

Sekundärionen-Massenspektrometrie von genetisch kodierten Zielproteinen**

Ingrid C. Vreja, Selda Kabatas, Sinem K. Saka, Katharina Kröhnert, Carmen Höschen, Felipe Opazo, Ulf Diederichsen* und Silvio O. Rizzoli*

Abstract: Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) wird üblicherweise für die Analyse der Isotopenzusammensetzung verschiedener Materialien eingesetzt. In der Biologie findet sie immer häufiger Anwendung, vor allem um den Stoffwechsel in Zellen zu untersuchen. Einzelne Zielproteine sind mit SIMS jedoch schwer zu identifizieren, wodurch diese Methode in ihren Anwendungsmöglichkeiten bezüglich Studien bestimmter Kompartimente oder Proteinkomplexe eingeschränkt wird. Wir stellen hier eine Methode vor, mit der spezifische Proteine durch eine Klick-Reaktion mit Isotopen- und Fluoreszenzmarkierungen versehen werden (*specific protein isotopic and fluorescence labeling, SPILL*). Wir haben mit dieser Methode verschiedene Proteine mit ^{19}F markiert und mit NanoSIMS und Fluoreszenzmikroskopie abgebildet. Anhand des ^{19}F -Signals (mit minimalem Hintergrund) konnten Zielproteine präzise lokalisiert werden, wodurch korrelative Studien der Proteinverteilung und des Zellstoffwechsels oder der Zellzusammensetzung ermöglicht wurden. SPILL kann in allen biologischen Proben angewendet werden, in denen Klick-Reaktionen durchführbar sind, welche die meisten Zellkultursysteme und kleine Modellorganismen umfassen.

Unlängst wurden einige Technologien entwickelt, um die chemische Zusammensetzung biologischer Proben zu untersuchen, wie z.B. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (MALDI),^[1,2] Laser-Ablation und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-MS)^[3] oder

Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS).^[4,5] Letztere verfügt über die beste räumliche Auflösung von 30–50 nm in der x-y-Ebene und bis zu 5–10 nm in der z-Achse in der NanoSIMS-Konfiguration.^[5] NanoSIMS tastet mit einem Primärionenstrahl, z.B. Cs⁺, die Probenoberfläche ab, wodurch Sekundärionen freigesetzt werden, die mittels Massenspektrometrie analysiert werden. So entsteht eine Abbildung der Isotopenzusammensetzung der Probe.

NanoSIMS-Studien beschreiben häufig die Gesamtverteilung der natürlich vorkommenden Isotopen in biologischen Proben, wie in der Mikrobiologie üblich.^[6,7] Andere NanoSIMS-Anwendungen bestimmten die Verteilung von mit nicht-nativen Isotopen markierten Moleküle, die in die biologischen Probe eingeführt wurden.^[8,9] Mit einem verwandten Verfahren wurde der Zellsatz untersucht, indem Zellen mit einem isotopenmarkierten Stoffwechselprodukt, wie z.B. einer Aminosäure oder einem Nukleotid, ernährt wurden, dessen Inkorporation zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde.^[10–12]

All diese Anwendungen sind jedoch aufgrund ihrer Schwierigkeiten, bestimmte Proteine oder Organellen zu identifizieren, limitiert. Einige wenige Ausnahmen können anhand ihrer Morphologie bestimmt werden.^[4,10] Korrelation von NanoSIMS und Fluoreszenzmikroskopie wurde als eine mögliche Lösung für die Anwendungseinschränkung vorgeschlagen.^[4] Dies ist jedoch kompliziert, da es zwei Instrumente und ein sehr genaues Überlagern der beiden Bildtypen

[*] I. C. Vreja,^[+] Dr. S. K. Saka, K. Kröhnert, Dr. F. Opazo,

Prof. Dr. S. O. Rizzoli

Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie

Universitätsmedizin Göttingen

Humboldtallee 23, 37073 Göttingen (Deutschland)

E-Mail: srizzol@gwdg.de

S. Kabatas,^[+] Prof. Dr. U. Diederichsen

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Universität Göttingen

Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)

E-Mail: udieder@gwdg.de

Dr. C. Höschen

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität München

Freising-Weihenstephan (Deutschland)

I. C. Vreja,^[+] S. Kabatas,^[+] Dr. S. K. Saka, K. Kröhnert, Dr. F. Opazo, Prof. Dr. U. Diederichsen, Prof. Dr. S. O. Rizzoli

Exzellenzcluster Mikroskopie im Nanometerbereich und Molekulärphysiologie des Gehirns (CNMPB)
Göttingen (Deutschland)

I. C. Vreja^[+]

International Max Planck Research School Molecular Biology
Göttingen (Deutschland)

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

[**] Wir danken Dr. Vladimir Belov (Abteilung NanoBiophotonik, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) für die Bereitstellung des Star635-Azids, Johann Lugmeier (Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, TU München) für technische Unterstützung bei den NanoSIMS-Messungen und William I. Zhang für Hilfe beim Erstellen des Manuskripts. I.C.V. wurde durch ein Dorothea Schlözer-Stipendium der Universität Göttingen unterstützt. Diese Arbeit wurde durch Fördermittel der DFG (Exzellenzcluster Mikroskopie im Nanometerbereich und Molekulärphysiologie des Gehirns (CNMPB), an S.O.R. und U.D.; sowie RI1967/3-1, an S.O.R.) und des ERC (CoG NeuroMolAnatomy, an S.O.R.) finanziert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201411692> zu finden.

 © 2015 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.

erfordert. Eine andere Lösung wäre, die Proben mit Antikörpern zu markieren, die an isotopenreine Metalle gekuppelt sind, wie z.B. Lanthanoide.^[13] Diese Antikörper können ohne korrelative Mikroskopie mit NanoSIMS abgebildet werden. Jedoch wird die hohe Auflösung der NanoSIMS-Technologie durch die Verwendung von Antikörpern beeinträchtigt. Besonders die Antikörper mit einer großen Metallmarkierung werden nur schlecht aufgenommen und erreichen lediglich einen kleinen Bruchteil der Epitope, was zu einem weniger genauen Bild führt.^[14,15]

In der Fluoreszenzmikroskopie wurde dieses Problem durch die Einführung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gelöst, das durch genetische Kodierung an Zielproteine gekuppelt werden kann. Wir suchten nach einer ähnlicher Strategie für NanoSIMS, wobei ein bestimmtes Isotop in ein Zielprotein integriert werden sollte. Dafür sind drei Grundvoraussetzungen erforderlich: Erstens, die genetische Kodierung sollte so flexibel sein, dass das Isotop in alle Proteine möglichst vieler unterschiedlicher biologischer Präparate eingeführt werden kann. Zweitens, das Isotop sollte durch eine höchst spezifische Reaktion an das Zielprotein gebunden werden. Drittens, das Isotop sollte nur in geringen Mengen in unbehandelten Präparaten vorhanden sein, um ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen.

Die ersten beiden Voraussetzungen werden am besten durch Erweiterung des genetischen Codes gefolgt von einer

der UAA) und damit wesentlich kleiner als andere Tags, wie z.B. GFP, nebst anderer technischer Vorteile.^[21] Die Kupplung der Fluorophore oder Isotopen an die UAAs wird erst nach Fixierung der Zelle durchgeführt und kann somit die Funktionen in der Zelle nicht mehr beeinträchtigen. Prinzipiell ist es sogar möglich, das Experiment ohne Klick-Chemie durchzuführen, indem man isotopenhaltige Aminosäuren oder Aminosäuren mit selten natürlich vorkommenden Elementen, wie z.B. Selenocystein,^[22] nutzt. Dies würde jedoch zu einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis führen, da jedes Protein lediglich ein Se-Isotop beinhalten würde.

Wir untersuchten die Spezifität der Klick-basierten Markierung in Säugetierzellen anhand markierter (tagged) Versionen von Syntaxin 1, Syntaxin 13 und SNAP-25 (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1, Genboxen), drei Transmembranproteine bzw. Membran-verankerte Proteine der SNARE-Familie,^[23] basierend auf unserer Expertise in der Biologie und dem Verhalten dieser Proteine mit Tag.^[24,25] Die Alkin-modifizierte UAA Propargyl-L-lysin (PRK) wurde mithilfe der Wildtyp-tRNA/RS aus *Methanosarcina mazei* eingeführt.^[19,20] Alle drei Proteine konnten durch diese Methode detektiert werden (Abbildung S2).

Wir wollten einen isotopenreichen Marker an die Alkin-gruppe des PRK kuppeln, um die Proteine durch NanoSIMS zu identifizieren (Abbildung 1). Da ¹⁹F nur in geringen Mengen in normalen Zellen vorhanden ist und mittels NanoSIMS mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis detektiert werden kann, entwickelten wir ein Klick-bares Dipentafluorbenzylpeptid mit 13 ¹⁹F-Atomen, das wir **SK155** nannten (Abbildung 2). Für ein einfaches Testverfahren mittels Fluoreszenzmikroskopie beinhaltet es ebenfalls das Fluorophor Abberior Star635, das drei der ¹⁹F-Atome beisteuert.^[26] Ein Nonapeptid mit vier negativ geladenen Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginsäure) wurde entworfen, um die Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen sicherzustellen. Orthogonal geschützte Lysine wurden für spätere Seitenkettenverlängerung des Fluorophors Abberior Star635-NHS (Abberior

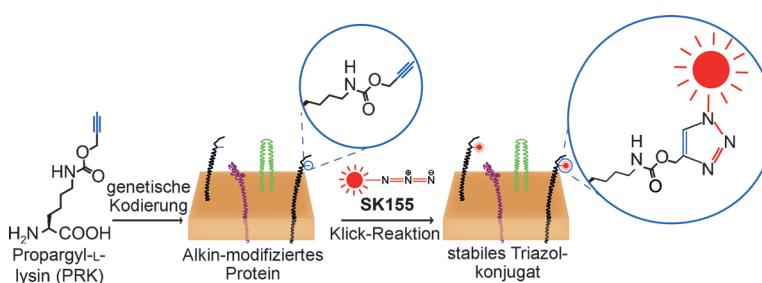


Abbildung 1. Inkorporation von Propargyl-L-lysin (PRK) in Zielproteine und Klick-Reaktion mit **SK155**, einem dualen Marker, der sowohl für Fluoreszenzmikroskopie als auch für SIMS verwendet werden kann.

Markierung durch Klick-Chemie erfüllt (Abbildung 1). Dabei werden nichtnatürliche Aminosäuren (UAAs) in das Zielprotein eingebaut.^[16,17] Die UAAs werden über verschiedene Marker (beispielsweise Fluorophore) sichtbar gemacht, die durch z.B. Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (Klick-Chemie)^[18] oder andere Kupfer-freie Methoden an die UAAs gekuppelt werden. Um die UAAs zu inkorporieren, werden modifizierte Versionen der Zielproteine, die ein Amber-Stop-Codon (TAG) beinhalten, zusammen mit passenden tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (tRNA/RS) exprimiert. Letztere integrieren die UAAs an durch das Amber-Codon definierte Stellen in das Zielprotein.^[19,20] Das genetisch kodierte Tag in der Klick-Chemie ist nur wenige Atome groß (der Alkin- oder Azidrest an

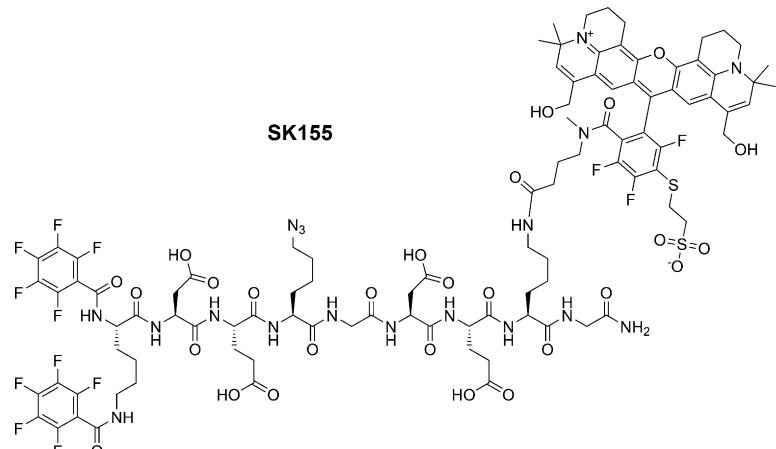


Abbildung 2. **SK155** enthält ¹⁹F-Atome als Isotopenmarker für SIMS und ein Abberior Star635-Fluorophor.

GmbH, Deutschland) genutzt. Ein Lysin am N-Terminus verbindet zwei 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoësäuren. In einem letzten Schritt wurde Azidolysin (Fmoc-Lys(N₃)-OH) für das Azid zwecks der Markierung der Zielproteine mit **SK155** per Klick-Chemie hinzugefügt. Ausgehend von dem Nonapeptid auf einem Sieber-Amid-Harz wurde **SK155** (Abbildung S3) mithilfe von Mikrowellen durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach dem Fmoc-Verfahren mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBr) hergestellt. Die 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoësäure wurde an das Trägermaterial gekuppelt.^[27] Die Spaltung vom Harz erfolgte durch das Nonapeptid (C₆F₅CO)₂-Lys-Asp-Glu-Lys(N₃)-Gly-Asp-Glu-Lys-Gly-NH₂, das an Abberior Star635-NHS in Lösung gekuppelt wurde. Nach HPLC-Aufreinigung wurde die Zusammensetzung des Markers **SK155** durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelt.

Die ¹⁹F-Verteilung überlappt wie erwartet mit dem Fluoreszenzsignal (Abbildung 3A und Abbildung S4) und ermöglicht ebenfalls die Analyse vieler weiterer Parameter, sowohl in der Fluoreszenz- als auch der Isotopendomäne (Abbildung 3A). Der Markierungsprozess war effizient (Abbildung 3B), ebenso entsprach wie erwartet das ¹⁹F- dem

Fluoreszenzsignal, was mit dem Zielprotein korreliert (Abbildung 3 C).

Diese Experimente zeigen, dass spezifische Proteine durch Klick-Reaktion isotopen- und fluoreszenzmarkiert werden können (specific protein isotopic and fluorescence labeling, SPILL). SPILL bietet zwei wesentliche Vorteile für NanoSIMS: Erstens, es erleichtert die Untersuchung bestimmter Zielproteine mit NanoSIMS, ohne von der Fluoreszenzmikroskopie abzuhängen. Zweitens, es ermöglicht es, die hohe Auflösung von NanoSIMS in der *z*-Achse auszunutzen. In Korrelation mit Fluoreszenzmikroskopie ist die Auflösung der korrelierten Bilder in der *z*-Achse durch die optische Methode bestimmt, die typischerweise 50-fach schlechter ist als die von NanoSIMS.^[4] Dies sollte mit SPILL kein Problem mehr darstellen.

Als Machbarkeitsnachweis kombinierten wir SPILL mit einer Analyse des zellulären Umsatzes basierend auf der Inkorporation von isotopenmarkierten Metaboliten. Wir behandelten die Zellen mit ¹⁵N-markiertem Leucin, das in neu translatierten Proteinen eingebaut wird und demnach den Umsatz Protein-basierter Zellstrukturen anzeigt (siehe Abbildung S5 für den zeitlichen Ablauf der Experimente). Das Verhältnis zwischen ¹⁵N und ¹⁴N bietet eine genaue Messung

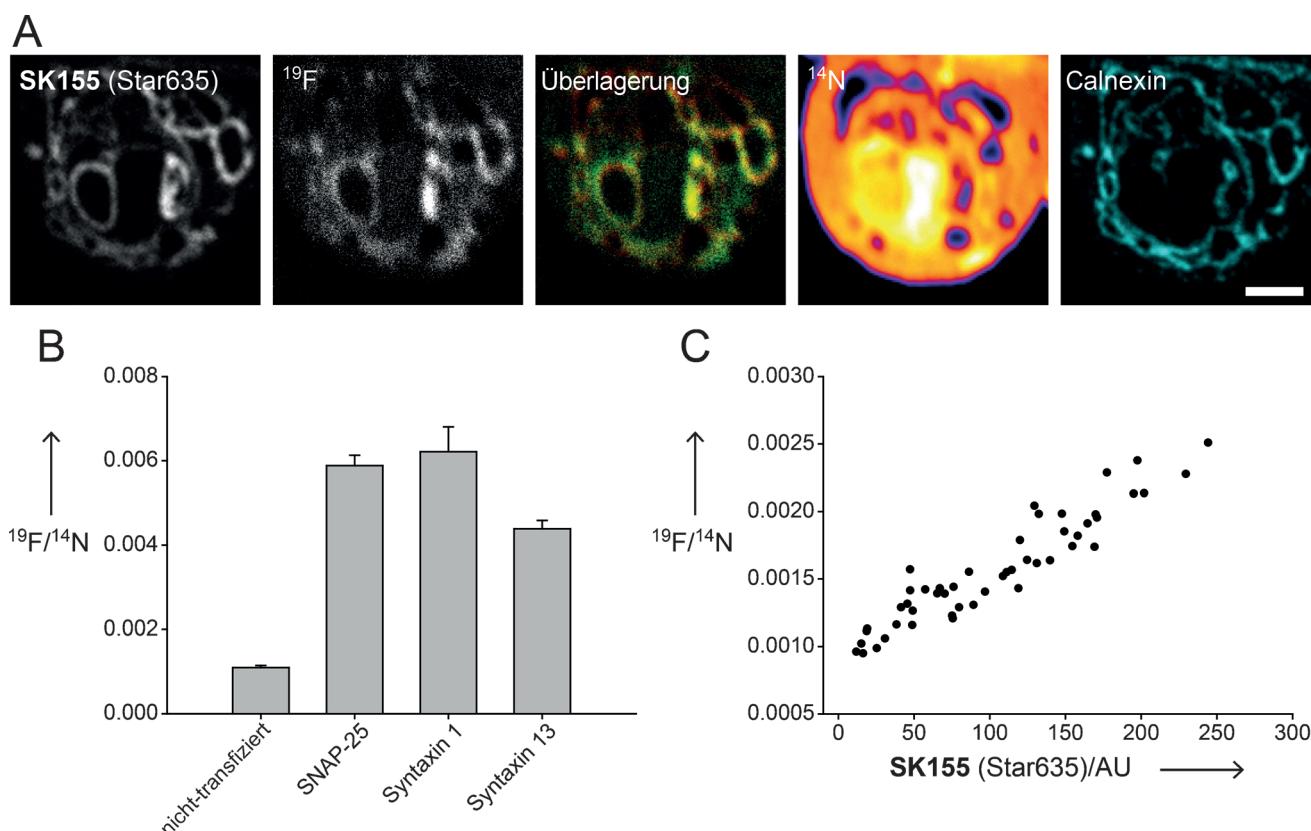


Abbildung 3. Genetische Inkorporation nichtnatürlicher Aminosäuren (UAAs) als Werkzeug, um Proteine für NanoSIMS zu markieren. A) Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder einer repräsentativen Zelle, das PRK in Syntaxin 1 inkorporiert hat und anschließend mit **SK155** markiert wurde. Es sind dargestellt: ein Konfokalbild der Star635-Fluoreszenz (links), ein NanoSIMS-Bild des ¹⁹F-Signals und eine Überlagerung (Star635-Signal in rot; ¹⁹F in grün). Als zusätzliche Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder sind gezeigt: ein ¹⁴N-Bild und ein Konfokalbild von Antikörper-gefärbtem Calnexin, einem Marker für das endoplasmatische Retikulum. Maßstab 2 µm. B) Das Verhältnis zwischen ¹⁹F und ¹⁴N in nicht-transfizierten Zellen wurde gemessen und mit Zellen verglichen, die verschiedene Proteine exprimieren. Es war für alle exprimierten Proteine signifikant höher: SNAP-25 ($p < 0.01$), Syntaxin 1 ($p < 0.001$) und Syntaxin 13 ($p < 0.001$; t-Tests). Die Anzahl der analysierten Zellregionen war: 32 für nicht-transfizierte, 371 für SNAP-25, 281 für Syntaxin 1 und 448 für Syntaxin 13 exprimierende Zellen. C) Die lineare Beziehung zwischen dem ¹⁹F/¹⁴N-Verhältnis in einer Zelle und der **SK155** (Star635)-Intensität in den entsprechenden Zellregionen.

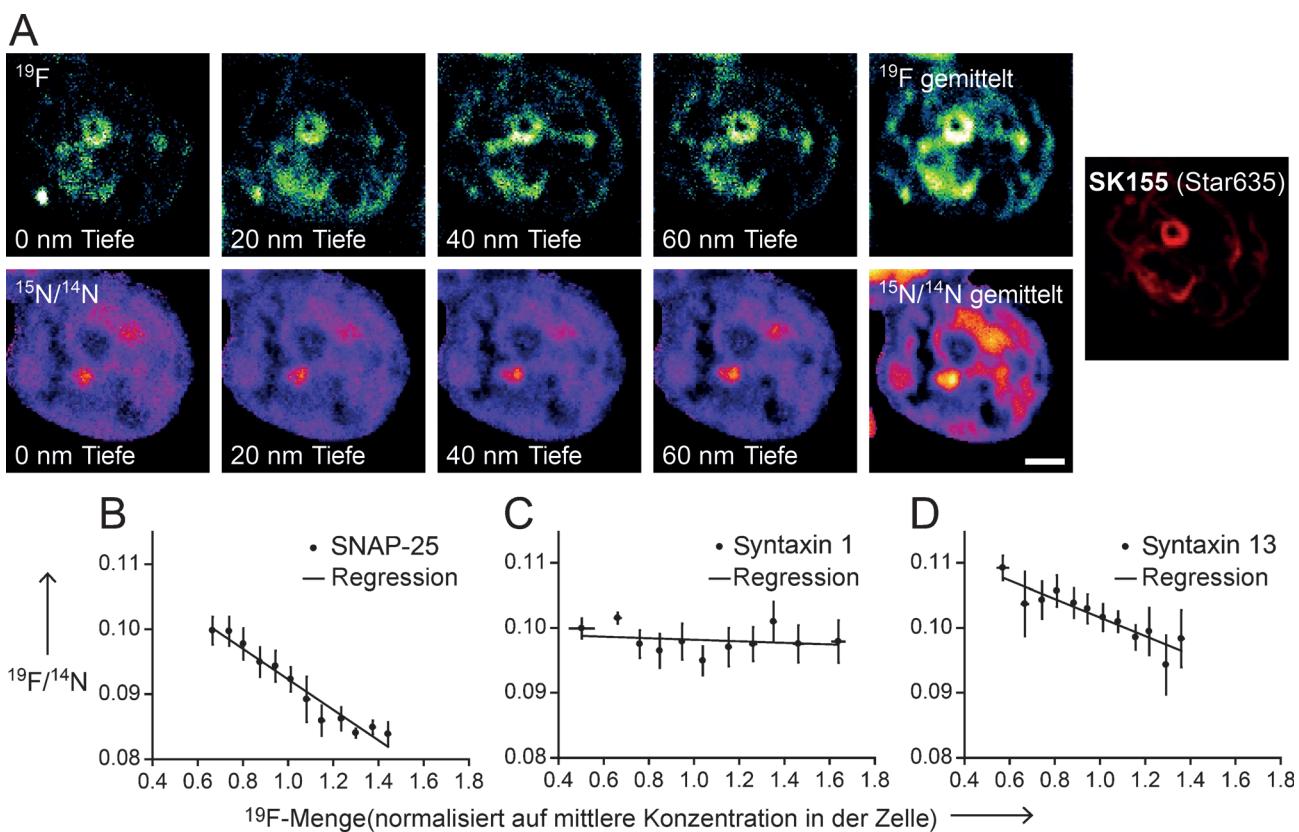


Abbildung 4: Genetisch markierte Proteine und SIMS bieten Informationen darüber, wie der Proteinmetabolismus mit dem Vorkommen eines bestimmten Proteins korreliert. A) Eine Serie von NanoSIMS-Bildern verschiedener Tiefenebenen einer SK155-markierten Zelle, die Syntaxin 1 exprimiert. ¹⁹F ist in der oberen Zeile und das ¹⁵N/¹⁴N-Verhältnis in der unteren Zeile gezeigt. Zum Vergleich ist das Fluoreszenzsignal von SK155 derselben Zelle als Einschub eingefügt. Maßstab 2 µm. B) Eine Analyse des ¹⁵N/¹⁴N-Verhältnisses als Funktion der ¹⁹F-Menge. Die Anzahl der analysierten Zellregionen ist: 371 für SNAP-25, 281 für Syntaxin 1 und 448 für Syntaxin 13. Ein Abwärtstrend ist für alle drei Färbtypen zu beobachten, wobei dieser bei SNAP-25 und Syntaxin 13 statistisch signifikant ist ($p < 0.01$, T-Tests), jedoch nicht für Syntaxin 1.

des Umsatzes: Je höher das Verhältnis, desto mehr neue Proteine wurden in die jeweilige Struktur integriert (Abbildung 4A). Auf der hohen Auflösung von NanoSIMS in der z-Achse stützend untersuchten wir die ¹⁵N-, ¹⁴N- und ¹⁹F-Zusammensetzung der Probe in verschiedenen Tiefen (siehe Aufnahmen von Syntaxin 1 in Abbildung 4A), was uns weit mehr Informationen ermöglichte, als nur eine Korrelation mit Fluoreszenzbildern (Abbildung 4A, Einschub). Wir bestimmten den Proteinumsatz der Zellen anhand des Zielproteins (identifiziert durch ein hohes ¹⁹F-Signal). Interessanterweise fanden wir eine negative Korrelation von hoher Proteinexpression mit dem Verhältnis ¹⁵N zu ¹⁴N für SNAP-25 und Syntaxin 13 (Abbildung 4B,D), nicht jedoch für Syntaxin 1 (Abbildung 4C). Aufgrund der Probleme bei der Korrelation der Bilder mit abweichenden Auflösungen in der z-Achse konnten keine signifikanten Trends zwischen dem Fluoreszenzsignal der markierten Proteine und einem Mittelwertbild aus Bildern vom ¹⁵N/¹⁴N-Verhältnis verschiedener Tiefen beobachtet werden (Daten sind nicht gezeigt). Dies zeigt ebenfalls einen Vorteil von NanoSIMS gegenüber anderen Methoden wie stimuliert Raman-Streuung,^[28] die den Umsatz mit einer weit niedrigeren Auflösung in der z-Achse misst, auch wenn im Gegensatz zu NanoSIMS die Methode

nichtinvasiv ist und dementsprechend lebende Zellen untersucht werden können.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Plasmamembran und frühe Endosomen, wo SNAP-25 und Syntaxin 13 lokalisiert sind, einen langsameren Metabolismus haben als andere Teile der Zelle. Die Umsatzrate im endoplasmatischen Retikulum, wo Syntaxin 1 in BHK-Zellen festsetzt,^[29] scheint der Durchschnittsumsatzrate der Zelle zu entsprechen. Obwohl die biologische Relevanz dieser Ergebnisse weitere Untersuchungen in anderen zellulären Systemen erfordert, schließen wir, dass SPILL ein effizientes Verfahren zur SIMS-basierten Untersuchung bestimmter Proteine ist. Die einzige Voraussetzung für SPILL ist ein biologisches System, das für UAA-Kodierung und Klick-Chemie geeignet ist. Dies wurde bereits für Bakterien, Hefe, Säugetierzellen, *Caenorhabditis elegans*^[30] und *Drosophila melanogaster*^[31] demonstriert, was von einem weiten Anwendungsbereich dieser Methode zeugt.

Stichwörter: Isotopenmarkierung · Klick-Chemie · Nichtnatürliche Aminosäuren · Protein-Engineering · Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS)

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5784–5788
Angew. Chem. **2015**, *127*, 5876–5880

- [1] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751–4760.
- [2] S. Trimpin, M. L. Deinzer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 542–547.
- [3] J. S. Becker, *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 255–268.
- [4] S. K. Saka, A. Vogts, K. Kröhnert, F. Hillion, S. O. Rizzoli, J. T. Wessels, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3664.
- [5] C. Lechene, F. Hillion, G. McMahon, D. Benson, A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, D. Distel, Y. Luyten, J. Bonventre, D. Hentschel, K. M. Park, S. Ito, M. Schwartz, G. Benichou, G. Slodzian, *J. Biol.* **2006**, *5*, 20.
- [6] N. Musat, H. Halm, B. Winterholler, P. Hoppe, S. Peduzzi, F. Hillion, F. Horreard, R. Amann, B. B. Jørgensen, M. M. M. Kuypers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17861–17866.
- [7] A. W. Thompson, R. A. Foster, A. Krupke, B. J. Carter, N. Musat, D. Vaulot, M. M. M. Kuypers, J. P. Zehr, *Science* **2012**, *337*, 1546–1550.
- [8] J. F. Frisz, K. Lou, H. A. Klitzing, W. P. Hanafin, V. Lizunov, R. L. Wilson, K. J. Carpenter, R. Kim, I. D. Hutcheon, J. Zimmerberg, M. L. Kraft, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E613–E622.
- [9] J. F. Frisz, H. A. Klitzing, K. Lou, I. D. Hutcheon, P. K. Weber, J. Zimmerberg, M. L. Kraft, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16855–16861.
- [10] M. L. Steinhauser, A. P. Bailey, S. E. Senyo, C. Guillermier, T. S. Perlstein, A. P. Gould, R. T. Lee, C. P. Lechene, *Nature* **2012**, *481*, 516–519.
- [11] S. E. Senyo, M. L. Steinhauser, C. L. Pizzimenti, V. K. Yang, L. Cai, M. Wang, T.-D. Wu, J.-L. Guerquin-Kern, C. P. Lechene, R. T. Lee, *Nature* **2013**, *493*, 433–436.
- [12] D.-S. Zhang, V. Piazza, B. J. Perrin, A. K. Rzadzinska, J. C. Poczekat, M. Wang, H. M. Prosser, J. M. Ervasti, D. P. Corey, C. P. Lechene, *Nature* **2012**, *481*, 520–524.
- [13] M. Angelo, S. C. Bendall, R. Finck, M. B. Hale, C. Hitzman, A. D. Borowsky, R. M. Levenson, J. B. Lowe, S. D. Liu, S. Zhao, Y. Natkunam, G. P. Nolan, *Nat. Med.* **2014**, *20*, 436–442.
- [14] F. Opazo, M. Levy, M. Byrom, C. Schäfer, C. Geisler, T. W. Groemer, A. D. Ellington, S. O. Rizzoli, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 938–939.
- [15] J. Ries, C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi, H. Ewers, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 582–584.
- [16] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [17] S. Milles, E. Lemke, *Bioessays* **2013**, *35*, 65–74.
- [18] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [19] S. Milles, S. Tyagi, N. Banterle, C. Koehler, V. VanDelinder, T. Plass, A. P. Neal, E. A. Lemke, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5187–5195.
- [20] D. P. Nguyen, T. Elliott, M. Holt, T. W. Muir, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11418–11421.
- [21] K. Horisawa, *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 1–6.
- [22] J. L. Leonard, D. M. Leonard, Q. Shen, A. P. Farwell, P. E. Newburger, *J. Cell. Biochem.* **1996**, *61*, 410–419.
- [23] R. Jahn, R. H. Scheller, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 631–643.
- [24] N. D. Halemani, I. Bethani, S. O. Rizzoli, T. Lang, *Traffic* **2010**, *11*, 394–404.
- [25] P. Hoopmann, A. Punge, S. V. Barysch, V. Westphal, J. Bükers, F. Opazo, I. Bethani, M. Lauterbach, S. W. Hell, S. O. Rizzoli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19055–19060.
- [26] K. Kolmakov, V. N. Belov, J. Bierwagen, C. Ringemann, V. Müller, C. Eggeling, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 158–166.
- [27] K. Tomita, S. Oishi, H. Ohno, N. Fujii, *Biopolymers* **2008**, *90*, 503–511.
- [28] L. Wei, Y. Shen, F. Xu, F. Hu, J. K. Harrington, K. L. Targoff, W. Min, *ACS Chem. Biol.* **2015**, DOI: 10.1021/cb500787b.
- [29] S. Martinez-Arca, V. Proux-Gillardeaux, P. Alberts, D. Louvard, T. Galli, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2805–2816.
- [30] L. Davis, J. W. Chin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 168–182.
- [31] T. S. Elliott, F. M. Townsley, A. Bianco, R. J. Ernst, A. Sachdeva, S. J. Elsässer, L. Davis, K. Lang, R. Pisa, S. Greiss, K. S. Lilley, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 465–472.

Eingegangen am 4. Dezember 2014

Online veröffentlicht am 17. März 2015