

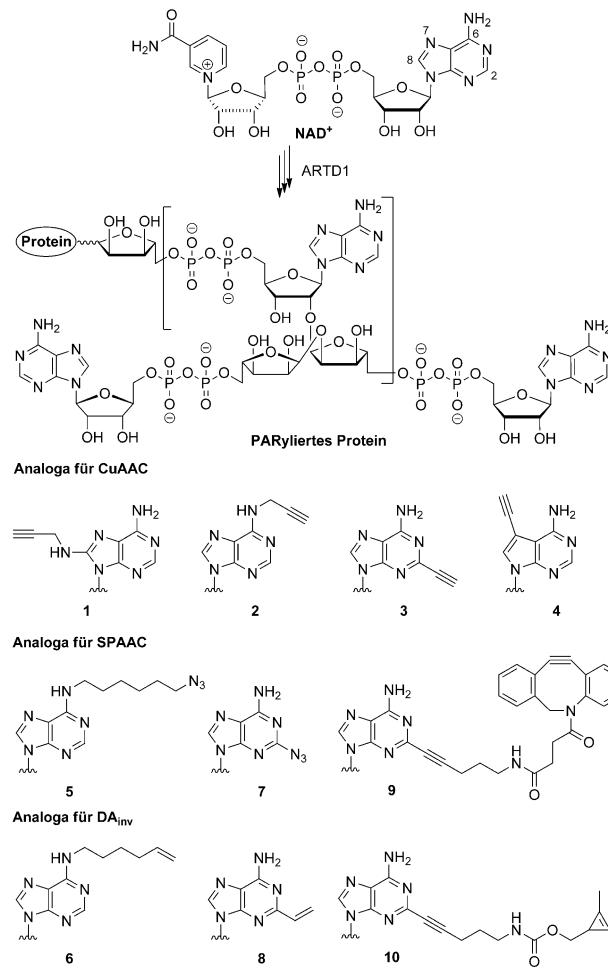
# Intrazelluläre Visualisierung der Entstehung von Poly(ADP-Ribose) mit bioorthogonal funktionalisierten NAD<sup>+</sup>-Analoga

Sarah Wallrodt, Annette Buntz, Yan Wang, Andreas Zumbusch und Andreas Marx\*

**Abstract:** Poly(ADP-ribosylierung (PARylierung) ist eine wichtige posttranskriptionale Proteinmodifikation und ein bedeutender Signalweg in fast allen Eukaryoten. Grundlegende Prozesse, wie DNA-Reparatur und Transkription, werden von diesem kurzlebigen Polymer und seiner Wechselwirkung mit Proteinen gesteuert. ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) erzeugen komplizierte ADP-Riboseketten aus NAD<sup>+</sup> an diversen Akzeptorproteinen, weshalb die Erforschung der PARylierung auf molekularer Ebene anspruchsvoll ist. Hier präsentieren wir die Entwicklung bioorthogonal funktionalisierter NAD<sup>+</sup>-Analoga für die In-vitro- und In-cellulo-Detektion der PARylierung. Für die intrazelluläre Visualisierung der PARylierung, zeitgleich und in zwei Farben, eignen sich besonders an Position 2 modifizierte NAD<sup>+</sup>-Analoga. Diese geben Einblick in das Substratspektrum der ARTs und werden durch schnelles optisches sowie mehrfarbiges Auslesen von PARylierungen zur Aufklärung der biologischen Funktionen dieser Prozesse beitragen.

Im Jahr 2013 feierte die Erforschung der Poly(ADP-Ribose) (PAR, mit ADP = Adenosindiphosphat; Abbildung 1) ihr 50-jähriges Bestehen.<sup>[1]</sup> Seitdem hat dieses Gebiet eine Renaissance erlebt, und zunehmend wird die Bedeutsamkeit von PAR als posttranskriptionale Proteinmodifikation und als Signalmolekül aufgedeckt.<sup>[2]</sup> Dieses Biopolymer ist in grundlegende Prozesse, wie die Antwort auf DNA-Schäden,<sup>[3]</sup> die Genregulation,<sup>[4]</sup> die Zellphysiologie<sup>[5]</sup> und die Apoptose,<sup>[6]</sup> involviert. Daher überrascht es nicht, dass zahlreiche Funktionsstörungen und Krankheiten, besonders in Zusammenhang mit Krebs, mit PARylierung assoziiert wurden.<sup>[5b,7]</sup>

ADP-Ribosylierung wird von ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysiert. Im Menschen wurden bisher 17 Mitglieder dieser Enzymfamilie entdeckt, von denen die Diphtherietoxin-ähnliche ADP-Ribosyltransferase 1 (ARTD1) am besten untersucht ist.<sup>[8]</sup> In einer typischen Reaktion wird ADP-Ribose aus Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) kovalent auf bestimmte Aminosäureseitenketten des Substrats übertragen, wobei mono(ADP-ribosyliertes Protein entsteht. Das Hinzufügen von bis zu 200 weiteren ADP-Riboseeinheiten an der 2'-OH-Gruppe führt zu Poly(ADP-Ribosylierung). Verzweigungen an der 2"-OH-Gruppe treten



**Abbildung 1.** Struktur von Poly(ADP-Ribose), NAD<sup>+</sup> und den NAD<sup>+</sup>-Analoga 1–10.

alle 20–50 Einheiten auf (Abbildung 1).<sup>[2]</sup> Neben vielen weiteren Substraten dient ARTD1 auch als sein eigenes Akzeptorprotein<sup>[9]</sup> in der so genannten Auto(ADP-Ribosylierung).

Wegen ihrer vielschichtigen Funktionen ist es von größter Bedeutung, die PARylierung auf molekularer Ebene zu erforschen. Zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch nur sehr wenige Methoden verfügbar, die die direkte, zellbasierte Detektion von PAR ermöglichen.<sup>[10]</sup> Zu den indirekten Hilfsmitteln zählen PAR-spezifische Antikörper<sup>[11]</sup> sowie ADP-Ribose bindende Makrodomänen.<sup>[12]</sup> Kürzlich wurden klickbare, Alkin-markierte NAD<sup>+</sup>-Analoga<sup>[13]</sup> für die Untersuchung von PARylierungsprozessen verwendet. Bisher wurden allerdings keine Anwendungen dieser Analoga in zellulären Systemen beschrieben.

[\*] S. Wallrodt, A. Buntz, Dr. Y. Wang, Prof. Dr. A. Zumbusch, Prof. Dr. A. Marx

Fachbereich Chemie, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de  
Homepage: <http://www.uni-konstanz.de/chemie/~agmarx>

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201600464> zu finden.

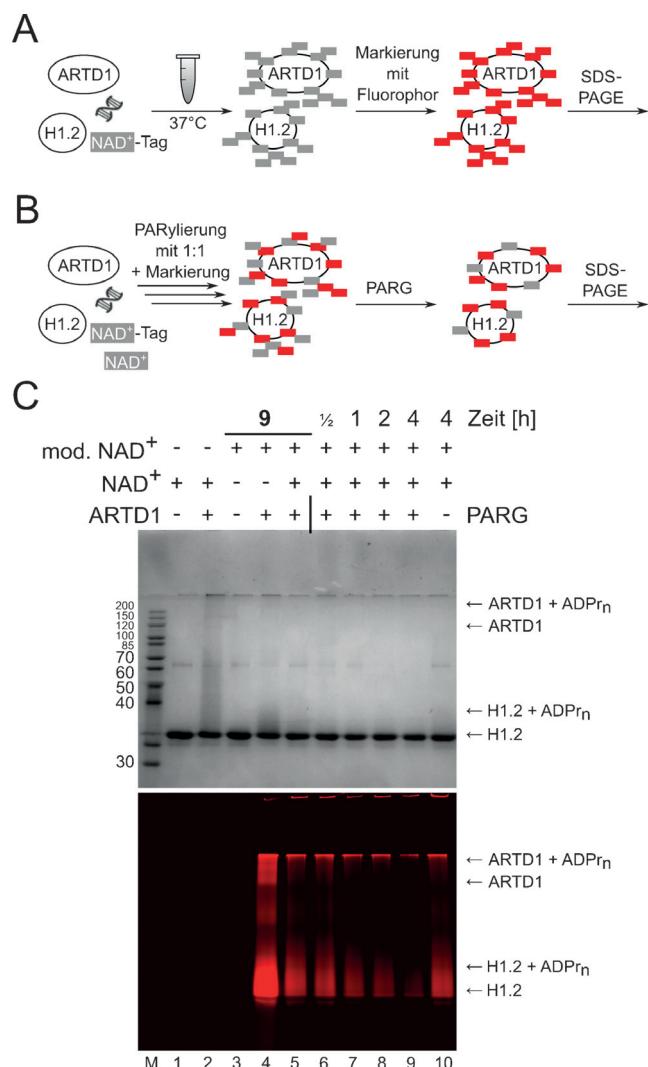
Hier berichten wir über die Entwicklung funktionalisierter NAD<sup>+</sup>-Analoga (Abbildung 1) basierend auf bioorthogonaler Chemie, die für die intrazelluläre Detektion von PAR geeignet sind. Um bestmögliche Substrateigenschaften zu gewährleisten, variieren wir systematisch sowohl die Positionen als auch die Art der Modifikationen an NAD<sup>+</sup>, was Kupfer(I)-katalysierte ebenso wie kupferfreie Klickreaktionen ermöglicht. Die hier beschriebenen Verbindungen wurden wie folgt modifiziert: mit a) Alkinen für die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC);<sup>[14]</sup> b) Aziden oder Cyclooctin für die spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC);<sup>[15]</sup> sowie c) Alkenen<sup>[16]</sup> und Cyclopropen<sup>[17]</sup> für die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DA<sub>inv</sub>). Durch Untersuchungen dieser neuen Verbindungen in Bezug auf ihre Akzeptanz durch ARTD1 ist es möglich, Einblicke in das Substratspektrum dieses Enzyms zu erhalten. Weiterhin haben wir die Verbindungen in zellulären Systemen erforscht und konnten Reportergruppen identifizieren, die eine selektive Visualisierung der PARylierung im Zellkern ermöglichen.

Zunächst erwogen wir verschiedene Modifizierungsorte am NAD<sup>+</sup>-Molekül. Um die Polymerisation nicht zu behindern, wurde die Purinbase verändert. Jiang et al.<sup>[13a]</sup> stellten NAD<sup>+</sup>-Analoga mit Alkinresten in Position 8 (**1**) und 6 (**2**) her und zeigten, dass nur **2** von ARTD1 zur Bildung von Polymer verwendet wird. Zusätzlich synthetisierten wir das 2-modifizierte NAD<sup>+</sup> **3** und demonstrierten seinen Einbau in PAR.<sup>[13b]</sup> Um Position 7 zu erkunden, wurde das entsprechende Analogon **4** synthetisiert. Dazu wurde 7-Ethynyl-7-desaza-adenosin<sup>[18]</sup> hergestellt, phosphoryliert und mit β-Nicotinamidmononukleotid zu **4** umgesetzt (siehe Hintergrundinformationen (SI), Schema S1).

Im Allgemeinen wurden alle hier beschriebenen Verbindungen wie publiziert in In-vitro-Assays mit ARTD1 und Histon H1.2 als Akzeptoren für die ADP-Ribosylierung getestet.<sup>[13b]</sup> Grundsätzlich wurden die jeweiligen Analoga mit ARTD1, kurzer dsDNA und Histon inkubiert und anschließend mit Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt. Nach SDS-PAGE-Analyse wurden die Fluoreszenzsignale mit dem Coomassie-Blau-gefärbten Gel verglichen (Abbildung 2 A). Erfolgreiche PARylierung wird sichtbar durch a) charakteristisches polymermodifiziertes H1.2 sowie b) Verschwinden der ARTD1-Bande bei 113 kDa aufgrund von Automodifizierung. Kontrollen erfolgten ohne Enzymzugabe und mit natürlichem Substrat.

Verbindungen **3** und **4** wurden im Assay untersucht (siehe SI, Abbildung S1) und anschließend durch CuAAC markiert. Wie zuvor<sup>[13b]</sup> wurde 2-Alkin-NAD<sup>+</sup> **3** gut eingebaut, wohingegen 7-Alkin-NAD<sup>+</sup> **4** keine Polymerbildung zeigte. Im Kontext mit früheren Berichten<sup>[13a]</sup> schließen wir aus dieser Beobachtung, dass funktionelle Gruppen in den Positionen 2 und 6 eingeführt werden können, ohne die Aktivität von ARTD1 signifikant zu beeinträchtigen.

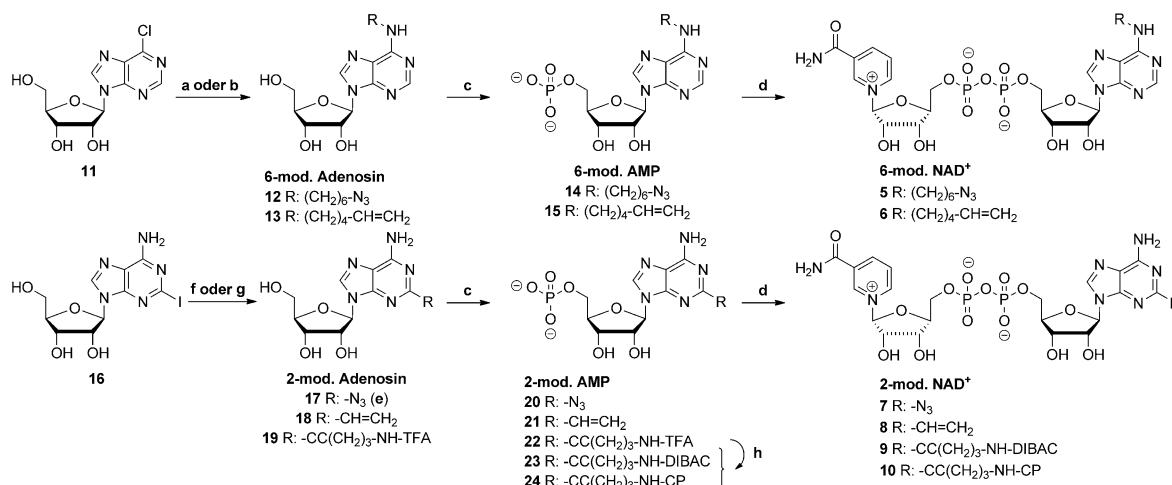
Unser nächstes Ziel bestand in der Einführung anderer bioorthogonaler Reporter und der Synthese der analogen Azide **5** und **7** sowie der terminalen Alkene **6** und **8**, um PAR mittels SPAAC oder DA<sub>inv</sub> zu markieren (Abbildung 1). Dazu wurden die modifizierten Nukleoside<sup>[19]</sup> hergestellt, phos-



**Abbildung 2.** A) Ablauf des ADP-Ribosylierungsassays mit Histon H1.2. B) Ablauf des Abbauexperimentes mit PARG. C) Modifizierung von H1.2 und ARTD1 mittels Analogon **9** und SPAAC sowie Abbau durch PARG. Ergebnisse wurden mit SDS-PAGE analysiert. Oben: Coomassie-Blau-Färbung; unten: Cy3-Fluoreszenz. Die NAD<sup>+</sup>-Konzentration betrug 1 mM. Der zeitabhängige Abbau wurde mit einem 1:1-Gemisch mit natürlichem NAD<sup>+</sup> untersucht. Kontrolle ohne PARG-Zugabe.

phoryliert und in die jeweiligen NAD<sup>+</sup>-Analoga **5–8** überführt (Schema 1).

Überraschenderweise war ARTD1 nicht in der Lage, die 6-modifizierten Analoga **5** und **6** umzusetzen (siehe SI, Abbildung S2, Spur 4). Fluoreszierendes Polymer konnte jedoch unter Verwendung einer 1:1-Mischung mit natürlichem NAD<sup>+</sup> gebildet werden (Spur 5). In Anbetracht der Tatsache, dass ARTD1 Verbindung **2** metabolisieren konnte, schlussfolgern wir, dass der sterisch höhere Anspruch dieser Verbindungen ihre Substrateignung insbesondere während des Einbaus der ersten ADP-Riboseeinheiten behindert. Demgegenüber wurden die 2-modifizierten NADs **7** und **8** auch in Abwesenheit von natürlichem NAD<sup>+</sup> sehr gut zu fluoreszierendem PAR umgewandelt (Spur 7). Gleichwohl kann das langsame und unselektive Markieren von 2-Vinyl-modifi-



**Schema 1.** Synthese der  $\text{NAD}^+$ -Analoga 5–10. Reaktionsbedingungen: a) 6-Azidohexan-1-amin, EtOH,  $80^\circ\text{C}$ , 3 h, 61%; b) 5-Hexen-1-amin, EtOH,  $80^\circ\text{C}$ , 3 h, 49%; c)  $\text{POCl}_3$ , Protonenschwamm, TMP,  $0^\circ\text{C}$ , 1–3 h, 40–60%; d)  $\beta$ -NMN, CDI,  $\text{NEt}_3$ , DMF, RT, 96 h, 20–60%; e) nach Literatur hergestellt; f) Trifluor-N-(pent-4-in-1-yl)acetamid, CuI,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , DMF, RT, 16 h, 83%; g)  $\text{Bu}_3\text{SnCH}=\text{CH}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , NMP,  $100^\circ\text{C}$ , 2 Tage, 92%; h) 1. 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , RT, 30 min, 2. DIBAC-NHS oder CP-Nitrophenylcarbonat, 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  pH 8.7, DMF, 16 h, 32–54%. TMP = Trimethylphosphat,  $\beta$ -NMN =  $\beta$ -Nicotinamidmonophosphat, CDI =  $N,N'$ -Carbonyldiimidazol, DMF =  $N,N$ -Dimethylformamid, NMP =  $N$ -Methyl-2-pyrrolidon, DIBAC = 4-(11,12-Didehydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-4-oxobutansäure, CP = (2-Methylcycloprop-2-en-1-yl)methyl, AMP = Adenosinmonophosphat, NHS =  $N$ -Hydroxysuccinimid, TFA = Trifluoracetat.

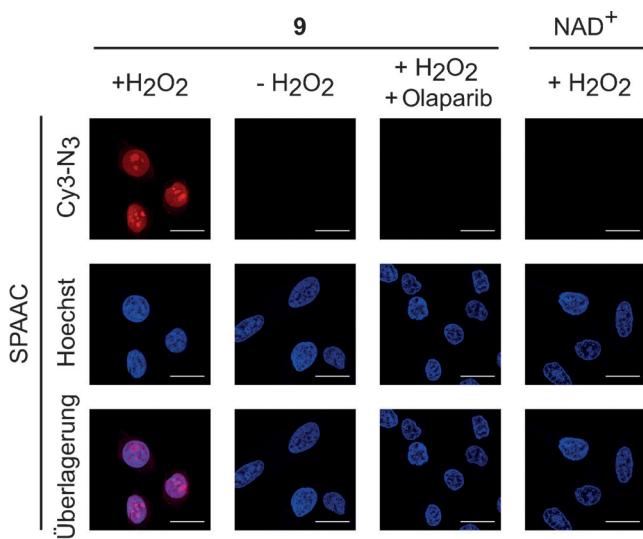
zielter PAR mit Tetrazinen nicht zur Visualisierung verwendet werden.

Da 2-modifizierte  $\text{NAD}^+$ -Analoga gut von ARTD1 toleriert wurden, erkundeten wir andere Reporter, um eine bessere Markierung von PAR zu ermöglichen. Um unspezifisches Anfärben von Farbstoffcyclooctinen zu vermeiden, verfolgten wir nun den umgekehrten Ansatz und knüpften das Cyclooctin DIBAC für Reaktionen mit Farbstoffaziden an  $\text{NAD}^+$ , da es eines der am schnellsten umsetzbaren SPAAC-Reagentien ist ( $k_2 = (0.31 \pm 0.02) \text{ m}^{-1\text{s}^{-1}}$ ).<sup>[20]</sup> Dazu wurde Adenosin **19** mit einem Amin-geschützten Linker hergestellt (Schema 1).<sup>[21]</sup> Nach Phosphorylierung und Entschützung konnte das freie Amin mit DIBAC-NHS-Ester reagieren, und das modifizierte Adenosinmonophosphat **23** wurde erhalten. Die Umsetzung mit  $\beta$ -Nicotinamidmonophosphat ergab **9**. Zusätzlich wurde ein kürzlich entwickeltes Cyclopropen in  $\text{NAD}^+$  unter der Annahme eingeführt, dass eine schnelle Reaktion ( $k_2 = (0.99 \pm 0.1) \text{ m}^{-1\text{s}^{-1}}$ )<sup>[17]</sup> die starke Hintergrundfärbung durch Farbstofftetrazine verhindern kann. In gleicher Weise wurde entschütztes Monophosphat **22** mit (2-Methylcycloprop-2-en-1-yl)methyl-(4-nitrophenyl)carbonat zu **24** umgesetzt und mit  $\beta$ -Nicotinamidmonophosphat in **10** überführt (Schema 1). Die Verbindungen **9** und **10** wurden im Assay untersucht. Beide wurden ungeachtet ihrer voluminösen Substituenten von ARTD1 akzeptiert (siehe SI, Abbildungen 2C und S3). Auch wurden beide Analoga in Gegenwart von natürlichem  $\text{NAD}^+$  (Spur 5) eingebaut, was bestätigt, dass es sich um kompetitive Substrate handelt. Weiterhin wurde untersucht, ob Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase<sup>[22]</sup> (PARG), hauptsächlich verantwortlich für den Abbau von PAR, in der Lage ist, die modifizierten Ketten zu spalten. Dazu wurde H1.2 mit einer 1:1-Mischung von **9** und  $\text{NAD}^+$  PARyliert und durch SPAAC markiert. Die Reaktion wurde mit dem ART-Inhibitor Olaparib<sup>[23]</sup> gestoppt und anschließend mit PARG inkubiert, das ADP-Ribose

exoglykosidisch bis auf die ersten Einheiten abbaut (Abbildung 2B). Wie in Abbildung 2C (Spur 6–9) gezeigt, werden unsere fluoreszierenden PAR-Ketten mit der Zeit abgebaut.

Nach der positiven Evaluation unserer Analoga *in vitro* gingen wir zu zellulären Anwendungen über. Dazu wurden Hela-Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt, um DNA-Schäden zu induzieren und die Bildung von PAR zu stimulieren. Gleichzeitig wurden die  $\text{NAD}^+$ -Analoga mithilfe transienter Zellmembranpermeabilisierung in die Zelle eingebracht.<sup>[24]</sup> Nach dem Fixieren erfolgte die Markierung mit dem jeweiligen Farbstoff. Zur Kontrolle wurden Zellen nicht mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt, mit Olaparib präinkubiert oder mit natürlichem  $\text{NAD}^+$  behandelt. Die konfokalen Fluoreszenzbilder sind in den Abbildungen 3 und S4 gezeigt. Wir beobachteten, dass die in SPAAC- und CuAAC-Reaktionen verwendeten Farbstoffazide hohe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse aufweisen und daher die erste Wahl für intrazelluläre Visualisierung von PAR darstellen. Das Fluoreszenzsignal konnte fast bis zum Detektionslimit verringt werden, als die ARTD1-Aktivität mithilfe von siRNA<sup>[25]</sup> ausgeschaltet wurde (siehe SI, Abbildung S5). Dieses Experiment zeigt, dass die detektierten, cytochemischen Signale auf die Tätigkeit eines einzelnen Enzyms, nämlich ARTD1, zurückzuführen sind.

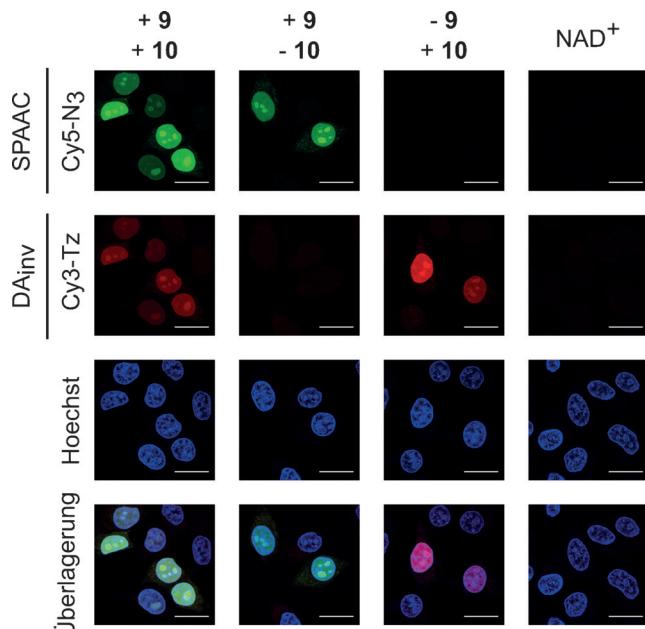
In Übereinstimmung mit aktuellen Berichten<sup>[26]</sup> führte die Inkubation mit Cyclooctin- und Tetrazin-funktionalisierten Farbstoffen zu unspezifischer Anfärbung innerhalb der Zellen. Es konnte daher keine selektive Markierung mittels 2-Azido- $\text{NAD}^+$  **7** erreicht werden, weil das Signal selbst nach Behandlung mit Iodacetamid<sup>[27]</sup> nicht vom Hintergrund zu unterscheiden war (siehe SI, Abbildung S6). Eine zytosolische Anfärbung wurde auch mit Farbstofftetrazinen bemerkt, kann jedoch durch Verwendung geringerer Farbstoffkonzentrationen und schneller Reaktionen kontrolliert werden, wie mit Analogon **10** gezeigt (siehe SI, Abbildung S4B).



**Abbildung 3.** Intrazelluläre Visualisierung der Entstehung von PAR mit Analogon **9** und SPAAC. Hela-Zellen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt, transient permeabilisiert, mit **9** inkubiert und fixiert. Markierung erfolgte mit Cy3-N<sub>3</sub> in einer SPAAC-Reaktion. DNA wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. Kontrollen ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung, mit Inhibitor Olaparib und mit natürlichem NAD<sup>+</sup>. Proben wurden im Konfokalmikroskop untersucht. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

Anschließend untersuchten wir, ob sich unsere bioorthogonalen Analoga für die simultane Detektion der PARylierung in zwei Farben eignen, wie es beispielsweise in Pulse-Chase-Experimenten vonnöten ist. Dazu verwendeten wir eine 1:1-Mischung aus **9** und **10** in der beschriebenen Vorgehensweise und markierten die modifizierte Poly(ADP-Ribose) mit Farbstoffaziden und -tetrazinen in einem Schritt und zwei Farben. Zur Kontrolle wurden Zellen mit nur jeweils einem der Analoga in gleicher Weise sowie mit natürlichem NAD<sup>+</sup> behandelt. Unter Verwendung beider Substanzen konnte eine positive Zellkernfärbung in beiden Fluoreszenzkanälen beobachtet werden. Dahingegen färbten sich die einfach behandelten Zellen lediglich in ihrer zugehörigen Farbe (Abbildung 4). Diese Experimente zeigen das Potenzial unserer neuen Verbindungen für zukünftige Zweifarbenanwendungen.

Wir haben sechs neue NAD<sup>+</sup>-Analoga synthetisiert, die an unterschiedlichen Positionen von Adenosin modifiziert wurden. Durch ihre Untersuchung im ADP-Ribosylierungssassay erlangten wir neue Erkenntnisse über das Substratspektrum von ARTD1. Während Substituenten am Adenin an Position 7 und 8 die Metabolisierung solcher Analoga durch das Enzym behindern, werden kleine Veränderungen an Position 6 toleriert. Am effizientesten werden 2-modifizierte NADs umgesetzt, und sogar lange und voluminöse Substituenten werden akzeptiert. Wir konnten die bioorthogonale Markierung von PAR durch den Einbau von functionalisierten NAD<sup>+</sup>-Analoga in vitro erreichen und zeigen, dass diese Analoga auch in Zellen angewendet werden können, wo sie von ARTD1 nach DNA-Schädigung metabolisiert werden. Diese Verbindungen haben sich als wertvolle Hilfsmittel zur weiteren biochemischen und zellulären Untersuchung von PARylierungsprozessen bewährt. Wir



**Abbildung 4.** Zweifarbenmarkierung der PAR mittels **9** und **10** (1:1) mit SPAAC und DA<sub>inv</sub>. Hela-Zellen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt, transient permeabilisiert, mit den jeweiligen NAD<sup>+</sup>-Analoga inkubiert und fixiert. Die Markierung erfolgte durch simultane Inkubation mit Cy5-N<sub>3</sub> und Cy3-Tetrazin (Cy3-Tz). DNA wurde mit Hoechst 33342 angefärbt. Kontrollen mit einzelnen NAD<sup>+</sup>-Analoga und mit natürlichem NAD<sup>+</sup>. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

zeigen außerdem das Potenzial dieser bioorthogonalen funktionalisierten Analoga für ein simultanes mehrfarbiges Auslesen. Die Entwicklung neuer NAD<sup>+</sup>-Analoga ebnet den Weg für das Design von zeitabhängigen Experimenten oder Pulse-Chase-Anwendungen und trägt dadurch zum Verständnis des hoch dynamischen PAR-Metabolismus bei.

### Danksagung

Wir danken der Konstanz Research School Chemical Biology und der DFG (SFB 969) für finanzielle Unterstützung. S.W. dankt dem Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften und A.B. der Deutsche Telekom Stiftung für die Vergabe von Stipendien. Wir danken B. A. Kottwitz für die Unterstützung bei Zellkulturexperimenten und A. Mangrich für das Bereitstellen von siRNA.

**Stichwörter:** ADP-Ribosylierung · Bioorthogonale Reaktionen · Poly(ADP-Ribose) · Proteinmodifikationen

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7660–7664  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 7790–7794

- [1] a) P. Chambon, J. D. Weill, P. Mandel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 39–43; b) L. Virág, *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 1043–1045; c) W. L. Kraus, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 902–910.
- [2] B. A. Gibson, W. L. Kraus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 411–424.
- [3] a) C. J. Pears, C. A.-M. Couto, H.-Y. Wang, C. Borer, R. Kiely, N. D. Lakin, *Cell Cycle* **2012**, *11*, 48–56; b) A. Pines, L. H.

- Mullenders, H. van Attikum, M. S. Luijsterburg, *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 321–330.
- [4] a) S. Messner, M. O. Hottiger, *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 534–542; b) W. L. Kraus, M. O. Hottiger, *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 1109–1123; c) K. W. Ryu, D.-S. Kim, W. L. Kraus, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2453–2481.
- [5] a) P. Bai, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 947–958; b) P. Bai, C. Cantó, *Cell Metab.* **2012**, *16*, 290–295.
- [6] F. Aredia, A. I. Scovassi, *Front. Biosci. Elite Ed.* **2014**, *6*, 308–317.
- [7] a) M. I. Rodríguez, J. Majuelos-Melguizo, J. M. M. Martín-Consuegra, M. R. de Almodóvar, A. López-Rivas, F. J. Oliver, *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 678–697; b) A. Mangerich, A. Bürkle, *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 251–265.
- [8] M. O. Hottiger, P. O. Hassa, B. Lüscher, H. Schüler, F. Koch-Nolte, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 208–219.
- [9] Z. Tao, P. Gao, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14258–14260.
- [10] N. P. Westcott, H. C. Hang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *23*, 56–62.
- [11] a) H. Kawamitsu, H. Hoshino, H. Okada, M. Miwa, H. Momoi, T. Sugimura, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3771–3777; b) J. H. Küpper, L. van Gool, M. Müller, A. Bürkle, *Histochem. J.* **1996**, *28*, 391–395.
- [12] G. Timinszky, S. Till, P. O. Hassa, M. Hothorn, G. Kustatscher, B. Nijmeijer, J. Colombelli, M. Altmeyer, E. H. K. Stelzer, K. Scheffzek, M. O. Hottiger, A. G. Ladurner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 923–929.
- [13] a) H. Jiang, J. H. Kim, K. M. Frizzell, W. L. Kraus, H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9363–9372; b) Y. Wang, D. Rösner, M. Grzywa, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8159–8162; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8298–8301; c) I. Carter-O'Connell, H. Jin, R. K. Morgan, L. L. David, M. S. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5201–5204.
- [14] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [15] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [16] A.-K. Späte, V. F. Schart, S. Schöllkopf, A. Niederwieser, V. Wittmann, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16502–16508.
- [17] A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147–154.
- [18] A. Bourderioux, P. Naus, P. Perlíková, R. Pohl, I. Pichová, I. Votruba, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, K. M. Stray, T. Wang, A. S. Ray, J. Y. Feng, G. Birkus, T. Cihlar, M. Hocek, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5498–5507.
- [19] a) S. Higashiyama, C. Kaibara, K. Fukuoka, F. Suda, M. Ishikawa, M. Yoshida, T. Hata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 39–42; b) L. Wicke, J. W. Engels, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 627–642; c) S. M. Hacker, F. Mortensen, M. Scheffner, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10247–10250; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10413–10416.
- [20] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.
- [21] S. M. Hacker, N. Hardt, A. Buntru, D. Pagliarini, M. Mockel, T. U. Mayer, M. Scheffner, C. R. Hauck, A. Marx, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1588–1596.
- [22] K. Hatakeyama, Y. Nemoto, K. Ueda, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14902–14911.
- [23] K. A. Menear, C. Adcock, R. Boulter, X.-l. Cockcroft, L. Copsey, A. Cranston, K. J. Dillon, J. Drzewiecki, S. Garman, S. Gomez, H. Javaid, F. Kerrigan, C. Knights, A. Lau, V. M. Loh, I. T. W. Matthews, S. Moore, M. J. O'Connor, G. C. M. Smith, N. M. B. Martin, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6581–6591.
- [24] a) D. Koley, A. J. Bard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16783–16787; b) A. B. Neef, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789–793.
- [25] L. Efremova, S. Schildknecht, M. Adam, R. Pape, S. Gutbier, B. Hanf, A. Bürkle, M. Leist, *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4119–4132.
- [26] H. E. Murrey, J. C. Judkins, C. W. am Ende, T. E. Ballard, Y. Fang, K. Riccardi, L. Di, E. R. Guilmette, J. W. Schwartz, J. M. Fox, D. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11461–11475.
- [27] R. van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 392–398.

Eingegangen am 15. Januar 2016,  
veränderte Fassung am 29. Februar 2016  
Online veröffentlicht am 15. April 2016