

Ein universeller Zugang zu Nucleobasen-modifizierten Aptameren

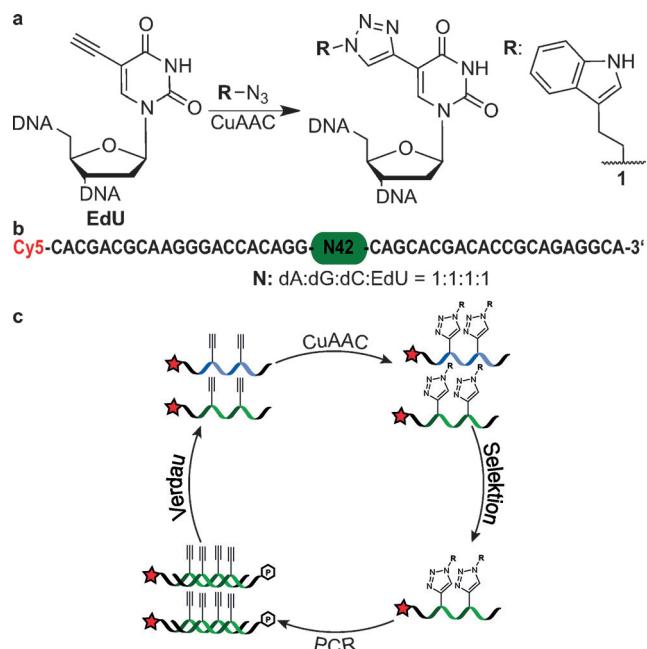
Fabian Tolle, Gerhard M. Brändle, Daniel Matzner und Günter Mayer*

Abstract: Wir beschreiben eine neue und vielseitige Methode, um die chemische Diversität von Nucleinsäurebibliotheken modular zu erweitern. Dies ermöglicht den Zugang zu Nucleobasen-modifizierten Aptameren mit einer bisher unerreicht hohen Affinität und Spezifität für ihre Zielstrukturen. Die Wiedereinführung der Modifikation nach der enzymatischen Replikation gewährt dabei einen eleganten Zugang zu einer Vielzahl von chemischen Gruppen. Die breite Anwendbarkeit, die sich nicht auf eine einzige Modifikation beschränkt, wird in Zukunft In-vitro-Selektionsprozesse rasant voranbringen und weitere Aptamere für viele bis dato nicht adressierbare Zielstrukturen generieren.

Aptamere sind vielversprechende Werkzeuge der Lebenswissenschaften sowie der biomedizinischen Forschung^[1] und finden sich dort in unzähligen Anwendungen wieder.^[2,3] Seit der ersten Beschreibung von SELEX-Experimenten im Jahre 1990^[4,5] konnten zahlreiche Aptamere für eine Fülle von Zielstrukturen selektiert werden, darunter kleine Moleküle^[6] und Proteine.^[7] Einige dieser Aptamere wurden intensiv untersucht und charakterisiert, um sie in neue diagnostische und therapeutische Anwendungen einzubinden.^[8,9] Allerdings limitiert die eingeschränkte chemische Vielfalt der natürlich vorkommenden kanonischen Nucleobasen gravierend die Erfolgsrate der SELEX-Experimente.^[10] Diese Hürde wird durch die chemische Modifizierung von Nucleinsäurebibliotheken für In-vitro-Selektionsprozesse überwunden.^[11–15] Dieser massive Schub an Funktionalität begünstigt nicht nur die Selektion von Aptameren, sondern ist ebenfalls von besonderem Interesse bei der Selektion von neuartigen Nucleinsäure-basierten Katalysatoren.^[16,17] Obwohl höchst erstrebenswert und von übergeordnetem Interesse, sind Methoden, die einen schnellen und modularen Zugang zu Nucleinsäurebibliotheken mit neuartigen chemischen Strukturen liefern und kompatibel mit den notwendigen enzymatischen Schritten von In-vitro-Selektionsexperimenten sind, bis jetzt nicht zugänglich.^[18,19] Bis heute werden chemische Strukturen zu meist während der enzymatischen Replikation eingeführt, wodurch die mühsame Synthese der benötigten Bausteine nötig ist und unter Umständen die Verfügbarkeit einiger gewünschter Modifikationen eingeschränkt wird.^[20]

Wir berichten hier von einer neuartigen Methode, für die wir den Begriff Click-SELEX vorschlagen, zur Generierung von modifizierten Nucleinsäurebibliotheken durch Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) bzw.

Click-Chemie).^[21,22] Als Erstes wird die Alkin-modifizierte DNA-Bibliothek hergestellt, indem man den kanonischen Thymidin Baustein durch C5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) ersetzt (Schema 1 a,b und Hintergrundinformationen Schema S1 a–c). Anschließend wird diese Bibliothek durch Click-Chemie mit einem organischen Azid (hier: 3-(2-Azidoethyl)indol **1**) weiter modifiziert (Schema 1 a) und man erhält die entsprechende Nucleobasen-modifizierte DNA-Bibliothek (Supplementary Schema 1 c). Diese Bibliothek wird nachfolgend einem In-vitro-Selektionsprozess unterzogen (Schema 1 c).



Schema 1. a) CuAAC-Modifizierung von EdU-haltigen DNA-Molekülen mit Aziden, z.B. Indolazid **1**. b) Schematische Darstellung des Bibliothekendesigns. Die an 42 Positionen randomisierte Region (N42, grün umkreist) beinhaltet gleich verteilte Nucleotide (dA, dG, dC und EdU gemischt 1:1:1:1) und ist flankiert von zwei Thymidin-freien Bindungsstellen für den 21nt-Primer und einem Fluoreszenzmarker (Cy5) am 5'-Ende. c) Schematische Darstellung des Click-SELEX-Prozesses. Die synthetische DNA-Bibliothek mit EdU wird mit einem organischen Azid modifiziert, z.B. **1** durch CuAAC. Nach Inkubation mit dem Zielmolekül und Entfernen von ungebundenen Sequenzen (Selektion) werden die gebundenen Sequenzen eluiert und mittels PCR, unter Verwendung von EdU-Triphosphat anstatt Thymidin, amplifiziert. Dieser Schritt entfernt die Modifikation im gebildeten Doppelstrang, und die Alkin-Funktion wird wieder eingeführt. Die Problematik der enzymatischen Inkompatibilität mit größeren Funktionalitäten der Nucleobasen wird dabei umgangen. Nach der PCR wird der erhaltene 5'-phosphorylierte Doppelstrang mit λ-Exonuclease zum Einzelstrang verdaut (Verdau). Die Modifikation wird wieder durch Click-Chemie (CuAAC) eingeführt, und die erhaltene Bibliothek ist nun Ausgangspunkt für den nächsten Selektionszyklus.

[*] F. Tolle, Dr. G. M. Brändle, D. Matzner, Prof. Dr. G. Mayer
Life and Medical Sciences Institute, Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
E-Mail: gmayer@uni-bonn.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201503652> zu finden.

Dem Prozessverlauf entsprechend wird die modifizierte DNA-Bibliothek mit dem gewünschten Zielmolekül (hier: Cycle-3-GFP, C3-GFP)^[23] inkubiert, welches auf Co^{2+} -haltigen magnetischen Beads durch einen N-terminalen $6 \times$ His-tag-Anteil immobilisiert wird (Schema S1 d). C3-GFP wurde aufgrund seiner grundlegenden Rolle in vielen wissenschaftlichen Anwendungen als Zielstruktur gewählt. Überdies ermöglichen seine Fluoreszenzeigenschaften die direkte Beobachtung seiner Bindung an die Affinitätsmatrix. Nach unserem Wissen werden in der Literatur nur RNA-^[24] jedoch keine DNA-Aptamere^[25] für GFP beschrieben. Nach der Inkubation werden ungebundene Moleküle durch Waschschritte entfernt und verworfen, wobei das Zielprotein mit den gebundenen modifizierten Nucleinbasen durch die Zugabe von Imidazol eluiert wird. Die eluierten Moleküle werden durch PCR-Amplifikation mit C5-Ethynyl-2'-deoxyuridintriphosphat anstatt Thymidin vervielfältigt. Nach erfolgter Amplifikation wird der Antisense-Strang mit λ -Exonuclease verdaut (Abbildung S1 b), welche selektiv die 5'-phosphorylierte Doppelstrang-DNA erkennt (eingeführt durch den reversen Primer) und hydrolysiert.^[26] Die verbliebene Alkin-modifizierte Einzelstrang-DNA wird wieder mit **1** zur Reaktion gebracht, wodurch die Einführung der Indol-Funktion und die Wiederherstellung der Start-Bibliothek für den nächsten Selektionszyklus gewährleistet wird. Nach unserem Kenntnisstand ist dies das erste Beispiel, in dem die Funktionalitäten der Nucleobasen *in situ* nach der enzymatischen Replikation der DNA eingeführt werden. Somit ist ein breiter Zugang zu chemischen Funktionalitäten gegeben, und gleichzeitig wird die Problematik einer enzymatischen Inkompatibilität in Verbindung mit größeren Funktionalitäten der Nucleobasen erfolgreich umgangen.

Nach 15 Selektionszyklen (Abbildung S1 e) haben wir mit der angereicherten fluoreszenzmarkierten (Fluorophor: 5'-Cy5) DNA-Bibliothek eine Wechselwirkungsanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.^[27,28] Dieser Assay, bei welchem die gebundene Menge Cy5-markierter DNA gemessen wird, ist mit den verwendeten C3-GFP-derivatisierten magnetischen Beads kompatibel, die während des Selektionszyklus eingesetzt wurden. Dieses Experiment zeigte eindeutig, dass eine Bibliothek mit erhöhter Bindungsaffinität zu C3-GFP erhalten wurde (Abbildung 1 a). Die Wechselwirkung der angereicherten Bibliothek basiert hierbei auf der strikten Notwendigkeit von eingelagerten Indolgruppen. Die nicht modifizierte angereicherte Bibliothek sowie die Start-Bibliothek, unabhängig von den eingeführten Modifikationen, wies keinerlei Affinität zu C3-GFP auf (Abbildung 1 a,b).

Im Anschluss klonierten und sequenzierten wir die DNA-Bibliothek von Selektionszyklus 15. Dabei wurden 36 Klone erhalten (Abbildung 2 a und Abbildung S2 a), in der eine Sequenzfamilie in der Bibliothek dominiert (Abbildung 2 a). Wir untersuchten das Bindungsverhalten von C12-1, einem Vertreter der am häufigsten auftretenden Familie, an C3-GFP mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 2 b). Als essentielle Kontrolle wurde eine „scrambled“ Variante von C12 (C12sc-1) verwendet, welche die gleiche Zusammensetzung von Nucleotiden wie C12 aufweist, jedoch in vertauschter Reihenfolge. Bei C12sc-1 konnte keine Wechselwirkung mit C3-

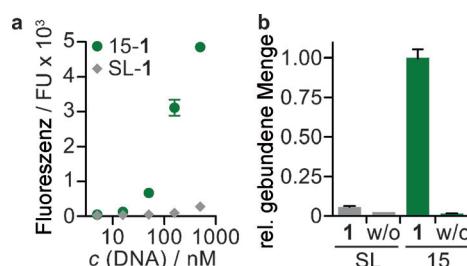


Abbildung 1. a) Anreicherung der Bibliothek. Nach 15 SELEX-Zyklen wurden die angereicherte Bibliothek (15-1) und die Start-Bibliothek (SL-1), jeweils mit **1** modifiziert und auf ihre Bindungsaffinität für C3-GFP mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Konzentration der DNA ist gegen die mittlere Fluoreszenzintensität aufgetragen. b) Die Wechselwirkung der angereicherten DNA (15, grüner Balken) ist abhängig von der Modifizierung mit **1**. Die angereicherte Bibliothek (15) bzw. die Start-Bibliothek (SL) (500 nm) wurde mit C3-GFP-Beads inkubiert, entweder in unmodifizierter Form (w/o) mit Alkin-Funktionalitäten oder modifiziert mit Indolazid (**1**). Die mittlere Fluoreszenzintensität der gebundenen Nucleinsäurebibliotheken wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen und auf den erhaltenen Wert von 15-1 normiert.

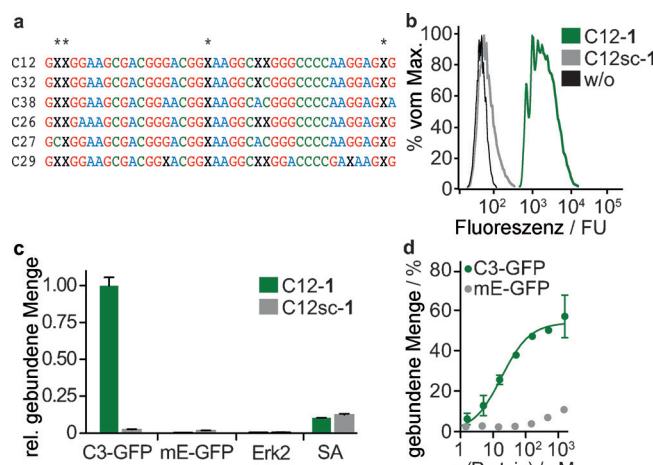


Abbildung 2. a) Klonierungs- und Sequenzierungsergebnisse der nach 15 Selektionszyklen erhaltenen DNA-Bibliothek. Eine dominante Familie (C12-Familie) konnte identifiziert werden (siehe Abbildung S2 a). Konservierte Positionen der EdU-Modifikation sind mit einem Sternchen versehen. b) Bindungsanalyse des Mono-Klons C12 an C3-GFP mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt ist die Menge gebundener, Cy5-markierter DNA (500 nm) an C3-GFP-derivatisierten Beads und Beads in Abwesenheit von DNA (schwarze Kurve). C12-1 (grüne Kurve) bindet an C3-GFP im Gegensatz zur scrambled Variante C12sc-1 (graue Kurve). c) Spezifitätsmessungen von C12-1 (grüne Balken). Gezeigt ist die Menge gebundener Cy5-markierter DNA (500 nm) an unterschiedlich proteinhaltigen Beads Durchflusszytometrie. Die Werte wurden normiert in Bezug auf C12-1 gebunden an C3-GFP. C12-1 zeigt keine Affinität zu mE-GFP, Erk2 und Streptavidin (SA). C12sc-1 (graue Balken) wechselwirkt mit keinem der untersuchten Proteine. d) Filterretentionsanalyse von C12-1 in Anwesenheit von C3-GFP und mE-GFP in Lösung. Für C3-GFP (grüne Kurve) konnte eine Dissoziationskonstante (K_D) von 18.4 ± 3.1 nm bestimmt werden.

GFP beobachtet werden (Abbildung 2 b). Wir haben ebenfalls andere Varianten der C12-Familie auf ihre C3-GFP-Bindungsfähigkeit getestet. Dabei wiesen die Sequenzen C32-

1 und C38-**1** vergleichbare Affinitäten wie C12-**1** mit C3-GFP auf (Abbildung S2b). Die restlichen Klone zeigten keine Bindungsaffinität zu C3-GFP (Abbildung S2b).

Um eine detaillierte Analyse der Zielstruktur-Spezifität von C12-**1** durchzuführen, wurden Streptavidin, die mitogen aktivierte Proteinkinase ERK2 und ein eng verwandtes C3-GFP Protein, das mE-GFP, verwendet.^[29] C3-GFP und mE-GFP unterscheiden sich ausschließlich in neun Punktmutationen (Abbildung S2c,d), von denen sieben außerhalb der Fassstruktur positioniert sind (Abbildung S2d).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten, dass C12-**1** mit keinem der genannten Proteine wechselwirkt, obwohl Konzentrationen verwendet wurden, die das 25-fache des bestimmten K_D -Wertes betragen. Dies unterstreicht eindrucksvoll die bemerkenswerte Spezifität von C12 (Abbildung 2c, grüne Balken). Die scrambled Variante C12sc-**1** zeigte erwartungsgemäß keine Bindungsaffinität zu den getesteten Proteinen (Abbildung 2c, graue Balken). Durchgeführte Filterretentionsanalysen mit radioaktiv markierten Molekülen führten zu der Erkenntnis, dass C12-**1** in der Lage ist, C3-GFP in Lösung zu binden, wobei dies unabhängig von der 5'-Cy5-Modifikation und mit einer Dissoziationskonstante (K_D -Wert) von 18.4 ± 3.1 nm geschieht (Abbildung 2d).

Daraufhin prüften wir die Struktur-Affinitäts-Beziehung von C12 zu C3-GFP unter Veränderung der Modifizierungen der Nucleobasen. Für dieses Vorhaben wurde eine Auswahl an Aziden (Abbildung 3, Einschub) synthetisiert, um 1-

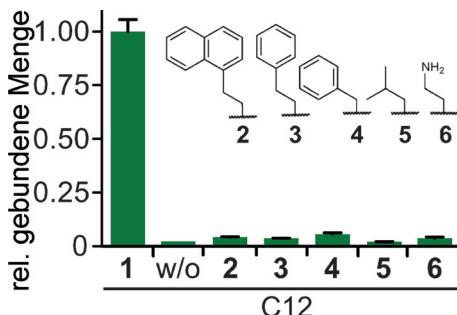


Abbildung 3. Auswirkung der verschiedenen C12-Funktionalitäten auf ihr Bindungsverhalten an C3-GFP. Gezeigt ist die mittels Durchflusszytometrie untersuchte Menge gebundener Cy5-markierter C12-DNA (500 nM) an C3-GFP-derivatisierte Beads. C12 wurde nicht modifiziert (w/o) oder nach CuAAC-Modifizierung mit 3-Ethylindol- (1), 1-Ethyl-naphthalin- (2), Phenethyl- (3), Benzyl- (4), Isobutyl- (5) oder Ethylamin-Gruppen (6) untersucht. Die Werte wurden auf das Indol-modifizierte C12-**1** gebunden an C3-GFP normiert.

Ethynaphthalin- (2), Phenethyl- (3), Benzyl- (4), Isobutyl- (5) oder Ethylamin-Gruppen (6) durch CuAAC einführen zu können. Wir synthetisierten C12-Derivate, die mit den chemischen Gruppen 2-6 (Abbildung 3 und Abbildung S3) anstatt der Indolgruppe **1** modifiziert wurden, und untersuchten ihr Bindungsverhalten an C3-GFP. Es ist hervorzuheben, dass nur die Indol-modifizierte C12-Spezies ihre hohe Bindungsaffinität zu C3-GFP behielt (Abbildung 3), während die sonstigen Funktionalitäten keine Bindung aufwiesen. Dieses Ergebnis bestätigt eindeutig die Abhängigkeit von C12 von

der eingeführten chemischen Gruppe. Selbst sehr ähnliche aromatische Gruppen wie **2**, **3** und **4** können **1** nicht adäquat ersetzen, um die Bindungseigenschaften von C12 zu reproduzieren. Dementsprechend ist C12-**1** ein DNA-Aptamer mit modifizierten Nucleobasen für C3-GFP. Da die essentielle Indolgruppe durch Click-Chemie eingeführt wurde, schlagen wir für diese Art von modifizierten Aptameren die Bezeichnung „Clickmere“ vor.

Ausgehend von In-silico-Vorhersagen schlagen wir die in Abbildung 4a gezeigte Sekundärstruktur als Modell für die

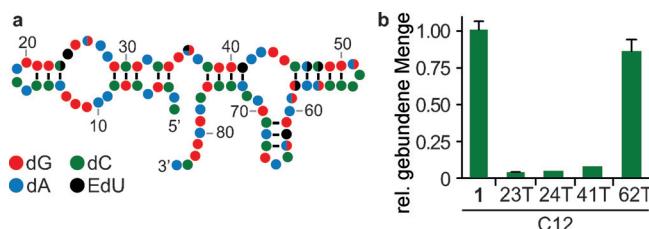


Abbildung 4. a) In silico vorhergesagtes Modell für die Sekundärstruktur der Aptamere der C12-Familie. b) Der Austausch des konservierten EdU an Positionen 23, 24 und 41 durch Thymidin führt zu einem Verlust der Bindungsaffinität. Die Einführung von Thymidin an Position 62 hatte keine Auswirkung auf die Bindungseigenschaften von C12-**1** an C3-GFP. Gezeigt ist die mittels Durchflusszytometrie untersuchte Menge an gebundenem Cy5-markierten und Indol-modifiziertem C12-**1** sowie dessen punktmutierten Varianten (500 nm) an C3-GFP-derivatisierten Beads. Die Werte wurden auf das an C3-GFP gebundene und ausschließlich Indol-modifizierte C12-**1** normiert.

C12-Familie vor. Allerdings sind weitere Untersuchungsmethoden wie z.B. Röntgenkristallographie und/oder NMR-Spektroskopie nötig, um die tatsächlich vorliegende Struktur aufzuklären. Die Sequenzanalyse ergab, dass EdU an den Positionen 23, 24, 41 und 62 hoch konserviert vorliegt, während die Positionen 47 und 48, bei einigen bindenden Klonen der C12-Familie, zu kanonischen Nucleotiden mutiert sind (Abbildung 2a). Daher synthetisierten wir punktmutierte Varianten von C12-**1** mit Thymidin an Position 23 (T23), 24 (T24), 41 (T41) oder 62 (T62) und untersuchten deren Bindungsverhalten an C3-GFP. Interessanterweise kristallisierten sich die Positionen 23, 24 und 41 als unverzichtbar für das Bindungsverhalten von C12 heraus, da die entsprechenden Thymidin-Varianten einen kompletten Verlust der Bindungsaffinität zu C3-GFP aufwiesen (Abbildung 4b). Dagegen konnte mit Thymidin an Position 62 kein negativer Effekt auf die Bindungseigenschaften von C12 an C3-GFP beobachtet werden (Abbildung 4b), somit ist eine Indol-Modifikation an dieser Stelle nicht zwingend notwendig.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Verwendung von Click-Chemie, zur Generierung von DNA-Bibliotheken mit modifizierten Nucleobasen, den Zugang zu einer neuartigen Klasse modifizierter Aptamere, den „Clickmeren“, ermöglicht. Unsere Methode ist zudem vollständig kompatibel mit den allgemeinen Schritten etablierter In-vitro-Selektionsprozesse und erwies sich als leistungsfähiges Werkzeug bei der Selektion eines Aptamers mit hoher Bindungsaffinität und -spezifität für C3-GFP. DNA-Aptamere mit einer hohen Bindungsspezifität zu GFP besitzen ein

vielversprechendes Potential, um in diversen Anwendungen der Lebenswissenschaften, wie z.B. der Expansionsmikroskopie, genutzt zu werden.^[30] Die skizzierte Methode beschränkt sich außerdem nicht auf eine einzige funktionelle Gruppe, sondern ermöglicht die schnelle Einführung diverser chemischer Funktionen. Dadurch ebnet diese Methode den Weg zu einer Vielzahl neuartiger „Clickmere“ und Nucleinsäure-basierten Katalysatoren mit spezifischen Bindungseigenschaften. Wissenschaftlern wird hiermit ein Zugang verschafft, Aptamere für Moleküle und Epitope zu selektieren, die bisher nicht durch klassische In-vitro-Selektionsprozesse zugänglich waren.^[10,31] Das beschriebene Click-SELEX-Verfahren erlaubt außerdem die Herstellung von modifizierten Aptameren mit bisher nicht zugänglichen chemischen Gruppen, wie z.B. sehr großen oder labile Gruppen, die im Allgemeinen nicht kompatibel mit den Bedingungen der Festphasen- oder enzymatischen DNA-Synthese sind. Es sei darauf hingewiesen, dass trotz der In-situ-Einführung der Modifikation die Polymerase den modifizierten Einzelstrang als Templat im ersten Amplifikationszyklus verwenden muss. Es ist dementsprechend anzunehmen, dass große Modifikationen die enzymatische Replikation hemmen können. Wir schlagen deswegen eine Strategie mit lichtspaltbaren Linkern vor.^[32] Eine lichtempfindliche Gruppe, z.B. *o*-Nitrophenethyl (NPE), könnte zwischen der Azid- und der gewünschten Modifikation positioniert werden, um vor der enzymatischen Replikation, durch Abspaltung, die vollständige Kompatibilität mit unserer Methode zu konservieren. Zukünftig soll die vorgestellte Methode mit weiteren Click-Reaktionen, wie der Norbornen- und Tetrazin-Ligation, erweitert werden,^[33] um eine orthogonale Einführung vieler Modifikationen zu erreichen. Die Methode könnte ebenfalls mit anderen Nucleinsäure-Derivaten wie nativer und 2'-modifizierter RNA,^[34] verbrückten Nucleinsäuren^[35] oder weiteren Xenonucleinsäuren^[12] kombiniert werden. Die skizzierte Methode beruht weder auf komplizierten organischen Synthesen noch auf spezialisierten Instrumenten und kann dadurch leicht von der stets wachsenden Zahl von Wissenschaftlern, die Aptamere in den Lebens- und biomedizinischen Wissenschaften anwenden möchten, verwendet werden. Damit wird der allgemeinen Forderung nach maßgeschneiderten Aptameren als hochentwickelte Erkennungswerkzeuge^[36] und Katalysatoren Folge geleistet.^[37,38]

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Ma 3442/4-1 an G.M.) finanziell unterstützt. Wir danken Volkmar Fieberg für die Bereitstellung des mE-GFP.

Stichwörter: Aptamere · GFP · Molekulare Evolution · Nucleinsäuren · SELEX

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10971–10974
Angew. Chem. **2015**, *127*, 11121–11125

- [1] G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710–2727.
- [2] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 537–550.
- [3] E. J. Cho, J.-W. Lee, A. D. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 241–264.
- [4] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [5] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [6] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850–852.
- [7] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- [8] J. Müller, T. Becher, J. Braunstein, P. Berdel, S. Gravius, F. Rohrbach, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Pötzsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6075–6078; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6199–6202.
- [9] M. J. Tolentino, A. Dennrick, E. John, M. S. Tolentino, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2015**, *24*, 183–199.
- [10] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, C. Bock, A. Bock, E. N. Brody, J. Carter, A. B. Dalby, B. E. Eaton, T. Fitzwater, et al., *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15004.
- [11] M. Kimoto, R. Yamashige, K.-I. Matsunaga, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 453–457.
- [12] V. B. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, S.-Y. Peak-Chew, S. H. McLaughlin, et al., *Science* **2012**, *336*, 341–344.
- [13] J. D. Vaught, C. Bock, J. Carter, T. Fitzwater, M. Otis, D. Schneider, J. Rolando, S. Waugh, S. K. Wilcox, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4141–4151.
- [14] K. Sefah, Z. Yang, K. M. Bradley, S. Hoshika, E. Jiménez, L. Zhang, G. Zhu, S. Shanker, F. Yu, D. Turek, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454.
- [15] F. Tolle, G. Mayer, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 60–67.
- [16] D. M. Perrin, T. Garestier, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1556–1563.
- [17] S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180–7201; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7336–7359.
- [18] M. Renders, E. Miller, M. Hollenstein, D. Perrin, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1360–1362.
- [19] A. Bugaut, J.-J. Toulme, B. Rayner, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4082–4088.
- [20] K. Sakthivel, C. Barbas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2872–2875; *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2998–3002.
- [21] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487.
- [22] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388.
- [23] A. Crameri, E. A. Whitehorn, E. Tate, W. P. Stemmer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 315–319.
- [24] B. Shui, A. Ozer, W. Zipfel, N. Sahu, A. Singh, J. T. Lis, H. Shi, M. I. Kotlikoff, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e39.
- [25] K. K. Stanlis, J. R. McIntosh, *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 797–808.
- [26] M. J. Kujau, S. Wölfl, *Mol. Biotechnol.* **1997**, *7*, 333–335.
- [27] V. M. Tesmer, S. Lennarz, G. Mayer, J. J. G. Tesmer, *Structure* **2012**, *20*, 1300–1309.
- [28] M.-S. L. Raddatz, A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5190–5193; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5268–5271.
- [29] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [30] F. Chen, P. W. Tillberg, E. S. Boyden, *Science* **2015**, *347*, 543–548.
- [31] M. Hollenstein, C. Hipolito, C. Lam, D. Dietrich, D. M. Perrin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4346–4350; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4418–4422.
- [32] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.

[33] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.

[34] J. D. Vaught, T. Dewey, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11231–11237.

[35] A. S. Jørgensen, P. Gupta, J. Wengel, I. K. Astakhova, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10751–10753.

[36] A. A. Bastian, A. Marcozzi, A. Herrmann, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 789–793.

[37] A. I. Taylor, V. B. Pinheiro, M. J. Smola, A. S. Morgunov, S. Peak-Chew, C. Cozens, K. M. Weeks, P. Herdewijn, P. Holliger, *Nature* **2015**, *518*, 427–430.

[38] S. K. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1369–1379.

Eingegangen am 21. April 2015,
veränderte Fassung am 26. Mai 2015
Online veröffentlicht am 23. Juli 2015