinen für 60 Minuten bei 37°C in Multiwell-Kammern mit Boden von optischer Glasgüte (Probenvolumen: $30 \mu\text{L}$) inkubiert. Im Anschluss wurde die Protein- oder Peptidlösung vorsichtig gegen Wachstumsmedium ausgetauscht und die Zellen mikroskopiert.

Konfokalmikroskopie und Bildanalyse: Die Zellabbildung erfolgte auf einem UltraVIEWVoX-Drehscheibenkonfokalsystem (PerkinElmer, Großbritannien). Dafür wurden die Zellen in einer geschlossenen Lebendzellmikroskopiekammer (ACU control, Olympus, Japan) bei 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ und 60% Luftfeuchtigkeit auf einem Nikon-Ti-Mikroskop (Nikon, Japan) positioniert. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem PlanapoChromat-Ölimmersionsobjektiv (ca. $60/1.45 \text{ NA}$) durch eine gekühlte 14-Bit-EMCCD-Kamera (C911-50, CamLink). Um das GFP-Signal zu erzeugen, wurden ein 488-nm-Anregungslaser und ein 521-nm-Emissionsfilter verwendet. TAMRA wurde mit einem 561-nm-Laser angeregt und die Emission durch einen 587-nm-Filter geleitet. Für die Berechnung der Transduktionseffizienz wurden alle Zellen mit homogener Färbung des Zytosplasmas und der Nukleoli als positiv gezählt.

Eingegangen am 12. Oktober 2014

Online veröffentlicht am 17. Dezember 2014

Stichwörter: Chemoselektive Konjugation · Cyclische Peptide · Lebendzellmikroskopie · Proteintransport · Zellpenetrierende Peptide

- [1] a) G. Ter-Avetisyan, G. Tunnemann, D. Nowak, M. Nitschke, A. Herrmann, M. Drab, M. C. Cardoso, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3370–3378; b) F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, *Traffic* **2007**, *8*, 848–866; c) H. D. Herce, A. E. Garcia, M. C. Cardoso, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, DOI: 10.1021/ja507790z.
- [2] a) R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 863–868; b) S. Futaki, H. Hirose, I. Nakase, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2863–2868; c) H. D. Herce, W. Deng, J. Helma, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2660–2667.
- [3] G. Tunnemann, R. M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer, M. C. Cardoso, *Faseb J.* **2006**, *20*, 1775–1784.
- [4] N. J. Caron, Y. Torrente, G. Camirand, M. Bujold, P. Chapdelaine, K. Leriche, N. Bresolin, J. P. Tremblay, *ASGT Mol. Therapy* **2001**, *3*, 310–318.
- [5] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.
- [6] a) S. M. Fuchs, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 167–170; b) B. R. McNaughton, J. J. Cronican, D. B. Thompson, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6111–6116.
- [7] a) K. Inomata, A. Ohno, H. Tochio, S. Isogai, T. Tenno, I. Nakase, T. Takeuchi, S. Futaki, Y. Ito, H. Hiroaki, M. Shirakawa, *Nature* **2009**, *458*, 106–109; b) T. Takeuchi, M. Kosuge, A. Tadokoro, Y. Sugiura, M. Nishi, M. Kawata, N. Sakai, S. Matile, S. Futaki, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 299–303.
- [8] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193.
- [9] G. Lättig-Tünemann, M. Prinz, D. Hoffmann, J. Behlke, C. Palm-Apergi, I. Morano, H. D. Herce, M. C. Cardoso, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 453–464.
- [10] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin,

- K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; c) V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879–9883; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10063–10067; d) B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.
- [11] a) N. Budisa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426–6463; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586–6624; b) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68.
- [12] a) K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16–20; b) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; c) D. Schumacher, C. P. R. Hackenberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 62–69.
- [13] L. M. Artner, L. Merkel, N. Bohlke, F. Beceren-Braun, C. Weise, J. Dernedde, N. Budisa, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 522–524.
- [14] S. Nagasundarapandian, L. Merkel, N. Budisa, R. Govindan, N. Ayyadurai, S. Sriram, H. Yun, S. G. Lee, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2521–2524.
- [15] W. B. Wood, *J. Mol. Biol.* **1966**, *16*, 118–133.
- [16] a) F. W. Studier, P. Daegelen, R. E. Lenski, S. Maslov, J. F. Kim, *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 653–680; b) F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113–130.