

Vielseitige, effiziente und ortsspezifische Proteinfunktionalisierung durch das Enzym Tubulin-Tyrosin-Ligase

Dominik Schumacher, Jonas Helma, Florian A. Mann, Garwin Pichler, Francesco Natale, Eberhard Krause, M. Cristina Cardoso, Christian P. R. Hackenberger und Heinrich Leonhardt**

Abstract: Mit dem so genannten „Tub-tag labeling“ haben wir eine neue chemoenzymatische Methode entwickelt, welche die einfache und schnelle ortsspezifische Modifikation von Proteinen erlaubt. Durch die Uminterpretation rekombinanter Tubulin-Tyrosin-Ligase können verschiedene nichtnatürliche und bioorthogonal reaktive Tyrosinderivate in Proteine eingebaut werden, welche mit einer kurzen, vom Tubulin abgeleiteten Peptidsequenz (Tub-tag) ausgestattet sind. Wie anhand der ortsspezifischen Modifikation von Nanobodies, GFP und Ubiquitin gezeigt, ermöglicht diese neuartige Strategie eine Reihe effizienter, schneller und chemoselektiver Modifikationen am C-Terminus von sowohl isolierten Proteinen als auch solchen in komplexen Zellsäften. Somit ergeben sich vielseitige Anwendungen im Bereich der Biochemie, der Zellbiologie und darüber hinaus.

Die ortsspezifische Funktionalisierung von Proteinen ist essentiell für viele Anwendungen innerhalb der Lebenswissenschaften. Fluoreszente Proteine und „self-labeling“-Strategien wie SNAP^[1] und HALO-tagging^[2] sind für Zellbiologen unabdingbare Werkzeuge geworden, um den Ort und die intrazelluläre Aktivität von Proteinen zu bestimmen. Die genetische Fusionierung von GFP oder „self-labeling“ Protein-Tags ist technologisch zwar sehr einfach umzusetzen, die Größe sowie die globalen Eigenschaften dieser Erkennungssequenzen können allerdings die Funktion und somit die Anwendung des chimären Proteins stark beeinflussen.^[3] Trans-Proteinspleißen, die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL) sowie Amber-Suppression und auxotrophe Expression in Kombination mit bioorthogo-

naler Chemie sind wichtige Techniken, die den Einbau kleiner reaktiver Anker und Modifikationen in die Proteinsequenz erlauben.^[4] Geringe Expressionsausbeuten dieser genetisch kodierenden Systeme^[5] und eine beeinträchtigte Proteinfaltung bei Trans-Spleißen sowie EPL^[6] können entscheidende Faktoren sein, welche eine uneingeschränkte Anwendung dieser Techniken limitieren. Als Alternative zu besagten Techniken finden chemoenzymatische Ansätze mittels verschiedener Enzyme wie Trypsin,^[7] Sortase A,^[8] Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase),^[9] Biotin-Ligase,^[10] Liponsäure-Ligase^[11], AnkX^[12] und dem Formyl-glycin-generierenden Enzym^[13] zunehmende Aufmerksamkeit für die chemoselektive und ortsspezifische Adressierbarkeit von Proteinen mittels kurzer Erkennungs-Tags. Einige dieser chemoenzymatischen Ansätze haben jedoch mit Einschränkungen zu kämpfen, wie z. B. großen, hydrophoben Substraten, welche das zu modifizierende Protein beeinflussen könnten.^[14] Zusätzlich erfordert die Reversibilität mancher enzymatischer Reaktionen und die mögliche Produkt-hydrolyse ausgiebige Weiterentwicklungen einiger Enzyme sowie den Einsatz eines großen Überschusses an Katalysator und Substrat.^[7,14,15]

Hier präsentieren wir eine neuartige und schnelle Methode zur ortsspezifischen Funktionalisierung von Proteinen, welche die Vorteile von kleinen, nichtnatürlichen Aminosäuren als bioorthogonale Anker mit denen von chemoenzymatischen Modifikationen verbindet. Die „Tub-tag labeling“ genannte Technik basiert auf dem enzymatischen Einbau von synthetisch leicht zugänglichen, kleinen Tyrosinderivaten an den C-Terminus einer hydrophilen, 14 Aminosäuren langen Erkennungssequenz (Tub-tag) durch die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL, Abbildung 1a). In der Natur katalysiert TTL den posttranslationalen Einbau von Tyrosin an den C-Terminus des an der Regulation der Mikrotubuli-Homöostase beteiligten α -Tubulin.^[16] Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass TTL auch Tyrosinderivate als Substrate für die C-terminale Modifikation von Tubulin akzeptiert.^[17]

Zu Beginn unserer Forschung testeten wir, ob rekombinante TTL nichtnatürliche Tyrosinderivate in ein isoliertes, dem C-Terminus von Tubulin entsprechendes Tub-tag-Peptid einbauen kann. Für diese ersten Experimente nutzten wir die Substrate 3-N₃-L-Tyrosin (**1**) und 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**) sowie das mittels Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) hergestellte 5,6-Carboxyfluorescein-Tub-tag-Peptid (CF-Tub-tag). Der Fortschritt der enzymatischen Reaktion wurde mittels isokratischer HPLC analysiert (Abbildung 1b für **1**, Abbildung 1c für **2** sowie Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen (SI)). Nach 120-minütiger

[*] D. Schumacher,^[+] F. A. Mann, Dr. E. Krause, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Chemische Biologie, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie Berlin (Deutschland)
E-Mail: hackenbe@fmp-berlin.de

Dr. J. Helma,^[+] Dr. G. Pichler, Prof. Dr. H. Leonhardt
Department Biologie II, Ludwig Maximilians Universität München und Center for Integrated Protein Science Munich Martinsried (Deutschland)
E-Mail: h.leonhardt@lmu.de

Dr. F. Natale, Prof. Dr. M. C. Cardoso
Department Biologie, Technische Universität Darmstadt Darmstadt (Deutschland)

D. Schumacher,^[+] F. A. Mann, Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger
Department für Chemie, Humboldt Universität zu Berlin Berlin (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505456> zu finden.

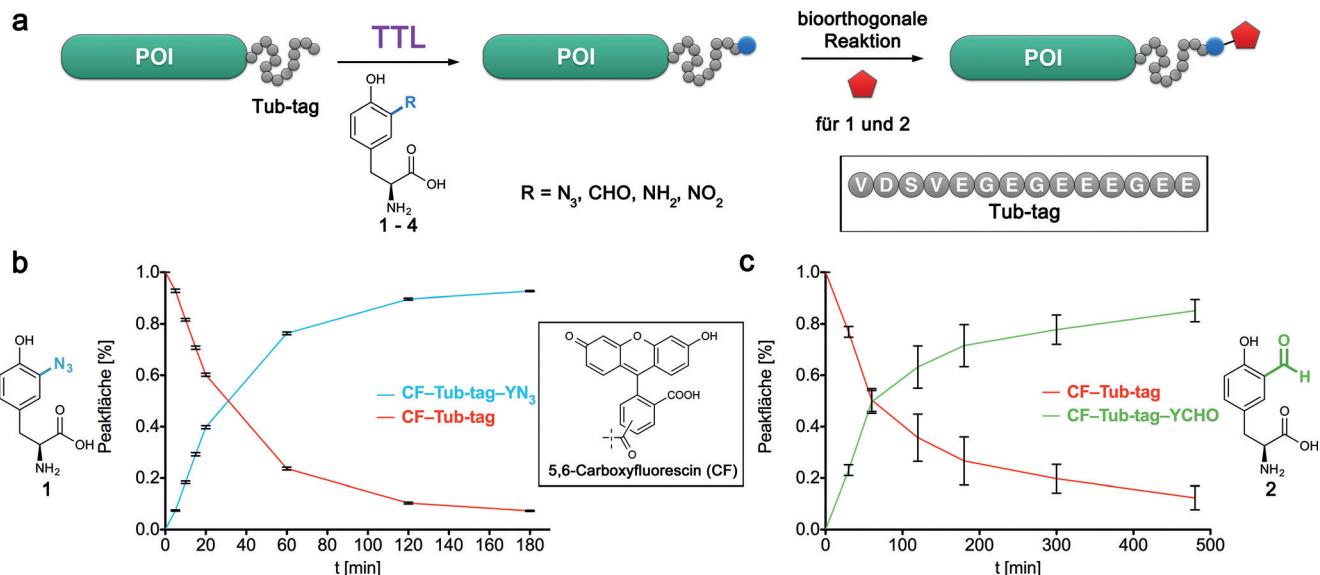


Abbildung 1. Tub-tag labeling an Proteinen. a) Gezeigt ist die chemoenzymatische Funktionalisierung von Proteinen durch den Einsatz von Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL). Nichtnatürliche Derivate des Tyrosins werden an den C-Terminus einer kurzen Erkennungssequenz (Tub-tag) ligiert und dienen als bioorthogonale Anker für die ortsspezifische chemische Funktionalisierung eines beliebigen Proteins (POI). b,c) Verknüpfung von b) 3-N₃-L-Tyrosin (**1**) und c) 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**) an den C-Terminus des Carboxyfluorescein-Peptids CF-Tub-tag. Fluoreszenz-HPLC-Chromatogramme der TTL-katalysierten Reaktion wurden zu definierten Zeitpunkten aufgenommen. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktmenge erfolgte durch die Integration der Elutionspeaks im Fluoreszenzchromatogramm (Abbildung S1 in den SI). Die rote Linie repräsentiert die Abnahme des CF-Tub-tag-Peptids, die blaue bzw. grüne Linie die Bildung der am C-Terminus funktionalisierten Peptide CF-Tub-tagYN₃/CHO. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) dreier unabhängiger Reaktionen.

Inkubation (TTL:Peptid 1:200) bei 37°C konnte ein Umsatz von 90 % mit **1** sowie von 63 % mit **2** erzielt werden. Die höhere Anfangsgeschwindigkeit von Azid **1** gegenüber Aldehyd **2** resultiert in einer ca. 2.6-fach schnelleren Bildung des Ligationsprodukts. Eine verlängerte Reaktionszeit führt jedoch auch im Falle von Aldehyd **2** zu vergleichbaren Ausbeuten an funktionalisiertem Peptid und verdeutlicht somit die hohe Substratkompatibilität der TTL.

Durch die erfolgreiche Ligation von **1** und **2** an das isolierte Peptid ermutigt, untersuchten wir ferner, ob die Tub-tag-labeling-Strategie auch für die ortsspezifische Modifikation von intakten Proteinen eingesetzt werden kann, und ob das benötigte C-terminale Erkennungsmotiv einen negativen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Hierzu fokussierten wir uns zunächst auf die Funktionalisierung von Einzeldomänenantikörpern (Nanobodies, gewonnen aus Kamelen),^[18] welche als analytische Werkzeuge sowohl in der Biochemie als auch für die intrazelluläre Erkennung und Manipulation von Antigenen eingesetzt werden.^[19] Da diese Antigen-bindenden Proteine aufgrund ihrer geringen Größe von nur 15 kDa ausgezeichnete Eigenschaften für den Einsatz in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie haben,^[20] war es unser erklärtes Ziel, Tub-tag labeling für die ortsspezifische Funktionalisierung von Nanobodies mit definiert einem Fluorophormolekül zu nutzen.

Für eine Proof-of-Concept-Studie klonierten wir die Tub-tag-Sequenz an den C-Terminus eines GFP-spezifischen Nanobodies (GBP4)^[21] und inkubierten diesen 24 h mit 0.2 Äquiv. TTL sowie mit einem Überschuss an Tyrosinderivat bei 37°C. Trypsin-Verdau gefolgt von HPLC-MS/MS-Experimenten bestätigten den erfolgreichen C-terminalen

Einbau von Tyrosin, 3-N₃-L-Tyrosin (**1**), 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**), 3-NH₂-L-Tyrosin (**3**) und 3-NO₂-L-Tyrosin (**4**) (Abbildung S3 in den SI). Als nächstes kombinierten wir den Einbau von **1** mit einer ringspannungsinduzierten Azid-Alkin-Cycloaddition (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC)^[22] zur Konjugation von DBCO-Biotinderivaten (Abbildung 2a). Um die Effizienz des Tub-tag labelings zu bestimmen, führten wir die enzymatischen Reaktionen mit unterschiedlichen TTL/GBP4-Verhältnissen durch und beendeten diese durch schnelle Abkühlung auf 4°C nach einer bzw. drei Stunden.

Nach Abtrennung des überschüssigen Tyrosinderivats **1** durch Dialyse erfolgte die Konjugation des DBCO-Biotins mittels SPAAC. Die Reaktionsausbeuten wurden mittels SDS-PAGE bestimmt. Ein TTL/GBP4-Verhältnis von 1:5 führt nach einer Stunde bei 37°C zu 82 % umgesetzten GBP4, wohingegen ein Verhältnis von 1:10 in 71 % modifiziertem GBP4-Nanobody resultiert (Abbildung 2b).

Durch Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Stunden konnte der Umsatz auf 99 % (1:5) bzw. 88 % (1:10) gesteigert werden. Der Einbau von 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**) erfolgte mit vergleichbarer Effizienz.

Zur weiteren Validierung der Modularität des Tub-tag-labeling-Konzepts führten wir fluoreszente Modifikationen an ortsspezifisch eingebautem 3-N₃-L-Tyrosin mittels SPAAC ein (Abbildung S7 in den SI) und verwendeten eine Vielzahl von bioorthogonalen Reaktionen inklusive der Staudinger-Ligation^[23] (Abbildung S8 in den SI) und der Staudinger-Phosphit-Reaktion^[24] (Abbildung S9 in den SI). Des Weiteren wurden Hydrazon- (Abbildung S10 in den SI) und Oximbildende Reaktionen^[3c] (Abbildung S11 in den SI) im Falle

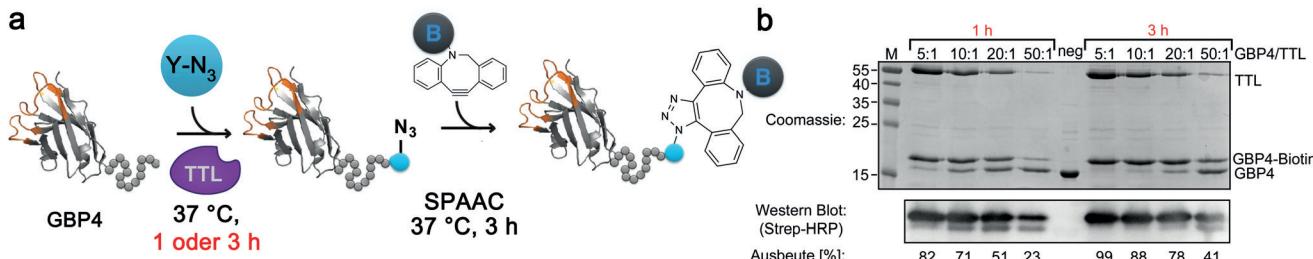


Abbildung 2. Prinzip und die Effizienz der TTL-katalysierten Funktionalisierung. a) Schematische Darstellung des TTL-katalysierten Einbaus von Azid **1** mit anschließender spannungsinduzierter Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC). b) Effizienz der TTL-basierten Verknüpfung des Azids **1** an den C-Terminus von GBP4 in Abhängigkeit vom Substrat/TTL-Verhältnis (5:1 bis 50:1) und der Reaktionszeit (eine bzw. drei Stunden). Zur Visualisierung wurden die Reaktionen zu den definierten Zeitpunkten gestoppt und eine SPAAC zu einem DBCO-Biotin-Derivat durchgeführt. Sowohl die Blaufärbung im SDS-Gel als auch der Western Blot (Strep-HRP) zeigen einen hohen Funktionalisierungsgrad von GBP4 nach nur einer Stunde Reaktionszeit.

von 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**) durchgeführt. Zusammen ermöglichte uns diese Vielzahl bioorthogonaler Reaktionen den Einbau verschiedener funktionaler Bausteine, wie z.B. Fluorophoren und Biotin, sowie die verzweigte PEGylierung von GBP4 (Abbildung S9 in den SI). Zur Verdeutlichung der breiten Anwendbarkeit der TTL-katalysierten Funktionalisierungstechnik verwendeten wir diese darüber hinaus für die ortsspezifische Modifikation von GFP, Ubiquitin und einem weiteren GFP-spezifischen Nanobody (GBP1).^[21] Die SDS-PAGE-Analyse zeigte Ausbeuten vergleichbar mit jenen bei der Modifikation von GBP4 (Abbildungen S12 und S13 in den SI). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Präsenz der Tub-tag-Sequenz weder die Fluoreszenz von GFP noch die fluoreszenzmodulierenden Eigenschaften^[21] der GFP-spezifischen Nanobodies beeinflusst (Abbildungen S4 und S5 in den SI).

Auf der Grundlage des nun etablierten, modularen und effizienten TTL-Modifikationsprotokolls untersuchten wir die Selektivität der Tyrosin-Transfer-Reaktion innerhalb komplexer Proteingemische. Hierzu wurde *E.coli*-Lysat, welches überexprimiertes GFP-Tub-tag enthält, für vier Stunden mit 3-N₃-L-Tyrosin und TTL inkubiert und der Azid-Überschuss anschließend mittels Dialyse entfernt. Die folgende SPAAC mit DBCO-Biotin zeigte die selektive C-terminale Funktionalisierung von GFP (Abbildung 3a und b sowie S14 in den SI). In einem weiteren Experiment zur Anreicherung und Immunopräzipitation von GFP aus Zelllysat erforschten wir die Aktivität und Spezifität des ortsspezifisch funktionalisiertem GFP-bindenden Nanobody GBP1. Hierzu markierten wir, im Anschluss an den TTL-katalysierten Einbau von 3-N₃-L-Tyrosin, GBP1 mit DBCO-Biotin und immobilisierten dieses an einer mit Streptavidin beschichteten festen Phase (Abbildung 3c). Nach Inkubation dieser GBP1-Streptavidin-Konjugate mit HEK-Zelllysat konnte im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen sowie fester Phase ohne GBP1 die selektive Anreicherung von GFP durch SDS-Gel- und Western-Blot-Analyse demonstriert werden (Abbildung 3d).

Nachfolgend haben wir das Potenzial von mit TTL funktionalisiertem GBP1 als Reagens für das Immunfärben von zellulären Strukturen und die Analyse mittels hochauflösender Mikroskopie untersucht. Die hohe Auflösung dieser Technik stellt neue Anforderungen an die Detektionsre-

gentien. Nur durch den Einsatz möglichst kleiner Immuno-fluoreszenz-Bindereagentien können höchstmögliche Auflösung erreicht und somit alle Möglichkeiten dieser Technologie ausgeschöpft werden.^[20b]

Hierzu wurde 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**) mittels TTL an den C-Terminus von GBP1 angefügt und durch eine Oxim-bildende Reaktion mit dem Fluorophor Alexa594 verknüpft (Abbildung 3e). Zusätzlich zu der mikroskopischen Anwendung zeigt dieses Experiment, dass sowohl der Einsatz des Aldehyds **2** als auch des Azids **1** zu funktionalen Protein-konjugaten führt. GFP-LaminB1 exprimierende HeLa-Zellen wurden fixiert und mit ca. 1 µg GBP1-Alexa594 pro Objektplatte angefärbt. GFP-LaminB1 lagert sich innerhalb der Kernhülle der Zellen an und bildet die nukleare Lamina. Die Kolokalisation von Lamin und GBP1 und damit ein intaktes Bindeverhalten des Nanobodys im zellulären Kontext konnte mittels hochauflösender 3D-SIM-Mikroskopie gezeigt werden (Abbildung 3f-h). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem Fusionskonstrukt GFP-PCNA für die Anfärbung von subnuklearen DNA-Replikationsorten erzielt (Abbildung S15 in den SI). Diese Studien zeigen die Anwendbarkeit mittels TTL modifizierter Nanobodies für funktionale Studien im Bereich der Biochemie und Zellbiologie.

Zusammenfassend haben wir mit dem Tub-tag labeling eine neue Methode für die ortsspezifische Modifikation funktionaler und Antigen-bindender Proteine entwickelt. Die TTL-katalysierte chemoenzymatische Ligation nichtnatürlicher Tyrosinderivate wie 3-N₃-L-Tyrosin (**1**) und 3-Formyl-L-Tyrosin (**2**) erlaubt bei moderatem Enzym- und Zeiteinsatz bioorthogonale Funktionalisierungen mit Ausbeuten von bis zu 99 %. Modifizierte Tyrosinbausteine dienen hierbei als bioorthogonale Anker, an denen eine Vielzahl etablierter chemoselektiver Reaktionen durchgeführt werden können. Insbesondere die sehr kurzen Reaktionszeiten und milden Reaktionsbedingungen ermöglichen die Darstellung homogen modifizierter Proteine, ohne dabei negativen Einfluss auf deren Aktivität zu nehmen. Dies konnte unter anderen am Beispiel ortsspezifisch funktionalisierter Nanobodies und deren Einsatz in Immunopräzipitationsexperimenten sowie als Markierungsreagentien für hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Somit ermöglicht Tub-tag labeling die Herstellung rekombinanter Antikörper – und Proteine allgemein –, die mit neuartigen Eigenschaften ausge-

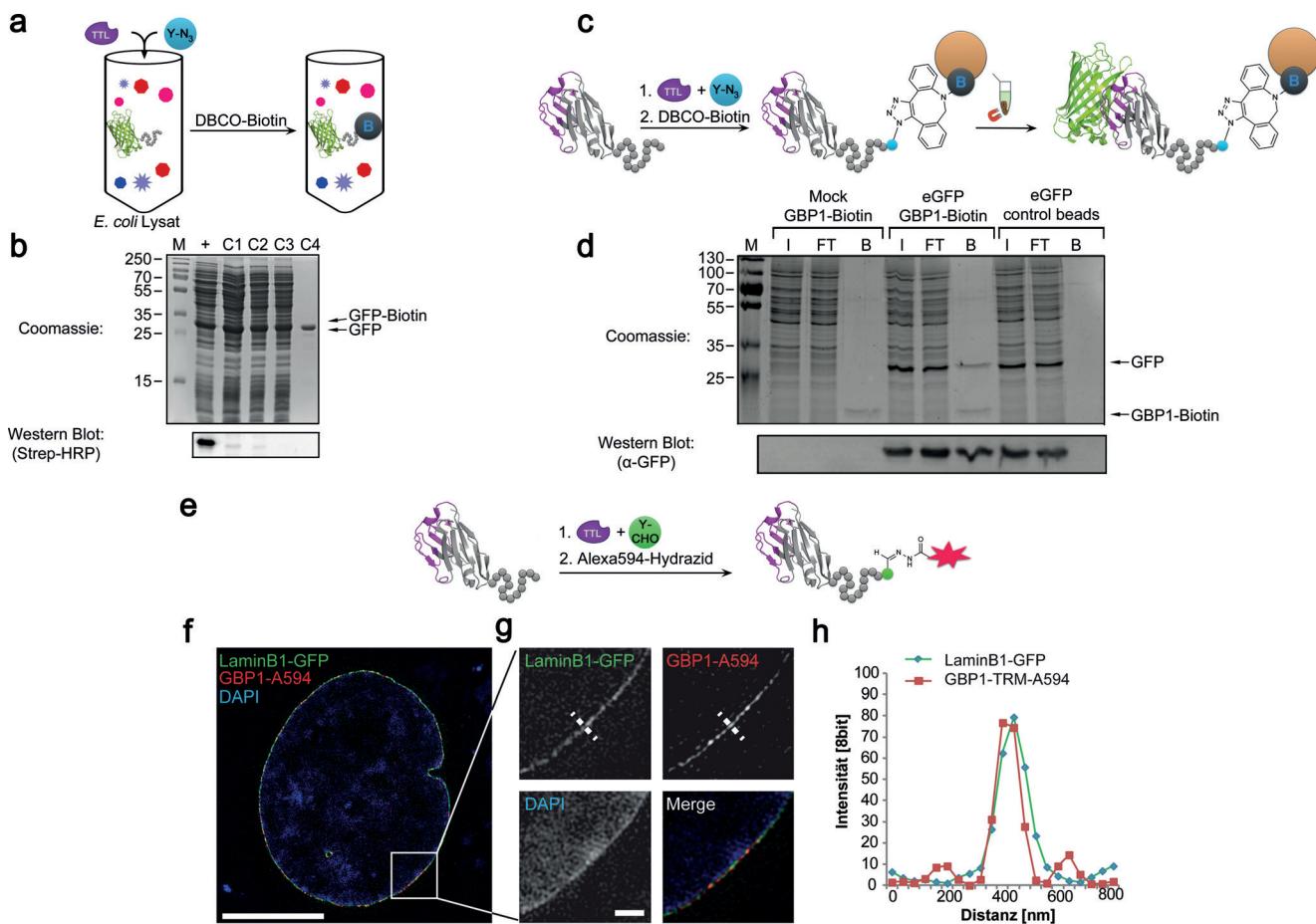


Abbildung 3. Tub-tag labeling innerhalb komplexer Proteinmischungen und die Anwendung chemoenzymatisch funktionalisierter Nanobodies für die Anreicherung von Proteinen und als Reagenten für hochauflösende Mikroskopie. a) Schematische Darstellung des Tub-tag labelings an GFP in *E. coli*-Lysat. b) Blaugel- und Western-Blot-Analyse zeigen die hohe Selektivität der TTL-katalysierten Tyrosin-Verknüpfung mit anschließender Biotinylierung (+: Lysat behandelt mit TTL, 3-N₃-L-Tyrosin (1) und DBCO-Biotin; C1: kein 3-N₃-L-Tyrosin (1) hinzugefügt; C2: Lysat versetzt mit DBCO-Biotin; C3: Lysat; C4: gereinigtes GFP). c) Schematische Darstellung der ortspezifischen Biotinylierung des GFP-bindenden Nanobodys GBP1 mit anschließender Immunopräzipitation von GFP. d) Blaugel- und Western-Blot-Analyse zeigen die effiziente und spezifische Anreicherung von GFP. (Mock GBP1-Biotin: Lysat ohne überexprimiertes GFP; GFP GBP1-Biotin: GBP1-beladene feste Phase sowie Lysat mit überexprimiertem GFP; GFP control beads: feste Phase ohne GBP1, I: Probe, die auf feste Phase geladen wurde; FT: Durchfluss; B: feste Phase.) e) Schematische Darstellung der ortspezifischen Funktionalisierung von GBP1 mit Alexa594. f) Immunofluoreszenz mit GBP1-Alexa594. Gezeigt ist der Nukleus von fixierten HeLa-Zellen mit der durch LaminB1-GFP und GBP1-Alexa594 ko-angefärbten Lamina. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 10 μ m. g) Vergrößerungsregion von (d). h) Das Fluoreszenzintensitätsprofil entlang der gestrichelten Linie (gezeigt in g) verdeutlicht eine hohe Kolokalisationsgenauigkeit.

stattet sind. Diese können für die Erforschung und Manipulation zellulärer Prozesse eingesetzt werden, woraus sich viele Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Biotechnologie sowie der medizinischen Diagnose und Therapie ergeben.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmens des SPP1623 an MCC (CA 198/8-1), CPRH (HA 4468/9-1) und HL (LE 721/13-1), die Nanosystems Initiative Munich (NIM) an HL, die Einstein-Stiftung Berlin (Leibniz-Humboldt-Professur) an C.P.R.H., die Boehringer-Ingelheim-Stiftung (Plus 3 Award) an C.P.R.H. und den Fonds der Chemischen Industrie (FCI) an C.P.R.H.

und an D.S. (Kekulé-Stipendium) unterstützt. Wir danken Ralf Jacob für die Bereitstellung eines Plasmids mit der für die TTL kodierenden Sequenz,^[25] Kristin Kemnitz-Hassanin, Heike Stephanowitz und Andreas Maiser für technische Unterstützung und dem kürzlich verstorbenen Bijàn Mir-Montazeri für Hilfe in der Anfangsphase dieses Projekts. Die Autoren erklären konkurrierende finanzielle Interessen. Die hier vorgestellte Technik ist Teil einer Patentanmeldung.

Stichwörter: Antikörper · Chemoenzymatische Modifikation · Nanobodies · Ortspezifische Funktionalisierung · Tubulin-Tyrosin-Ligase

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13787–13791
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13992–13996

- [1] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89.
- [2] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382.
- [3] a) D. Schumacher, C. P. Hackenberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 62–69; b) K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764–4806; c) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133.
- [4] a) C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; b) L. R. Malins, R. J. Payne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 70–78; c) C. D. Spicer, B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4740; d) B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91–118.
- [5] a) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; b) 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.
- [6] a) G. Volkmann, H. D. Mootz, *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 1185–1206; b) A. Reif, S. Siebenhaar, A. Troster, M. Schmalzlein, C. Lechner, P. Velisetty, K. Gottwald, C. Pohner, I. Boos, V. Schubert, S. Rose-John, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12125–12131; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12321–12327.
- [7] S. Liebscher, M. Schopfel, T. Aumuller, A. Sharkhuukhen, A. Pech, E. Hoss, C. Parthier, G. Jahreis, M. T. Stubbs, F. Bordusa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3024–3028; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3068–3072.
- [8] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670–2671.
- [9] J. Yin, P. D. Straight, S. M. McLoughlin, Z. Zhou, A. J. Lin, D. E. Golani, N. L. Kelleher, R. Kolter, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15815–15820.
- [10] I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99–104.
- [11] M. Fernández-Suárez, H. Baruah, L. Martínez-Hernández, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1483–1487.
- [12] K. Heller, P. Ochtrop, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen, C. Hedberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10327–10330; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10467–10471.
- [13] P. Wu, W. Shui, B. L. Carlson, N. Hu, D. Rabuka, J. Lee, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3000–3005.
- [14] M. Rashidian, J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277–1294.
- [15] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707–708.
- [16] a) M. Rudiger, J. Wehland, K. Weber, *FEBS J.* **1994**, *220*, 309–320; b) A. Szyk, A. M. Deaconescu, G. Piszczeck, A. Roll-Mecak, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 1250–1258.
- [17] A. Banerjee, T. D. Panosian, K. Mukherjee, R. Ravindra, S. Gal, D. L. Sackett, S. Bane, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 777–785.
- [18] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muylldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, R. Hamers, *Nature* **1993**, *363*, 446–448.
- [19] a) U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Schermelleh, A. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, S. Muylldermans, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 887–889; b) L. Trinkle-Mulcahy, S. Boulon, Y. W. Lam, R. Urcia, F. M. Boisvert, F. Vandermoere, N. A. Morrice, S. Swift, U. Rothbauer, H. Leonhardt, A. Lamond, *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 223–239.
- [20] a) J. Guizetti, L. Schermelleh, J. Mantler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Muller-Reichert, D. W. Gerlich, *Science* **2011**, *331*, 1616–1620; b) J. Ries, C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi, H. Ewers, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 582–584.
- [21] A. Kirchhofer, J. Helma, K. Schmidthals, C. Frauer, S. Cui, A. Karcher, M. Pellis, S. Muylldermans, C. S. Casas-Delucchi, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, K. P. Hopfner, U. Rothbauer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 133–138.
- [22] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [23] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [24] a) N. Nischan, A. Chakrabarti, R. A. Serwa, P. H. Bovee-Geurts, R. Brock, C. P. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11920–11924; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12138–12142; b) R. Serwa, P. Majkut, B. Horstmann, J. M. Swiecicki, M. Gerrits, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 596–602; c) R. Serwa, I. Wilkening, G. Del Signore, M. Muhlberg, I. Claussnitzer, C. Weise, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8234–8239; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8382–8387.
- [25] S. Zink, L. Grosse, A. Freikamp, S. Banfer, F. Muksch, R. Jacob, *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5998–6008.

Eingegangen am 14. Juni 2015,
veränderte Fassung am 17. August 2015
Online veröffentlicht am 25. September 2015