

Kovalente Proteinmarkierung durch enzymatische Phosphocholinierung**

Katharina Heller, Philipp Ochtrup, Michael F. Albers, Florian B. Zauner, Aymelt Itzen* und Christian Hedberg*

Professor Roger S. Goody zum 71. Geburtstag gewidmet

Abstract: Wir präsentieren eine neue Methode zur Proteinmarkierung, die auf der kovalenten enzymatischen Phosphocholinierung einer spezifischen Octapeptidsequenz intakter Proteine beruht. Das Enzym AnkX aus Legionellen wurde etabliert, um funktionalisierte Phosphocholingruppen aus synthetischen CDP-Cholin-Derivaten auf N- und C-Termini, sowie interne Schleifenregionen zu übertragen. Zudem kann die kovalente Modifikation durch das Legionellen-Enzym Lem3 hydrolytisch entfernt werden. Lediglich eine 8 Aminosäuren kurze Peptidsequenz und eine kleine Verbindungsgruppe (PEG-Phosphocholin) sind für die effiziente Proteinmarkierung erforderlich.

Ortspezifische Markierungsmethoden sind essenziell für die Modifizierung von Proteinen mit Funktionalitäten jenseits des genetischen Codes. Wünschenswert sind Modifikationen mittels regioselektiver Reaktionen mit geringer Kreuzreaktivität, welche die Proteinaktivität und -integrität gewährleisten.^[1] Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung von Enzymen, die kurze Peptidsequenzen in Zielproteinen erkennen.^[2] Ein Beispiel ist die Phosphopantetheinyl(Ppant)-

Transferase (PPTase), die eine Ppant-Gruppe aus Coenzym A auf ein Serin der Undecapeptidsequenz DSLEFIASKLA überträgt.^[3] Chemisch modifiziertes Ppant konnte mit der PPTase auf ein rekombinantes Protein mit der Erkennungssequenz übertragen werden.^[3b,c,4] Wird diese Sequenz durch das 8-kDa-Acyl-Carrier-Protein (ACP) ersetzt, kann sowohl die Modifizierung als auch die nachfolgende Abspaltung durch ACP-Hydrolase (AcpH) realisiert werden.^[4b] Kürzlich wurde außerdem die Demodifizierung einer Sequenz aus 11 Aminosäuren (AS) durch verschiedene AcpHs berichtet.^[5] Unser Ziel war die Entwicklung einer alternativen enzymatischen Proteinmarkierungsstrategie, bei der ein synthetisches Nukleotid die Anbringung und Ablösung einer Markierung an eine kurze Peptidsequenz ermöglicht. Wir präsentieren Daten zur allgemeinen Anwendbarkeit der regioselektiven kovalenten enzymatischen Phosphocholinierung von Proteinen unter Verwendung von synthetischen CDP-Cholin-Derivaten.

Die kürzlich entdeckte Phosphocholinierung von Wirtszellproteinen durch *Legionella pneumophila* ist eine posttranslationale Modifikation, bei der das Legionellen-Effektorprotein AnkX eine Phosphocholineinheit von einem Cytidindiphosphatcholin (CDP-Cholin) auf einen Serinrest in der Switch II-Schleife der wirtszelleigenen kleinen GTPase Rab1 überträgt (Schema 1 A).^[6] Interessanterweise wird diese Modifikation zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion durch die Legionellen-Phosphodiesterase Lem3 hydrolytisch entfernt (Schema 1 A).^[7] AnkX benötigt nicht die gesamte GTPase-Struktur zur Erkennung, sondern lediglich die TITSSYYR-Peptidsequenz aus der Switch-II-Schleife.^[7a]

Auf der Grundlage dieser Beobachtung präsentieren wir die Synthese von funktionalisierten CDP-Cholin-Derivaten zur Übertragung auf Fusionsproteine mit der Erkennungssequenz in N- oder C-terminalen Bereichen oder internen Schleifenregionen (Schema 1 B,C).

Zunächst untersuchten wir AnkX^[6a,8]- und Lem3^[7]-Konstrukte (949 AS bzw. 570 AS) hinsichtlich ihrer Expression und enzymatischen Aktivität (Abbildung S1). Die Konstrukte AnkX_{1–800} und Lem3_{1–570} wiesen bezüglich Expression, Reinigung und Aktivität die besten Ergebnisse auf und wurden daher für die Etablierung unserer Markierungsstrategie beibehalten. Ein Alanin-Scan der AnkX-Erkennungssequenz zeigte, dass Modifikationen außerhalb des Octapeptids TITSSYYR vollständig akzeptiert werden, Modifikationen innerhalb von **TITSSYYR** (fett gedruckt) hingegen die Akzeptanz abschwächen. Veränderungen innerhalb von TSSYY


[*] M.Sc. K. Heller,^[†] F. B. Zauner, Prof. Dr. A. Itzen
Center for Integrated Protein Science Munich
Technische Universität München, Department Chemie
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: aymelt.itzen@tum.de

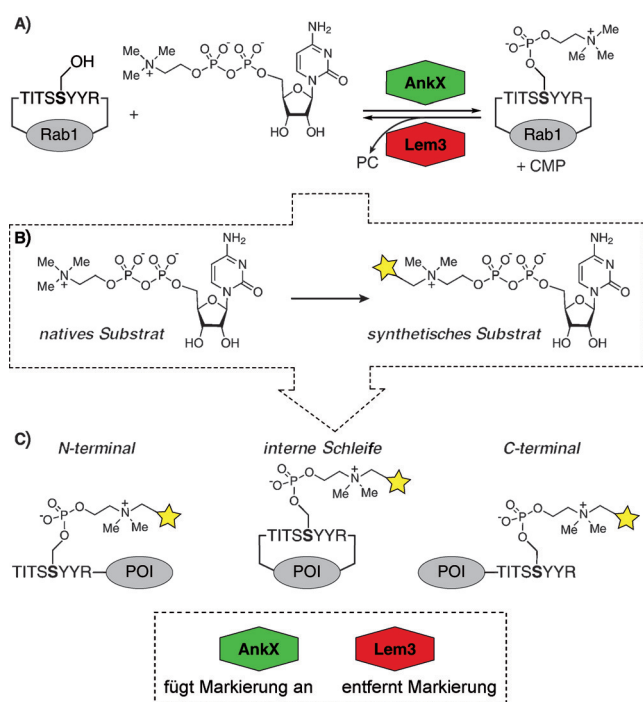
M.Sc. P. Ochtrup,^[†] M.Sc. M. F. Albers, Prof. Dr. C. Hedberg
Chemical Biology Center (KBC), Institute of Chemistry
Umeå University, 90187 Umeå (Schweden)
E-Mail: christian.hedberg@umu.se

Prof. Dr. C. Hedberg
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Department für chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

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

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt vom Schwerpunktprogramm (SPP 1623) und einem Sonderforschungsbereich (SFB 1035, Projekt B05) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie der Knut-und-Alice-Wallenberg-Stiftung (KAW 2013.0187), Schweden. M.F.A. dankt der Max-Planck-Gesellschaft für das Stipendium von der International Max Planck Research School (IMPRS). Wir danken Sascha Gentz, Dr. Matthias Müller (MPI Dortmund), Prof. Stephan Sieber, Prof. Johannes Buchner, Dr. Martin Haslbeck und Dr. Sabine Schneider (TU München) für wertvolle Diskussionen und Bereitstellung von Materialien.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502618> zu finden.



Schema 1. A) Protein-Phosphocholinierung und -Dephosphocholinierung durch die Legionellen-Enzyme AnkX und Lem3. B) Konzept von CDP-Cholin-Derivaten, die Markierungen an einer der Methylpositionen des quartärenamins tragen. C) Konzept von Proteinsubstraten (POI), die mit der Octapeptidkennungssequenz am N- und C-Terminus und an internen Schleifenregionen ausgestattet sind.

verhinderten die Phosphocholinierung vollständig. Die Octapeptidsequenz TITSSYYR stellt daher das minimale konservierte Erkennungsmotiv für eine effiziente Phosphocholinierung durch AnkX dar (Abbildung S2). Um zu untersuchen, ob das Erkennungsmotiv in Proteinen durch AnkX_{1–800} phosphocholinieren werden kann, haben wir die TITSSYYR-Octapeptidsequenz rekombinant an N- und C-Termini des Maltose bindenden Proteins (MBP) sowie an den kleinen Ubiquitin-ähnlichen Modifizierer (SUMO) angebracht und heterolog in *E. coli* exprimiert (Abbildung S3 und Hintergrundinformationen). Die Phosphocholinierung der Modellproteine (50 μ M) mit einer katalytischen Menge AnkX (1 μ M) in Gegenwart von 1 mM CDP-Cholin nach 24 h Inkubation wurde mittels ESI-MS analysiert (Abbildung S4). SUMO-Konstrukte (TITSSYYR-SUMO und SUMO-TITSSYYR) wurden gleichermaßen am N- und C-Terminus (Abbildung S4) phosphocholinieren, während das C-terminale MBP-Konstrukt eine schwächere Modifikation als das N-Terminale aufwies. Die Modifikation der AnkX-Substrate wurde zusätzlich in einem unabhängigen Experiment durch Western-Blotting mithilfe eines Anti-Phosphocholin-Antikörpers bestätigt (Abbildung 1A–C). Auch die Phosphocholinierung von MBP an seinem C-Terminus wurde detektiert. Die Phosphocholinierung kann daher in Modellproteine ortsspezifisch eingeführt werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Übertragung von Phosphocholin von der korrekten Peptidsequenz und der Akzeptoraminosäure abhängt (Abbildung 1A), da das SUMO-TITSSYYR-Konstrukt (dem das AnkX-adressierte Serin fehlt) nicht phosphocholinieren

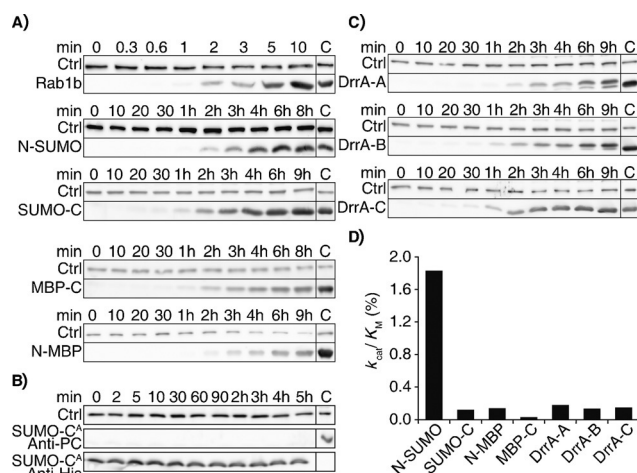


Abbildung 1. Phosphocholinierung von AnkX-Modellsubstraten. A) Rab1b_{3–174} und verschiedene Protein-Modellsubstrate (SUMO, MBP), die mit der Octapeptidkennungssequenz an N- und C-Termini ausgestattet sind, werden mittels Western Blotting gegen Phosphocholin überprüft (für die Analyse, siehe Abbildung S6). B) Negativkontrolle entsprechend Abbildung 1A mit SUMO-TITSSYYR. Anti-His₆-Blotting diente als Beladungskontrolle. C) Enzymatische Phosphocholinierung von DrrA_{340–533} an internen Schleifenregionen, die mit dem AnkX-Octapeptidkennungs-motiv erweitert wurden, wurden mittels Western Blotting gegen Phosphocholin analysiert. D) Katalytische Effizienzen (k_{cat}/K_M) der Phosphocholinierungsreaktion an verschiedenen Proteinsubstraten als Prozentsatz der entsprechenden Reaktion des nativen Substrats Rab1b_{3–174}. (Ctrl: Beladungskontrolle der individuellen Experimente mit His₆-MBP-PC-Rab1b_{3–174}; C: Intensität des quantitativ phosphocholinieren Proteins)

werden konnte (Abbildung 1B). Der Einbau von AnkX-Erkennungsmotiven in interne Schleifen von Zielproteinen könnte die Anwendung der Proteinmarkierung durch Phosphocholinierung maßgeblich erweitern. Daher haben wir die TITSSYYR-Octapeptidsequenz in die folgenden Positionen der GEF-Domäne des Enzyms DrrA (AS 340–533, DrrA_{340–533})^[9] eingefügt (Abbildung S3): 1) E₄₂₅-TITSSYYR-S₄₂₆ (DrrA-A), 2) T₄₅₅-TITSSYYR-P₄₅₆ (DrrA-B), 3) N₅₀₉-TITSSYYR-V₅₂₀ (DrrA-C).

Als nächstes haben wir die Phosphocholinierung dieser Proteine durch AnkX_{1–800} mittels Western-Blotting unter Verwendung des Anti-Phosphocholin-Antikörpers (Abbildung 1C) und ESI-MS (Abbildung S4) untersucht. Die erfolgreiche Phosphocholinierung von DrrA bestätigte die Anwendbarkeit oder Funktionalität des AnkX-Erkennungsmotives TITSSYYR zur Phosphocholinierung von internen Schleifenregionen. Die Enzymreaktion hält nicht auf einer Zwischenstufe, da durch verlängerte Reaktionszeiten eine vollständige Phosphocholinierung der SUMO-, MBP- und DrrA-Konstrukte erzielt werden konnte (Abbildung S4). Des Weiteren haben wir zeitabhängige Daten der Phosphocholinierungsreaktion durch quantitative Densitometrie der Western-Blots gewonnen und zum Vergleich der verschiedenen AnkX-Substrate (Abbildung 1D und Abbildung S5 und S6) die apparenten katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) berechnet. Erwartungsgemäß wurden die künstlichen Substrate (z. B. die peptidmodifizierten SUMO, MBP und DrrA) weniger schnell modifiziert als das native Rab1b-Proteinsubstrat, was der er-

höhten konformativen Flexibilität (z.B. SUMO, MBP) und/oder strukturellen Einschränkungen (z.B. in internen Schleifenregionen von DrrA) geschuldet sein könnte.

Die Entwicklung einer auf Phosphocholinierung basierten Proteinmarkierungsstrategie ist von der Synthese und Anwendbarkeit von CDP-Cholinderivaten abhängig, welche den Transfer einer Markierung zusammen mit der Phosphocholingrouppe ermöglichen. Die Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ im Komplex mit CDP-Cholin offenbart, dass die quartäre Ammoniumgruppe in einer tiefen, lösungsmittel exponierten Tasche positioniert ist.^[8] Dies legt nahe, dass Markierungen über ein flexibles hydrophiles Verbindungsmolekül an dieser Position verknüpft sein sollten (Abbildung S7). Daher haben wir synthetische CDP-Cholinderivate entwickelt, die über Polyethylenglykol (PEG) unterschiedlicher Länge mit Fluorescein verbunden sind (**1–5**, Abbildung 2A; Details zur Synthese zeigt Abbildung S7).^[10]

Als nächstes untersuchten wir qualitativ, ob die CDP-Cholinderivate **1–5** Substrate für AnkX sind (Abbildung 2B). Rab1b wurde als Akzeptor (50 μ M) genutzt und die Phosphocholinierung nach der Zugabe der CDP-Cholinderivate (1 mM) mit katalytischen Mengen AnkX₁₋₈₀₀ (0.5 μ M) mittels ESI-MS (Abbildung S8) und In-Gel-Fluoreszenz nach SDS-PAGE (Abbildung 2B) verfolgt. Zuerst testeten wir die Derivate **1–3**, wobei lediglich **1** und **2** von AnkX₁₋₈₀₀ übertragen wurden, nicht aber Derivat **3**, bei dem die Ammonium-/Aminfunktion durch ein Sauerstoff ersetzt wurde. Dies weist auf die Wichtigkeit der positiven Ladung für die Substraterkennung hin und stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Cholingruppe Salzbrücken mit E₂₂₆ und D₂₆₅ bildet und eine Kationen- π -Wechselwirkung mit F₁₀₇ von AnkX eingeht.^[8] Als nächstes konzentrierten wir uns auf die PEG-Gruppe, indem wir die Derivate **1**, **4** und **5** nutzten, bei denen schrittweise die PEG-Länge von 6 Einheiten auf lediglich 2 reduziert wurde. Überraschenderweise wurden die Derivate **1** (PEG₆) und **4** (PEG₄) mit ähnlicher Effizienz übertragen. Nur Derivat **5** (PEG₂), bei dem die PEG-Gruppe offensichtlich zu kurz ist, wurde nicht transferiert. Die Anbringung von PC-PEG_x-Fluorescein-Einheiten an Proteinsubstrate resultierte in einer deutlichen Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität und ermöglichte somit die Quantifizierung der fluoresceinmarkierten Proteinsubstrate mittels Gelsensitometrie der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Banden. Sowohl **1** als auch **4** wurde quantitativ auf Rab1b übertragen und somit eine vollständige Modifizierung von Proteinsubstraten durch AnkX-vermittelten Phosphocholintransfer erzielt. Das Nukleotid **2** ist ein ungünstigeres Substrat und modifiziert lediglich 50% des Proteins in 240 min. Wir erhielten ebenfalls apparente katalytische Effizienzen (k_{cat}/K_M) aus den zeitabhängigen Experimenten (Abbildung 2B,D). Dabei verhielt sich das Substrat **4** (PEG₄) besser als **1** (PEG₆), was darauf hinweist, dass eine weitere Optimierung der Länge und chemischen Eigenschaften des Verbindungsmoleküls zu einer zusätzlichen Verbesserung der Substrateigenschaften der CDP-Cholin-Derivate führen könnte.

Zusätzlich zu Rab1b untersuchten wir die Übertragung der CDP-Cholin-Derivate **1–2** und **4** auf das TITSSYYR-SUMO-Konstrukt mittels ESI-MS und In-Gel-Fluoreszenz (SDS-PAGE) (Abbildung 2C). Das mit Rab1b identische

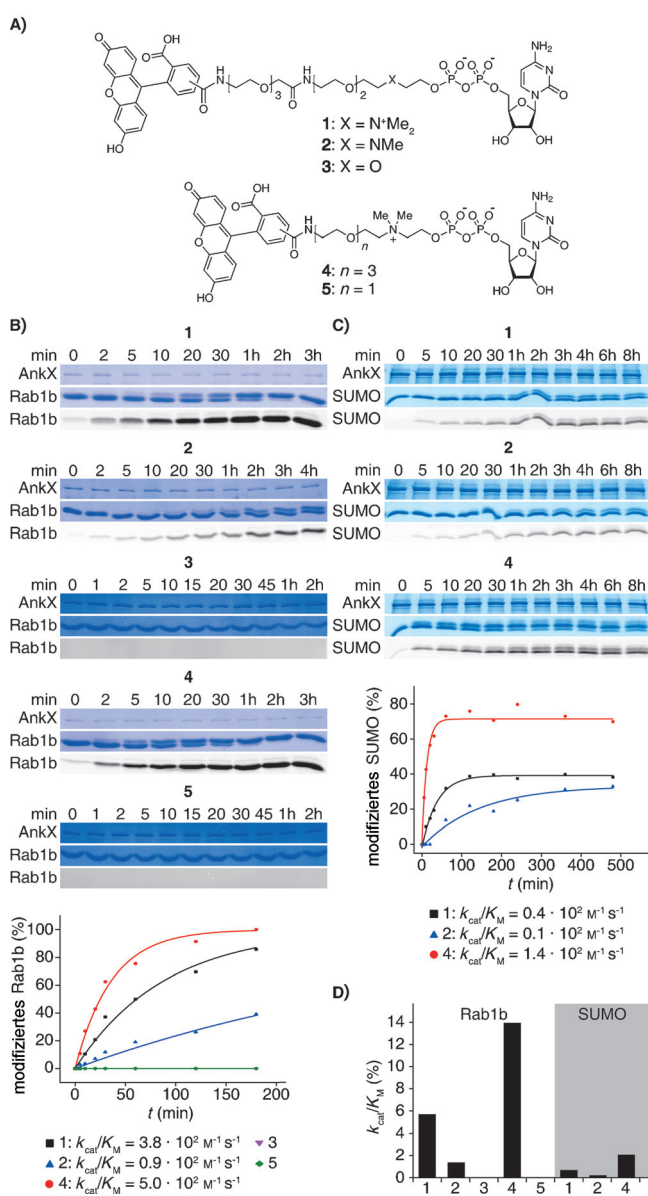


Abbildung 2. AnkX-katalysierte Modifizierung unter Nutzung von CDP-Cholin-Derivaten. A) Strukturen der synthetisierten CDP-Cholin-Derivate, die PEG-Fluorescein tragen und verschiedene funktionelle Gruppen enthalten (**1**: quartäres Amin, **2**: tertiäres Amin, **3**: Sauerstoff) oder die verschiedene PEG-Längen haben (**1**, **4**, **5**). Fluorescein-Markierung von Rab1b₃₋₁₇₄ (B) und TITSSYYR-SUMO (C) mit CDP-Cholin-Derivaten. Der Zeitverlauf der Phosphocholinierung wurde mittels In-Gel-Fluoreszenz von SDS-PAGE-Gelen verfolgt. Eine erfolgreiche Phosphocholinierung hängt von der Länge des Verbindungsmoleküls (**1**, **4**) und dem Vorliegen einer positiven Ladung an der Position des quartärenamins (**1**, **2**, **4**) ab. D) Katalytische Effizienzen der Modifizierungsreaktion mit den verschiedenen Nukleotidderivaten wurden als Prozente der nativen Reaktion aufgetragen.

Substratprofil bestätigte die ausschließliche Abhängigkeit der Modifizierung von der Anwesenheit der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR. Jedoch unterschied sich das Ausmaß der PC-PEG_x-Fluorescein-Anbringung an TITSSYYR-SUMO unter den Nukleotidsubstraten. Die Bandenverschiebung, die der Anlagerung von **1** entsprach, deutete

lediglich auf einen geringen Einbau in das Protein hin, wohingegen **4** ca. 70 % von TITSSYYR-SUMO in 180 min modifizierte (Abbildung 2 C). Dies ist nicht überraschend, da das natürliche AnkX-Substrat Rab1b ein effizienter Empfänger der Modifikation ist als die künstlich generierten Peptidsubstrate. Dennoch ermöglicht die Kombination von TITSSYYR-fusionierten Proteinen mit CDP-Cholin-Derivaten (z.B. **4**) eine effiziente Markierung durch AnkX auf einer angemessenen Zeitskala.

Abschließend untersuchten wir die Verwendung von Lem3 zur Entfernung funktioneller Phosphocholinderivate von modifizierten Zielproteinen sowie die Relevanz der Peptidsequenz für die Erkennung durch Lem3.^[7,11] Kinetische Analysen ergaben, dass Alaninsubstitutionen mit Ausnahme des ersten Threonins in der Octapeptidsequenz (TITSSYYR) die Lem3-Aktivität um 10–50 % beeinträchtigen (Abbildung S9). Wir unterzogen fluoreszierendes phosphocholinisiertes Rab1b_{3–174} und TITSSYYR-SUMO (modifiziert mit den Konstrukten **1**, **2** und **4**) einer Lem3-vermittelten Dephosphocholinierung. In-Gel-Fluoreszenz nach SDS-PAGE und Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von modifizierten gegenüber nicht modifizierten Proteinen (Abbildung 3 A,B) zeigten, dass Rab1b_{3–174} und TITSSYYR-SUMO effektiv durch Lem3 dephosphocholinisiert werden. Die interne Schleifenregion von Rab1b ist das scheinbar effizienteste Substrat für Lem3, dennoch reagiert TITSSYYR-SUMO auf einer vergleichbaren Zeitskala. Dies spiegelt sich

in ähnlichen katalytischen Effizienzen von Lem3 für die verschiedenen PC-PEG_x-Fluorescein-modifizierten Proteinsubstrate wider (Abbildung 3 A,B).

Zusammenfassend präsentieren wir eine Methode zur kovalenten enzymatischen Markierung und Demodifikation von Proteinen basierend auf einem kurzen Peptiderkennungsmotiv. Die Markierungsmethode kann auf N-terminale, C-terminale und in internen Schleifen befindliche Erkennungsmotive von lediglich 8 AS angewendet werden. Die Erkennungssequenz ist im Vergleich zu anderen Markierungstechniken, die eine N- oder C-terminale Anbringung von ganzen Proteindomänen erfordern (z.B. ACP^[4b] fluoreszierende Proteine,^[12] SNAP-tag,^[13] CLIP-tag^[14] usw.), klein und ermöglicht zusätzlich die Markierung von internen Schleifen. Die Methode ist kompatibel mit bekannten chemischen Markierungstechniken, da die Erkennungssequenz keine Cysteine oder anderen reaktiven AS enthält, und kann deshalb leicht für Doppelmarkierungsanwendungen genutzt werden. Durch die Möglichkeit, Markierungen durch Lem3-vermittelte Hydrolyse wieder abzuspalten, können Proteinproben zurückgewonnen und anschließend für andere Markierungsstrategien genutzt werden. In Anbetracht der Bedeutung von selektiven Proteinmarkierungsmethoden in den Biowissenschaften hat die enzymatische Phosphocholinierung das Potenzial, die Bandbreite von Markierungsstrategien in komplexen biologischen Systemen zu erhöhen.

Stichwörter: Enzyme · Nukleotide · Phosphocholinierung · Proteinmodifikationen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10327–10330
Angew. Chem. **2015**, *127*, 10467–10471

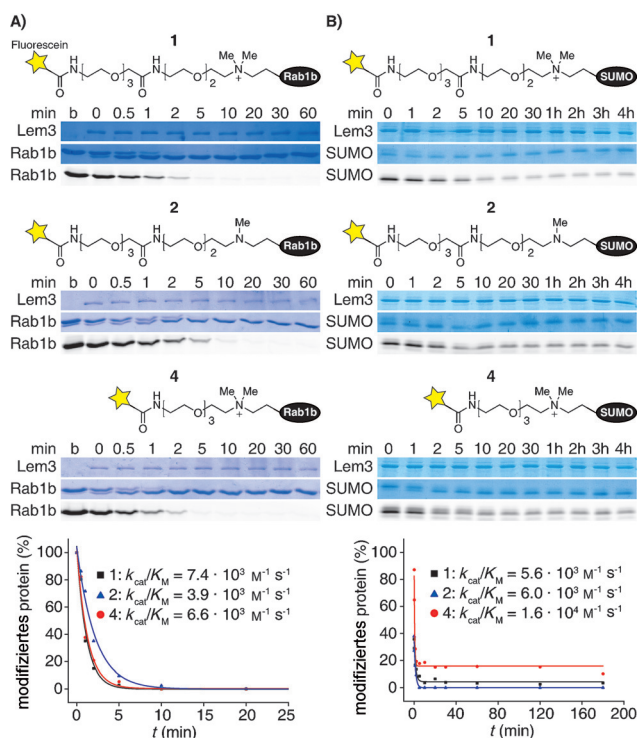


Abbildung 3. Enzymatische Dephosphocholinierung durch Lem3. Lem3-Dephosphocholinierung von Proteinsubstraten Rab1b_{3–174} (A) und TITSSYYR-SUMO (B), die präparativ mit Fluoresceinphosphocholinderivaten modifiziert wurden, wurden mittels In-Gel-Fluoreszenz (gelb) von SDS-PAGE-Gelen und Coomassie-Färbung (blau) analysiert. (gelber Stern: Fluorescein)

- [1] a) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605; b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133.
- [2] M. Rashidian, J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277–1294.
- [3] a) R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936; b) J. Yin, P. D. Straight, S. M. McLoughlin, Z. Zhou, A. J. Lin, D. E. Golan, N. L. Kelleher, R. Kolter, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15815–15820; c) Z. Zhou, P. Cironi, A. J. Lin, Y. Q. Xu, S. Hrvatin, D. E. Golan, P. A. Silver, C. T. Walsh, J. Yin, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 337–346; d) Z. Zhou, A. Koglin, Y. Wang, A. P. McMahon, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9925–9930.
- [4] a) J. Yin, A. J. Lin, D. E. Golan, C. T. Walsh, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 280–285; b) N. M. Kosa, R. W. Haushalter, A. R. Smith, M. D. Burkart, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 981–984.
- [5] N. M. Kosa, K. M. Pham, M. D. Burkart, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1179–1186.
- [6] a) S. Mukherjee, X. Y. Liu, K. Arasaki, J. McDonough, J. E. Galan, C. R. Roy, *Nature* **2011**, *477*, 103–106; b) C. A. Hardiman, C. R. Roy, *Mbio* **2014**, *5*, e01035-13; c) X. X. Pan, A. Lührmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce, C. R. Roy, *Science* **2008**, *320*, 1651–1654; d) M. P. Müller, H. Peters, J. Blümer, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, A. Itzen, *Science* **2010**, *329*, 946–949.
- [7] a) P. R. Goody, K. Heller, L. K. Oesterlin, M. P. Müller, A. Itzen, R. S. Goody, *EMBO J.* **2012**, *31*, 1774–1784; b) Y. H. Tan, R. J.

- Arnold, Z. Q. Luo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 21212–21217.
- [8] V. Campanacci, S. Mukherjee, C. R. Roy, J. Cherfils, *EMBO J.* **2013**, *32*, 1469–1477.
- [9] S. Schoebel, L. K. Oesterlin, W. Blankenfeldt, R. S. Goody, A. Itzen, *Mol. Cell* **2009**, *36*, 1060–1072.
- [10] a) C. M. Crane, J. Kaiser, N. L. Ramsden, S. Lauw, F. Rohdich, W. Eisenreich, W. N. Hunter, A. Bacher, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1069–1074; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1082–1087; b) J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649–658.
- [11] M. F. Albers, C. Hedberg, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2715–2719.
- [12] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905–909.
- [13] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *21*, 86–89.
- [14] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128–136.

Eingegangen am 21. März 2015

Online veröffentlicht am 3. Juli 2015