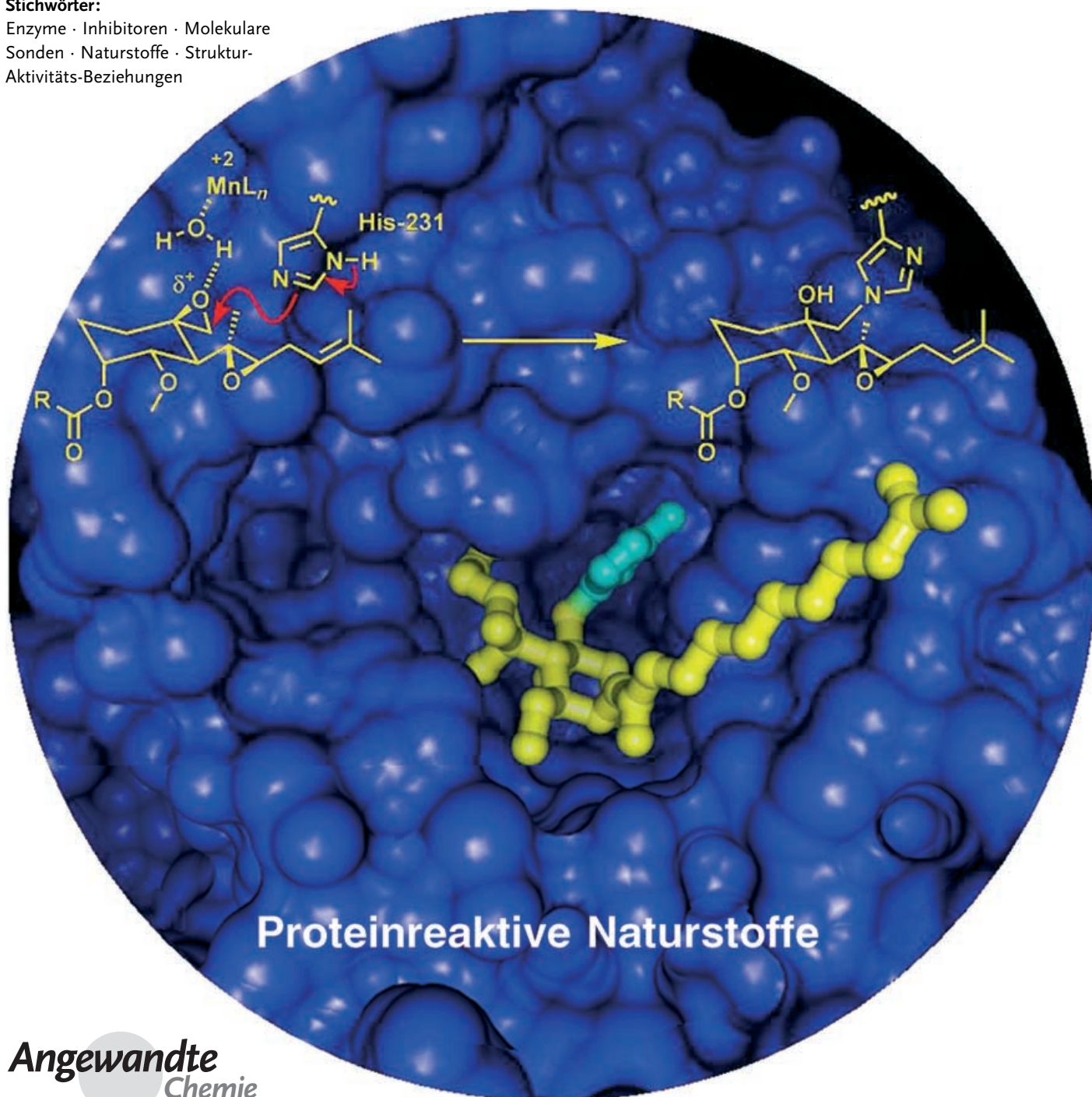


Proteinreaktive Naturstoffe

Carmen Drahl, Benjamin F. Cravatt* und Erik J. Sorensen*

Stichwörter:

Enzyme · Inhibitoren · Molekulare
Sonden · Naturstoffe · Struktur-
Aktivitäts-Beziehungen



In der Post-Genom-Ära steht man vor der gewaltigen Aufgabe, die Strukturen und Funktionen zehntausender codierter Proteine zuzuweisen. Zur Analyse der Proteinfunktion werden neue Technologien mit großer Bandbreite entwickelt, etwa die aktivitätsbasierte Proteinanalyse (activity-based protein profiling, ABPP). Bei diesem Verfahren sollen auf das aktive Zentrum gerichtete chemische Sonden entwickelt werden, um die Enzyme in ganzen Proteomen zu analysieren. Derartige chemische Proteomtechnologien können von proteinreaktiven Naturstoffen lernen, die Enzyme der unterschiedlichsten Klassen durch ein bemerkenswert vielfältiges Spektrum an Mechanismen kovalent modifizieren und somit eine reiche Quelle an Konzepten für die Entwicklung gegen aktive Zentren gerichteter Proteomsonden bilden. Hier werden wir anhand unterschiedlicher Naturstoffe zeigen, wie ihre Wirkmechanismen zum Fortschritt chemischer Proteomtechnologien wie ABPP beigetragen haben.

Aus dem Inhalt

| | |
|---|------|
| 1. Einleitung | 5937 |
| 2. Angriff auf katalytische Nucleophile in aktiven Zentren von Enzymen | 5938 |
| 3. Angriff auf nichtnucleophile Reste in aktiven Zentren von Enzymen | 5943 |
| 4. Angriff auf nichtenzymatische Proteine | 5950 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick | 5952 |

1. Einleitung

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat unsere Vorstellung von Biologie grundlegend verändert. Heute sind wir mit einer großen Kluft zwischen dem Reichtum an Gensequenzinformation und unserem Wissen um die Genfunktion konfrontiert: Tausende Genprodukte wurden vorhergesagt, deren zelluläre und molekulare Funktionen es zu identifizieren gilt. Das Genom führt zum Proteom, und gerade die kombinatorischen Wechselwirkungen der Proteine untereinander sind der Grund für die große Komplexität lebender Organismen auf molekularer Ebene. Die Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen und zellulären Funktionen aller Proteine, die durch prokaryotische und eukaryotische Genome codiert sind, sowie die Entschlüsselung der Architekturen, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen in Zellen und Geweben aufgebaut werden, gehören zu den vordringlichsten Aufgaben für eine neue Generation von Naturwissenschaftlern. Um dieses Wissen zu erlangen, müssen Konzepte und Technologien für eine schnellere globale Analyse von Proteinfunktionen entwickelt werden.^[1] Eine wachsende Zahl von Arbeitsgruppen setzt dabei auf chemische Strategien, die Einblicke in die Rolle individueller Proteine in komplexen biologischen Systemen gewähren. Die chemische Synthese hat in diesem Prozess oft eine Hauptrolle gespielt, beispielsweise indem sie die Identifizierung der Protein-Targets bioaktiver Naturstoffe vereinfachte.^[2]

Seit Jahrzehnten verwendet man Naturstoffe zu medizinischen Zwecken.^[3] Besonders Lebensformen ohne Immunsysteme synthetisieren Naturstoffe mit einer unvergleichlichen strukturellen Vielfalt, von denen einige biologische Funktionen hoch spezifisch modulieren, und es ist verlockend, sich die vielen bislang unentdeckten Sekundärmetaboliten vorzustellen. Mikroorganismen sind beispielsweise fruchtbare Quellen für neuartige chemische Verbindungen, und Forscher versuchen, sich die verschiedenartigen Metaboliten zunutze zu machen.^[4] Eine wichtige Teilmenge dieser

biologisch aktiven Naturstoffe sind Verbindungen mit elektrophilen funktionellen Gruppen, die kovalent an nucleophile Reste in spezifischen Protein-Targets binden. Lipstatin,^[5] Fumagillin^[6] und Microcystin,^[7] mit einer Carbonylgruppe, einem Epoxidring bzw. einer elektronenarmen Alken-Einheit, sind bekannte Beispiele für proteinreaktive Naturstoffe. Diese und verwandte Sekundärmetaboliten haben uns Einblicke in die zellulären Funktionen wichtiger Enzyme gewährt. Die meisten Naturstoffe, die kovalent an Proteine binden, enthalten chemisch reaktive Struktureinheiten, andere hingegen zeigen eine latente Reaktivität: Sie erwecken den Anschein harmloser Substrate, werden aber bei der Katalysereaktion von ihren Enzym-Targets aktiviert.^[8]

Proteinreaktive Naturstoffe sind als molekulare Sonden für Proteinaktivitätsanalysen hochgradig interessant, da sie Informationen über die aktiven Zentren von Enzymen in komplexen Proteomen liefern. Darüber hinaus kann die Vielfalt von Mechanismen, die reaktive Naturstoffe gegenüber den aktiven Zentren der Target-Enzyme anwenden, das De-novo-Design affiner Substanzen für die Proteomanalyse spezifischer Enzymklassen erleichtern. Eine derartige aktivitätsbasierte Proteinanalyse (ABPP)^[9] könnte eine direktere Auswertung der Enzymaktivitäten in Proteomen ermöglichen als die Ableitung dieser entscheidenden Parameter auf dem mRNA- oder Proteinniveau (keine solche Methode kann den

[*] Prof. B. F. Cravatt

The Skaggs Institute for Chemical Biology and
The Departments of Chemistry and Cell Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)

Fax: (+1) 858-784-8023

E-mail: cravatt@scripps.edu

C. Drahl, Prof. E. J. Sorensen

Department of Chemistry

Princeton University

Princeton, NJ 08544 (USA)

Fax: (+1) 609-258-1980

E-mail: ejs@princeton.edu

zahllosen posttranslationalen Mechanismen Rechnung tragen, die die Enzymfunktion in vivo regulieren).^[10]

Die Natur setzt eine große Zahl reaktiver kleiner Moleküle ein, um Protein-Targets kovalent zu modifizieren. Wir werden daher ausgewählte reaktive Naturstoffe betrachten, deren Protein-Targets gut charakterisiert sind. Dabei legen wir den Schwerpunkt auf Verbindungen, die ihre Aktivität in eukaryotischen Systemen entfalten. Für eine detaillierte Diskussion klassischer proteinreaktiver Naturstoffe, die auf prokaryotische Enzyme abzielen, z. B. β -Lactam-Antibiotika, die an der Zellwandbiosynthese beteiligte Peptidasen inhibieren, sei der Leser auf einige maßgebende Übersichten verwiesen.^[11] Wir werden ebenso wenig auf Naturstoffe eingehen, die andere Biomoleküle als Proteine kovalent modifizieren, etwa DNA-alkylierende Verbindungen, die bereits ausführlich an anderer Stelle zusammengefasst wurden.^[12] Schließlich werden wir in diesem Aufsatz solchen Themen besondere Beachtung schenken, die bei der Entwicklung neuer chemischer Proteomsonden von Bedeutung sein können. Es wird sich zeigen, dass der Naturstoff nicht notwendigerweise an einem katalytischen Nucleophil oder gar an einem Enzym angreifen muss. Über die allgemeine Elektrophil-Nucleophil-Wechselwirkung hinaus gewähren weitere Strategien wertvolle Einblicke, die chemischen Biologen helfen können, größere Teile des Proteoms für die Analyse durch ABPP zugänglich zu machen.^[13] Wir hoffen, dass unsere Beispiele bekräftigen werden, wie wertvoll bioaktive Naturstoffe für die Charakterisierung eines weiten Spektrums von Proteinfunktionen sein können.

2. Angriff auf katalytische Nucleophile in aktiven Zentren von Enzymen

Viele Naturstoffe erzielen eine selektive kovalente Inhibition, indem sie sich die Katalysemechanismen von Enzymen zunutze machen. In diesem Abschnitt werden wir einige Naturstoffe vorstellen, die an Schlüsselreste in den katalytisch aktiven Zentren von Enzymen binden.

2.1. Lipstatin

Lipstatin, ein selektiver und irreversibler Inhibitor von Pankreaslipase, wurde aus *Streptomyces toxytricini* isoliert (Schema 1).^[14] Die Struktur von Lipstatin wurde mithilfe von

spektroskopischen und chemischen Methoden^[15] bestimmt und durch eine chemische Synthese bestätigt.^[16] Lipstatin besteht aus einem β -Lactonring mit zwei linearen Ketten aus sechs und dreizehn Kohlenstoffatomen. Die längere Kette ist doppelt ungesättigt und trägt eine *N*-Formylleuciner-Seitenkette. Die Strukturanalyse machte eine auffallende Ähnlichkeit zwischen Lipstatin und Esterastin deutlich, einem Inhibitor der Esterase, der jedoch eine andere Aminosäure, *N*-Acetylasparagin, als Seitenkette enthält.^[17] Weitere Mitglieder dieser β -Lacton-Enzyminhibitorfamilie sind die Panticline,^[18] die Ebelactone^[19] und Valilacton (Schema 1).^[20] Die Gruppe um Bacher fand später heraus, dass sich Lipstatin biosynthetisch von der 3-Hydroxytetradeca-5,8-dienonsäure ableitet;^[21] diese Verbindung entsteht durch Kondensation von zwei Mycolsäure-Komponenten^[22] mit acht und vierzehn Kohlenstoffatomen, die wiederum beide im Fettsäurekatabolismus gebildet werden. Die Protonen an den C(2)- und C(3)-Positionen sowie ein Proton am C(4)-Atom stammen aus Wassermolekülen.^[21c] Dies widerspricht der ursprünglichen Annahme, dass Lipstatin aus der Polyketid-Biosynthese hervorgeht; Ergebnisse früherer Fütterungsexperimente mit [¹³C]Acetat waren nicht aussagekräftig.^[14a] Kürzlich wurde eine Totalsynthese von Lipstatin aus (*S*)-*N*-Formylleucin und (*S*)-(-)-Dimethylmalat beschrieben.^[23] Außerdem sind einige Synthesen von Tetrahydrolipstatin bekannt,^[16,24] das man durch katalytische Hydrierung von Lipstatin erhält.^[15]

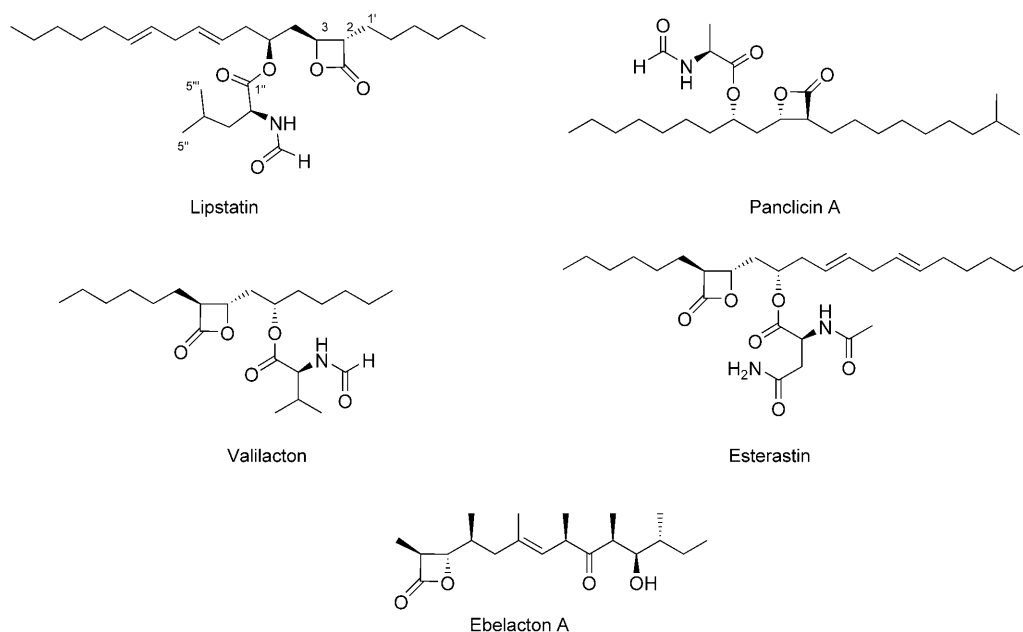
Die Pankreaslipase ist das Target von Lipstatin und seinen Derivaten. Das aktive Zentrum dieser Lipase ist ein Ladungsübertragungssystem, das demjenigen in Serinproteasen ähnelt und die katalytische Triade His-263, Asp-176 und Ser-152 enthält.^[25] Die Pankreaslipase hydrolysiert mit der Nahrung aufgenommene Triacylglyceride in Fettsäuren und Monoacylglyceride.^[26] Dieser katabolische Prozess ist für eine ordnungsgemäße Fettaufnahme entscheidend; eine Inhibition der Pankreaslipase bewirkt, dass der Organismus Fette mit dem Stuhl wieder ausscheidet. Tetrahydrolipstatin schränkt die Aufnahme von mit der Nahrung zugeführtem Fett ein, indem es die Aktivität von Pankreaslipase, Carboxyesterlipase, humaner Milchlipase sowie Magenlipase blockiert.^[22a] Tetrahydrolipstatin wurde von der FDA (Food and Drug Administration) im März 1999 als Medikament zugelassen. Heute ist es unter den Namen Orlistat und Xenical erhältlich und unterstützt adipöse Patienten bei der Gewichtsreduzierung.^[26b,27] Fettleibigkeit betrifft etwa ein Drittel der Bevölkerung der USA,^[26b] und man geht davon aus, dass viele Probleme und Krankheiten, etwa Diabetes Mellitus Typ II,



Carmen Drahl erhielt 2002 ihren B.A. in Chemie an der Drew University, der M.A. wurde ihr für Arbeiten in der Gruppe von G. McLendon an der Princeton University verliehen. Derzeit arbeitet sie in Princeton unter der Anleitung von E. J. Sorensen an ihrer Doktorarbeit. Zu ihren Forschungsinteressen zählen die Synthese und biologische Evaluierung von reaktiven Naturstoffen. Sie erhielt ein Barry-M.-Goldwater-Stipendium sowie ein Stipendium von Eli Lilly und der National Science Foundation.



Benjamin Cravatt studierte Biowissenschaften (B.S.) und Geschichte (B.A.) an der Stanford University. Anschließend arbeitete er in den Gruppen von D. Boger und R. Lerner und promovierte 1996 am Scripps Research Institute. Im Anschluss forschte er 1997 als Mitglied des Skaggs Institute for Chemical Biology sowie der Abteilungen für Zellbiologie und Chemie. Seine Arbeitsgruppe entwickelt neue Techniken zur Aufklärung der Rolle von Enzymen bei physiologischen und pathologischen Prozessen im Nervensystem und bei Krebserkrankungen.



Schema 1. Die Naturstoff-Familie der Lipstatine: Alle Mitglieder enthalten einen viergliedrigen β -Lactonring.

daraus resultieren. Diese Krankheit könnte durch eine Orlistat-Behandlung vermieden oder zumindest unter Kontrolle gebracht werden.^[28]

Tetrahydrolipstatin inhibiert außerdem die Thioesterase-domäne der Fettsäuresynthase (FAS), eines Enzyms, das mit der Proliferation von Tumorzellen in Verbindung gebracht wird.^[29] Die Behandlung von Prostata-tumorzellen mit Orlistat führt zur Apoptose; der Wirkstoff stoppt auch das Wachstum von Tumorenograften in Mäusen. Interessanterweise gelang es mithilfe eines ABPP-Screenings von Prostatakrebszellproteomen mit einer Fluorophosphonat-Rhodamin-Sonde, Orlistat als FAS-Thioesterase-Inhibitor und potenzielles Tumorthapeutikum zu charakterisieren.^[29]

Die chemische Reaktivität des β -Lactonrings bildet die Grundlage für die biologische Wirkung von Tetrahydrolipstatin und seinen Analoga. Das katalytische Serin-Nucleophil im aktiven Zentrum der Pankreaslipase greift das elektrophile β -Lacton am Carbonylkohlenstoffatom C(1) an und bildet einen β -Hydroxyserinester (Schema 2, Weg a).^[5,30] Theoretisch könnte der Angriff auch am C(3) unter Bildung eines stabilen Serinethers erfolgen (Schema 2, Weg b). Modifizierte Tetrahydrolipstatine (nach Enzymangriff und an-

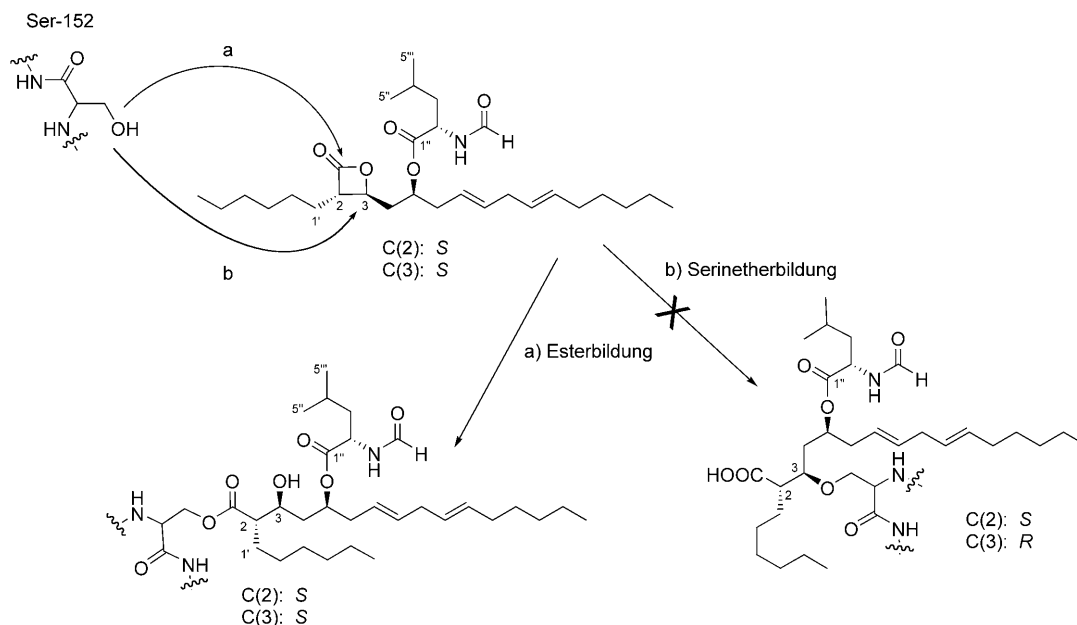
schließender Hydrolyse des Addukts) wurden synthetisiert und mit den Ergebnissen der Enzymreaktion verglichen. Produkte mit invertierter Konfiguration am C(3)-Atom, die aus einem Angriff an C(3) resultieren, wurden bestenfalls in Spuren gefunden. Diese Beobachtung spricht für einen Angriff am Carbonylkohlenstoffatom.^[30] Die Carbonylgruppe könnte durch einen Wasserstoffbrückendonator im aktiven Zentrum der Lipase aktiviert werden, möglicherweise ist jedoch schon die Freisetzung der Ringspannungsenergie ausreichend, um die Ringöffnung anzutreiben. In Abwesenheit wasserunlöslicher Substrate und bei pH 7.0 hydrolysiert die Acyl-Enzym-Zwischenstufe sehr langsam zu einer Hydroxysäure, die immer noch die Formylleucin-Seitenkette enthält, und die Enzymaktivität wird binnen 24 Stunden nahezu komplett wiederhergestellt.^[22a,30a]

Diese Reaktivität ähnelt derjenigen der β -Lactam-Antibiotika, die auf Peptidasen wirken, die an der Zellwandbiosynthese in Bakterien beteiligt sind (Schema 3). Man vermutet, dass das Serin-Nucleophil in den aktiven Zentren der Penicillin-Targetproteine am Carbonylkohlenstoffatom des Lactamrings angreift und somit unter Ringöffnung ein Penicilloyl-Enzym liefert.^[31] Bei der Clavulansäure geht man von einem komplizierteren Mechanismus aus, die grundlegenden Merkmale sind jedoch die gleichen wie für Lipstatin: Inhibition durch Ringöffnung und anschließende Wiederherstellung der Enzymaktivität durch die langsame Hydrolyse eines Enamins.^[32]

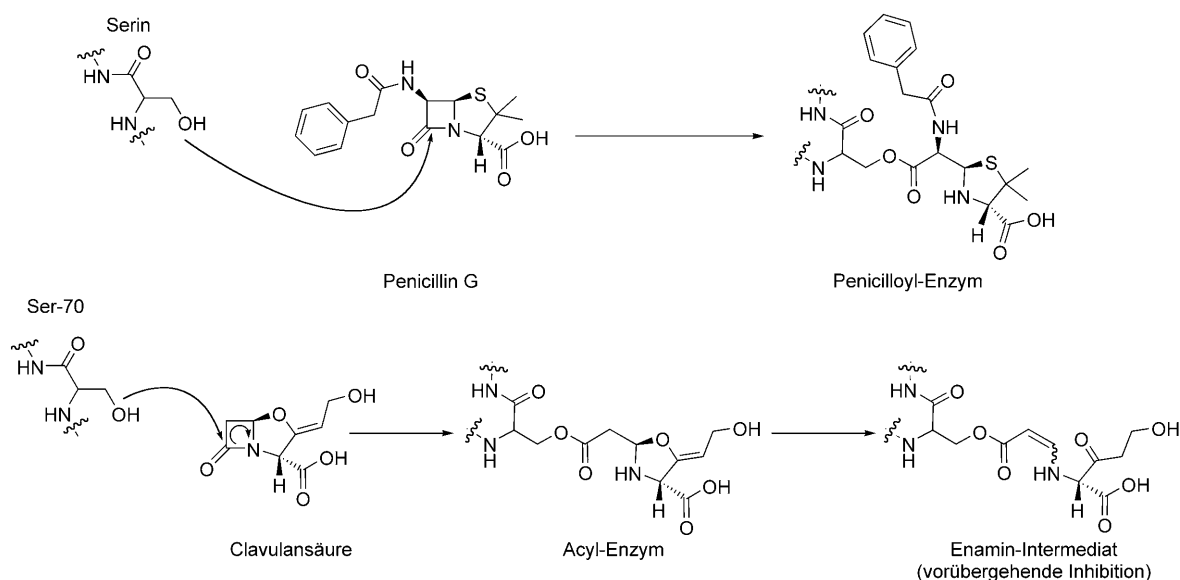
Das einfache reaktive Motiv in der Lipstatin-Familie ist ebenso lehrreich wie das Gerüst, das dieses Motiv umgibt. Prinzipiell können viele physiologische Nucleophile den Lactonring öffnen, doch die langen Alkylketten sorgen vermutlich dafür, dass Enzyme mit Lipidsubstraten bevorzugte Targets sind. Die Reaktivierungsdauer der Pankreaslipase durch die Hydrolyse der Acyl-Enzym-Zwischenstufe ist besonders interessant: Eine Untersuchung beschreibt eine



Erik J. Sorensen erhielt seinen B.A. an der Syracuse University. Er promovierte 1995 an der University of California, San Diego, unter der Anleitung von K. C. Nicolaou, mit dem er auch das Buch „Classics in Total Synthesis“ verfasste. Anschließend arbeitete er als Postdoktorand für S. Danishefsky. Er begann seine eigenständige Forschung 1997 am Scripps Research Institute, an dem er 2001 Associate Professor wurde. 2003 wechselte er an die Princeton University, wo er die Arthur Allan Patchett-Professur für organische Chemie innehat.



Schema 2. Zwei mögliche Mechanismen für die kovalente Modifizierung der Pankreaslipase durch Lipstatin. Die Reaktion verläuft ausschließlich an der Carbonylgruppe des β -Lactons.



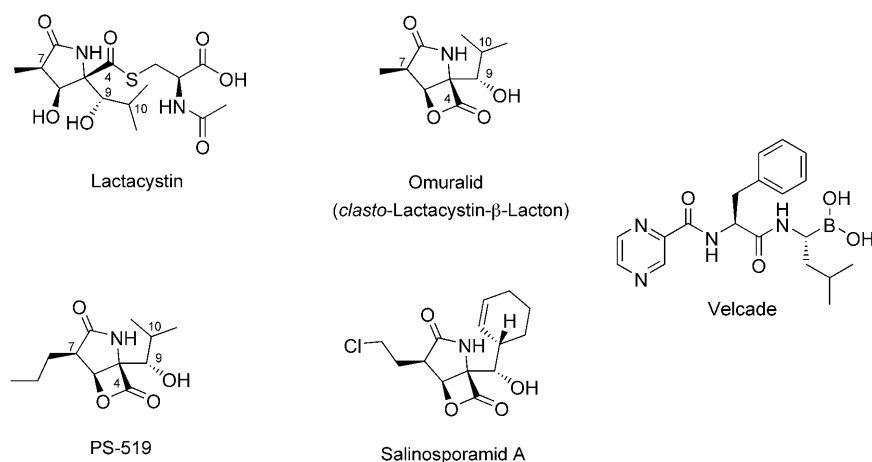
Schema 3. Grundlegende Reaktivität von β -Lactam-Antibiotika.

Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung auf das Dreifache in Gegenwart von Lipid-Wasser-Grenzflächen (k_r stieg von 2000 auf 6000 min^{-1}).^[33] Enzyme könnten somit in unterschiedlichen Umgebungen unterschiedliche Wechselzahlen haben, und die Selektivität von Lipstatin könnte nicht nur aus dem selektiven Angriff auf die Pankreaslipase resultieren, sondern auch aus einer sehr langsamen Umwandlung des Lipase-Lipstatin-Komplexes. Eine Variation des Gerüsts um das reaktive β -Lacton-Motiv sollte Lipstatin-artige chemische Sonden zugänglich machen, die weitere Lipaseenzyme oder sogar Enzyme aus anderen Familien als Targets erkennen.

2.2. Lactacystin

Bei der Suche nach Naturstoffen, die das Neuritenwachstum induzieren, isolierten Omura und Mitarbeiter Lactacystin (Schema 4) aus einem *Streptomyces*-Stamm.^[34] Seine interessante Struktur wurde mit Röntgenbeugung und NMR-Spektroskopie aufgeklärt^[35] und mehrfach durch Totalsynthesen bestätigt.^[36] Lactacystin wird ausgehend von drei Vorstufen biosynthetisiert: Leucin, Isobutytrat (und/oder Valin) und Cystein.^[37]

Weitere Nachforschungen ergaben, dass Lactacystin nicht die Nervenwachstumsfaktoren imitiert,^[38] sondern vielmehr spezifisch mit dem Proteasom reagiert, indem es kovalent an



Schema 4. Lactacystin und verwandte Proteasomeninhibitoren. Der synthetische Inhibitor Velcade ist für die klinische Behandlung von multiplen Myelomen zugelassen.

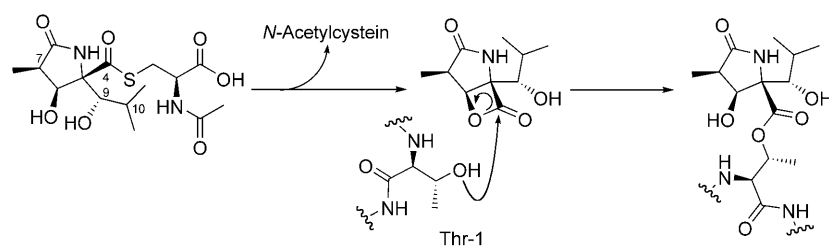
die hoch konservierte N-terminale Threonin-Hydroxygruppe bindet und damit die Chymotrypsin- und Trypsin-artigen Proteasomenaktivitäten irreversibel inhibiert.^[38b] Das Proteasom ist eine hochgradig ATP-abhängige zelluläre Protease für den Abbau geschädigter Proteine.^[39] Mit wenigen Ausnahmen wirkt es auf Proteine, die durch kovalente Markierung mit dem kleinen Protein Ubiquitin für den Abbau gekennzeichnet sind.^[39] Das Proteasom schließt einen fassförmigen Hohlraum ein, innerhalb dessen eine kontrollierte Proteolyse stattfinden kann; er ist an beiden Enden durch ein regulatorisches Protein verschlossen.^[39] Der durch Lactacystin modifizierte N-terminale Threoninrest dient als Nucleophil im aktiven Zentrum des Proteasoms.^[38b, 40] Das Proteasom enthält keine katalytische Triade, benötigt jedoch eine basische Gruppe, die im Übergangszustand ein Proton von Threonin übernimmt. Diese Aufgabe fällt höchstwahrscheinlich der α -Aminogruppe von Thr-1 zu; eine Kristallstrukturanalyse des Komplexes aus Proteasom und Lactacystin zeigte, dass diese Gruppe für die Aufnahme eines Protons ideal positioniert ist.^[41] Alternativ könnte das konservierte Lys-33 diese Rolle spielen, denn die Mutation dieses Rests hebt die Proteasomenaktivität komplett auf.^[42] Lactacystin wirkt nicht inhibitorisch auf die Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin sowie die Cysteinproteasen Papain, die Calpaine oder Cathepsin B;^[38b] es inhibiert jedoch die Serinprotease Cathepsin A durch kovalente Anknüpfung.^[43] Da Lactacystin ein recht selektiver Proteasomeninhibitor ist, hat es sich als Sonde bei der Untersuchung des Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechsels bewährt.^[44]

Über die Jahre wurden unterschiedliche Familien von Proteasomeninhibitoren entwickelt, um das Ubiquitin-Proteasom-System zu studieren. Die frühesten synthetischen Inhibitoren, C-terminale Peptidaldehyde, hatten eine zu geringe Selektivität zugunsten des Proteasoms gegenüber Serin- und Cysteinproteasen.^[40] Bestimmte C-terminal mit einer Vinylsulfon- oder Glyoxal-Einheit modifizierte Tripeptide wirken als mechanismusbasierte Proteasomeninhibitoren,^[39b, 45] und auch Boronsäurepeptide (in denen anstelle des

Aldehyd-Pharmakophors eine Boronatgruppe vorliegt) sind sehr wirksame und selektive Proteasomeninhibitoren. Das wichtigste dieser Boronate, PS-341,^[40, 46] wurde kürzlich für die klinische Behandlung von multiplen Myelomen zugelassen (Velcade (Bortezomib), Schema 4). Damit gilt das Proteasom zumindest für diese Form von Krebs (potenziell jedoch auch für andere Formen) als ein therapeutisches Target.^[47] Im Unterschied zu Lactacystin inhibiert Velcade die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms reversibel.^[40] Das klinisch am weitesten fortgeschrittene Lactacystin-Analogon ist PS-519 (Schema 4), eine zellgängige Variante mit einem *n*-Propyl-Substituenten an C(7). Diese Verbindung ist wirksamer als der Naturstoff und trat bezüglich der Behandlung akuter Schlaganfälle vor kurzem in die klinischen Phase-II-Tests ein.^[40, 48]

Die Reaktivität von Lactacystin beruht auf seinem latenten β -Lacton, *clasto*-Lactacystin- β -Lacton oder Omuralid genannt (Schema 4).^[49] Derivate, die dieses β -Lacton nicht bilden können, sind inaktiv. Omuralid wird im extrazellulären Medium durch Cyclisierung (Lactonisierung) von Lactacystin unter Abspaltung von *N*-Acetylcystein gebildet. Das resultierende Omuralid ist zellgängiger als die Ausgangsverbindung,^[40, 49] und es inhibiert die Proteasomenaktivitäten 15- bis 20-mal schneller als Lactacystin.^[38] Das Kohlenstoffatom C(4) dieses Lactons ist elektrophil und wird vermutlich durch die Hydroxygruppe des katalytisch aktiven Threonins angegriffen,^[44b] sodass ein über eine Esterbindung verknüpftes Omuralid-Proteasom-Addukt entsteht (Schema 5). Die „Maskie-

ring“ des reaktiven β -Lactons als offener Thiolester ist wichtig, um zu vermeiden, dass Lactacystin falsche Targets angreift. Mehrere Arbeitsgruppen konnten belegen, dass Lactacystin alle aktiven Proteasom- β -Untereinheiten markiert.^[39b, 50] Interessanterweise beschleunigt ein Austausch des katalytischen N-terminalen Threoninrests gegen einen Serinrest die Inaktivierung des Proteasoms durch Omuralid um das Fünffache. Dieser Austausch erhöhte auch die Geschwindigkeit der Hydrolyse der Acyl-Enzym-Zwischenstufe.^[51] Diese Ergebnisse könnten erklären, warum Omuralid und Lactacystin sehr wenige Serinproteasen inhibieren: Serin-Omu-



Schema 5. Die Lactonisierung von Lactacystin führt zu dem zellpermeablen Derivat Omuralid, das anschließend das Proteasom durch kovalente Bindung inaktiviert.

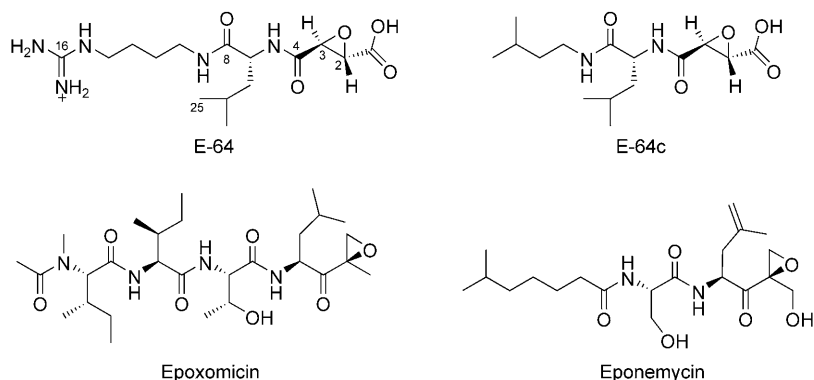
ring“ des reaktiven β -Lactons als offener Thiolester ist wichtig, um zu vermeiden, dass Lactacystin falsche Targets angreift. Mehrere Arbeitsgruppen konnten belegen, dass Lactacystin alle aktiven Proteasom- β -Untereinheiten markiert.^[39b, 50] Interessanterweise beschleunigt ein Austausch des katalytischen N-terminalen Threoninrests gegen einen Serinrest die Inaktivierung des Proteasoms durch Omuralid um das Fünffache. Dieser Austausch erhöhte auch die Geschwindigkeit der Hydrolyse der Acyl-Enzym-Zwischenstufe.^[51] Diese Ergebnisse könnten erklären, warum Omuralid und Lactacystin sehr wenige Serinproteasen inhibieren: Serin-Omu-

ralid-Addukte können schnell hydrolysiert werden, sodass die Inhibition aufgehoben wird.^[44a] Besonders bemerkenswert ist, wie hervorragend die Aktivität und Selektivität von Lactacystin durch seine chemische Reaktivität gesteuert werden.

Eine Kristallstrukturanalyse des Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* mit angebundenem Omuralid bestätigte die kovalente Verknüpfung zwischen der Hydroxygruppe der Threonin-Seitenkette und Omuralid.^[41] Die N-terminale Aminogruppe wird durch den Naturstoff nicht modifiziert. Omuralid bildet vier Wasserstoffbrücken mit der Hauptkette der katalytischen Untereinheit des Proteasoms. Der Isopropylsubstituent an C(9) von Omuralid ragt in eine hydrophobe Tasche des Proteasoms und erhöht so die Bindungsaffinität. Corey und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch den Austausch dieser Isopropylgruppe gegen eine Phenylsubstituenten jegliche Aktivität von Omuralid verlorengeht.^[52] Interessanterweise hat der Naturstoff Salinosporamid A (Schema 4), ein 35-mal wirksamerer Inhibitor, die gleiche bicyclische Struktur wie Omuralid, es trägt jedoch einen Cyclohexenring anstelle der Isopropylgruppe.^[53] Feling und Mitarbeiter betrachteten dies als einen Hinweis darauf, dass Omuralid und Salinosporamid A auf unterschiedliche Arten mit dem Proteasom wechselwirken.^[53] Die Gruppe um Corey berichtete kürzlich über die erste enantiospezifische Totalsynthese von Salinosporamid A,^[54] die ausreichende Mengen für biologische Untersuchungen zur Wirksamkeit von Salinosporamid A als potenzielles Tumorthérapeutikum lieferte. Mit Blick auf die Therapie von proteasomenvermittelten Krankheiten wurden kürzlich außerdem verwandte Verbindungen synthetisiert.^[55] Es wird sich zeigen, ob Salinosporamid A eine Verbesserung gegenüber Lactacystin und dessen heikel ausbalancierter Chemie darstellt.

2.3. E-64

1978 suchte die Gruppe um Hanada nach einem spezifischen Inhibitor von Cysteinproteasen, um die biologische Funktionen dieser Proteasen weiter aufzuklären. Dabei isolierten sie den hoch wirksamen und irreversiblen Inhibitor E-64 aus dem Schimmelpilz *Aspergillus japonicus*.^[56] Die Grundzüge der Struktur von E-64 wurde durch klassische chemische Reaktivitätsuntersuchungen sowie IR-Spektroskopie und ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt und schließlich durch die chemische Synthese seines Enantiomers bestätigt.^[57] Die Verbindung enthält Agmatin (1-Amino-4-guadinobutan), das Decarboxylierungsprodukt von Arginin (Schema 6). Zur Identifizierung eines E-64-Pharmakophors wurde eine umfassende Bibliothek von Derivaten und Fragmenten synthetisiert. Sowohl der Epoxidring als auch die Carboxygruppe der L-*trans*-(S,S)-Epoxybernsteinsäure-Einheit erwiesen sich für die Inhibition von Papain als unverzichtbar.^[58] Außerdem wurden weitere Peptidylepoxid-Naturstoffe identifiziert, die als kovalente Inhibitoren des Pro-



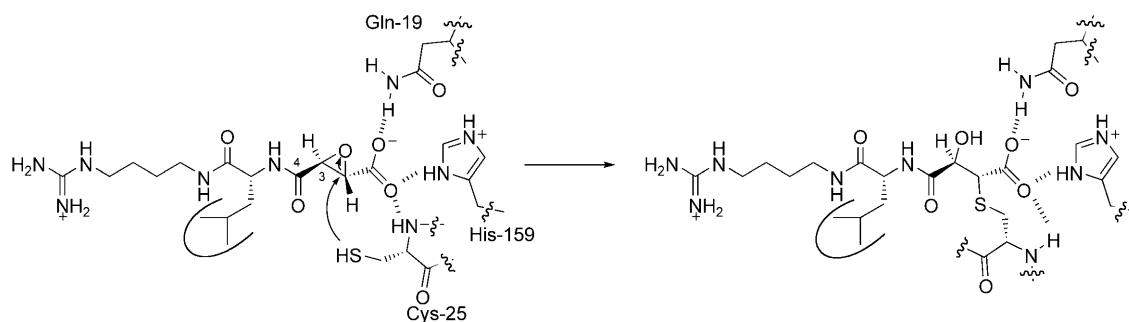
Schema 6. E-64 und weitere L-*trans*-(S,S)-Epoxybernsteinsäure-Derivate.

teasoms wirken, darunter Epoxomicin^[59] und Eponemycin^[60] (Schema 6).

E-64 wirkt nicht nur auf Papain als kovalenter Inhibitor, sondern auch auf weitere Cysteinproteasen wie die Cathepsine B, H und L, (Stamm-)Bromelain sowie Ficin.^[61] Die Entdeckung, dass der hochaffine reversible Inhibitor Leupeptin, der auf aktive Zentren wirkt, die Geschwindigkeit der E-64-Bindung herabsetzte, ließ einen Angriff von E-64 am aktiven Zentrum von Cysteinproteasen vermuten.^[61] Die katalytische Aktivität dieser Proteasen rührt von Ionenpaarwechselwirkungen zwischen Cystein- und Histidinresten im aktiven Zentrum her;^[62] in Papain sind dies die Reste Cys-25 und His-159.^[62]

Eine anomale Cysteinprotease-Aktivität führt zu vielen Krankheiten: Entzündungen und traumatische Prozesse, Muskeldystrophie, Alzheimer-Krankheit, Krebs sowie die Bildung von Grauem Star werden mit Dysfunktionen von Cysteinproteasen in Verbindung gebracht.^[63] Darüber hinaus werden Cysteinproteasen wegen ihrer entscheidenden Funktion im Lebenszyklus von *Plasmodium* als Targets für potenzielle Antimalariamittel in Betracht gezogen.^[64] Bei einem Versuch, die Zellgängigkeit der Leitstruktur zu verbessern, wurde die Agmatin-Einheit von E-64 durch eine neutrale Isoamylamin-Einheit ersetzt (E-64c, Schema 6).^[65] 1986 wurde der Ethylester von E-64c in Japan aus klinischen Phase-III-Tests zur Behandlung von Muskeldystrophie zurückgezogen, da er einerseits nicht so wirksam war wie erwartet und andererseits Proteine anderer Klassen kovalent modifizierte.^[63d,66] Dasselbe E-64-Derivat hat jedoch wegen seiner Calpain-inhibierenden Wirkung in Augentropfen zur Vorbeugung und Behandlung von Grauem Star Verwendung gefunden.^[67] E-64 wird immer noch eingesetzt, um neue Enzyme der Papain-Klasse zu entdecken und nach der Isolierung zu charakterisieren.^[68]

Molekulare ABPP-Sonden auf der Grundlage von E-64 erwiesen sich als besonders wertvoll bei der Bestimmung der Aktivitäten tierischer und pflanzlicher Cysteinproteasen in ganzen Proteomen sowie beim Design und Screening von Inhibitoren für diese Enzyme.^[68a,b] So zeigte beispielsweise ein Screening von Pflanzenextrakten eine Cysteinprotease-Aktivität für drei Proteine, die zuvor noch nicht charakterisiert werden konnten.^[68a] Beim Vergleich von Extrakten aus reifen und gealterten Blättern durch ABPP erwies sich, dass eine Änderung bei den mRNA-Transkriptionsniveaus nicht



Schema 7. Der Cysteinrest im aktiven Zentrum von Papain greift die elektrophile Epoxyfunktion von E-64 in einer S_N2 -Reaktion an.

immer mit der Proteaseaktivität korrelierte.^[68a] Darüber hinaus entdeckte man mithilfe einer zellpermeablen E-64-Sonde, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhter Cathepsin-Aktivität und der Gefäßneubildung sowie der invasiven Front von Karzinomen besteht.^[69] Im Einklang mit diesen Ergebnissen hemmte ein Cathepsin-Breitbandinhibitor das Wachstum von Tumoren und verringerte ihre Invasivität.

Die Reaktion des Epoxids E-64 mit Papain wurde durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie aufgeklärt.^[70] Der S_N2 -Rückseitenangriff des katalytischen Cysteinucleophils am C(2)-Atom des Epoxidrings^[70,71] führte zur Inversion am C(2)-Atom der Thioether (Schema 7). Schlüsselkontakte zwischen den Cysteinproteasen und E-64, die den Epoxidring des Inhibitors für einen regioselektiven nucleophilen Angriff ausrichten, wurden in einer Reihe von Kristallstrukturanalysen charakterisiert.^[57,71,72] Im Komplex aus E-64 und Papain befindet sich die N-terminale Carboxygruppe von E-64 im „Oxyanion-Loch“. Die dem Epoxidring benachbarte Carbonylgruppe tritt mit der katalytischen Histidinbase in Wechselwirkung.^[71] Die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen E-64 und Cystein-Proteasen der Papain-Klasse ist ein hervorragendes Beispiel für das Zusammenspiel von chemischer Synthese, klassischer Biochemie und Strukturbiochemie.

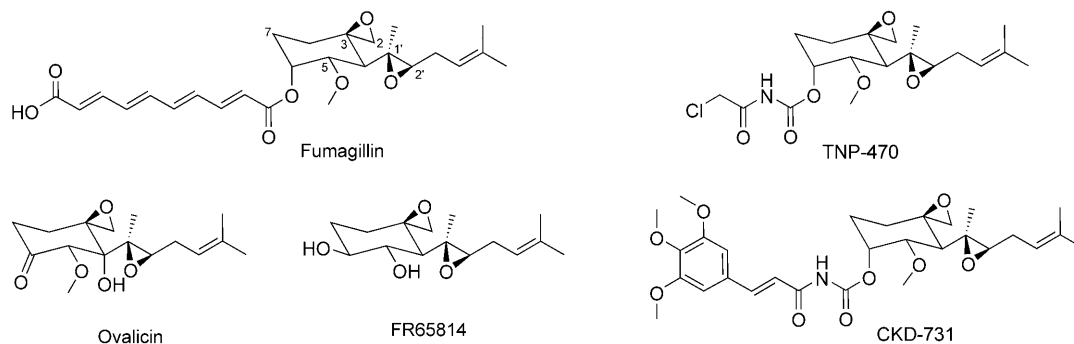
3. Angriff auf „nichtnucleophile“ Reste in aktiven Zentren von Enzymen

Einige Naturstoffe inhibieren Enzyme durch kovalente Bindung an Aminosäuren im aktiven Zentrum, die keine entscheidende katalytische Funktion ausüben. Obgleich

einige dieser Reste die Katalyse zu unterstützen scheinen, nehmen sie doch nicht direkt als Nucleophile an der Umsetzung teil; andere Reste scheinen für die Katalyse sogar überflüssig zu sein. Wichtig ist jedoch, dass die kovalente Modifikation dieser Reste in allen Fällen zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Im Folgenden führen wir ausgewählte Naturstoffe an, die „nichtnucleophile“ Reste in den aktiven Zentren von Enzymen angreifen.

3.1. Fumagillin

Ein Bericht aus dem Jahr 1949 belegte, dass Konzentrate von *Aspergillus-fumigatus*-Kulturen eine antibiotische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* haben.^[73] Tarbell und Mitarbeiter charakterisierten das chemische Verhalten der aktiven Komponente, Fumagillin, einschließlich der Säureempfindlichkeit seiner charakteristischen Spiroepoxid-Einheit.^[74] Die Struktur und die Konfiguration wurden mit Röntgenbeugungsexperimenten bestätigt (Schema 8).^[75] 1972 veröffentlichten Corey und Snider ihre eleganten Untersuchungen, die zu der ersten chemischen Synthese dieses Naturstoff führten.^[76] Anschließend wurden eine 26-stufige Synthese von (–)-Fumagillol,^[77] dem Verseifungsprodukt von Fumagillin, und eine 13-stufige Synthese von racemischem Fumagillol erarbeitet.^[78] Das ungewöhnliche Sesquiterpen-Kohlenstoffgerüst von Fumagillin und den verwandten Verbindungen Ovalicin^[79] und FR65814 (Schema 8)^[80] stammt Markierungsexperimenten zufolge biosynthetisch von β -trans-Bergamoten ab, das wiederum aus Farnesylpyrophosphat entsteht.^[81] Weitere Beispiele für Naturstoffe mit Spiro-



Schema 8. Fumagillin und weitere proteinreaktive Spiroepoxide. TNP-470 und CKD-731 sind synthetische Verbindungen.

epoxidstruktur, die nicht der Fumagillin-Familie angehören, sind Curvularol^[82] und FR901464.^[83]

Fumagillin und weitere Mitglieder seiner Familie inhibieren die Methionin-Aminopeptidase 2 (MetAP-2), jedoch nicht die eng verwandte Methionin-Aminopeptidase 1 (MetAP-1).^[6b,84] Diese Metalloproteasen bewirken die co-translationale Abspaltung von N-terminalen Methioninresten in spezifischen Protein-Targets.^[6b,85] Man nahm ursprünglich an, dass die Enzyme Cobaltionen im aktiven Zentrum enthalten, neuere Untersuchungen deuten jedoch auf Mangan als physiologisch relevanten Cofaktor.^[86] Im aktiven Zentrum des Enzyms wird das Metallion durch Asp-251, Asp-262, His-331, Glu-364, Glu-459 sowie durch ein Wassermolekül koordiniert.^[87] Die Nucleophilie des Wassermoleküls wird dabei durch die Koordination an das Manganion erhöht, sodass es die Amidbindung des Substrats angreifen kann.^[88] Durch die Abspaltung von Methioninresten durch MetAPs werden posttranslationale Modifikationen, etwa die Myristoylierung, möglich.^[89] Ein einzelner Aminosäurerest in MetAP-2, Ala-362, verleiht eine Empfindlichkeit gegenüber Ovalicin, und eine Thr362Ala-Mutation im humanen MetAP-1-Gen führte nach Übertragung in Hefe zu Ovalicin-empfindlichen Hefekolonien.^[90]

Die Beziehung zwischen der Inhibition von MetAP-2 und den medizinischen Eigenschaften von Fumagillin ist bislang nicht aufgeklärt;^[91] man spekuliert über einen möglichen Einfluss auf die Protein-Myristoylierung.^[92] Ohne Abspaltung der N-terminalen Methioninreste können die Proteine in vivo nicht myristoyliert werden, was wiederum ihre Lokalisation und Funktion stören könnte. Demnach könnte Fumagillin indirekt eine Unterbrechung des Zellzyklus verursachen, indem es die Myristoylierung behindert und so die subzelluläre Lokalisation von bislang nicht identifizierten Proteinen verändert.^[92] Trotz seines noch immer unbekannten Wirkmechanismus ist Fumagillin als wirksames Antiparasitikum etabliert.^[93] In den 1950er Jahren diente es beim Menschen zur Behandlung der Amöbenruhr, die durch *Endamoeba histolytica* verursacht wird, und heute verwendet man es gegen die Frühjahrsschwindsucht bei Honigbienen, die durch die Protozoe *Nosema apis* ausgelöst wird.^[93a,b] Kürzlich erwies sich Fumagillin als wirksam gegen mikrosporidiale Keratokonjunktivitis im Auge, die durch einen einzelnen Pilz verursacht wird.^[94] Fumagillin und sein halbsynthetisches Derivat TNP-470 (Schema 8) sind die einzigen Wirkstoffe für die Behandlung von Mikrosporidiose in HIV-positiven Patienten,^[95] und in vitro blockieren sie das Wachstum von *Plasmodium falciparum* und *Leishmania donovani*, den Erregern von Malaria und Leishmaniose.^[96] Das breite Spektrum antiinfektiver Aktivität von Fumagillin hat jedoch auch seinen Preis: Für Säugetiere ist der Wirkstoff toxisch, was auf eine mangelnde Unterscheidung zwischen der MetAP-2 des Parasiten und dem Säugetierenzym hindeutet.^[97]

Die Entdeckung der Gruppe um Folkman, dass Fumagillin die tumorinduzierte Angiogenese inhibiert, ließ das Interesse an diesem Naturstoff wieder aufleben.^[98] TNP-470, ebenfalls ein vielversprechender niedermolekularer Inhibitor der Angiogenese, wird bereits in klinischen Studien als mögliches Tumorthapeutikum getestet.^[99] Mithilfe eines

Homologiemodells auf der Grundlage der Kristallstruktur von MetAP-2 entwarfen Han und Mitarbeiter CKD-731, ein Analogon, das 1000-mal wirksamer gegen die Endothelzellproliferation ist als TNP-470 (Schema 8).^[100]

Neue Ergebnisse sprechen dafür, dass MetAP-2 nicht unbedingt das maßgebliche biologische Target von Fumagillin ist und dass MetAP-2 für das Wachstum von Endothelzellen nicht notwendig ist.^[101] Eine funktionelle Beteiligung von MetAP-2 konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, da der Knockdown der Peptidase durch siRNA nicht quantitativ war. Die Autoren verwiesen jedoch auf die faszinierende Möglichkeit, dass beim Menschen eine weitere MetAP existieren könnte, die ebenfalls als Target für Fumagillin infrage kommt.^[101]

Das reaktive Schlüsselmotiv von Fumagillin ist die Spiroepoxidstruktur.^[6] Beim Entfernen dieser Funktionalität sinkt die Fähigkeit zur MetAP-2-Inhibition um den Faktor 1000.^[84] Fumagillin enthält zudem noch eine Epoxygruppe in der Seitenkette, die für die MetAP-2-Inhibition jedoch nicht notwendig ist.^[84] Eine Kristallstrukturanalyse des Komplexes von humanem MetAP-2 mit Fumagillin bestätigte die kovalente Bindung zwischen dem Imidazol-Stickstoffatom (Nε2) des Histidinrests His-231 und der Methylengruppe aus dem Spiroepoxid (Abbildung 1).^[87] Da His-231 als Nucleophil den

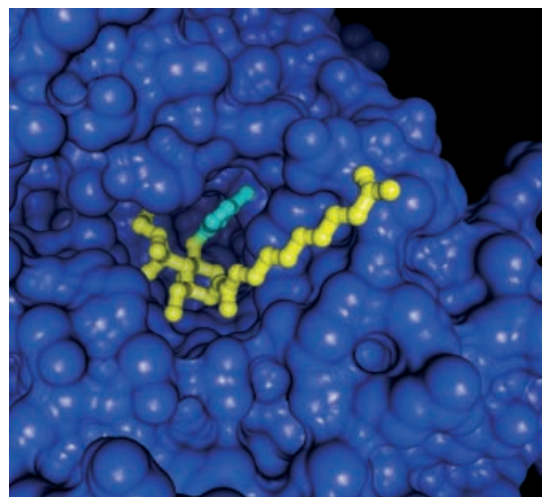
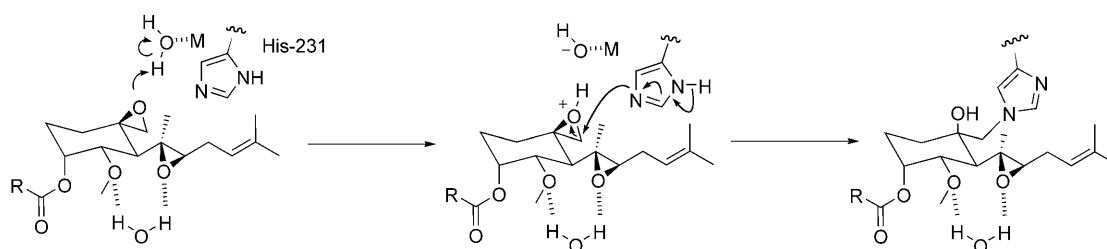


Abbildung 1. Röntgenstrukturanalyse des Komplexes aus humanem MetAP-2 und Fumagillin. In der Darstellung ist die kovalente Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom C(11) des Naturstoffs Fumagillin (gelb) und dem Stickstoffatom Nε2 von His-231 (türkis) im aktiven Zentrum zu erkennen; die restliche Moleküloberfläche von MetAP-2 ist blau wiedergegeben.

Spiroepoxidring öffnet, nahm man an, dass es bei der Katalyse als allgemeine Base fungiert.^[84] Dabei ging man davon aus, dass His-231 zusammen mit den beiden Metallionen ein Wassermolekül für den Angriff auf die Amidbindung vorbereiten könnte, woraufhin ein weiterer Histidinrest im aktiven Zentrum, His-339, die Abgangsgruppe protonieren würde.^[84] Der Aufbau des aktiven Zentrums in MetAP-2 aus *E. coli* stützt diese Theorie jedoch nicht.^[102] Schema 9 zeigt ein Modell für die Markierung von MetAP-2 mit Fumagillin.^[103] Übergangszustandsanaloga sowie eine kristallographi-



Schema 9. Ein Modell für die Modifizierung von MetAP-2 durch Fumagillin geht davon aus, dass ein Histidinrest in der MetAP-2-Substratbindungstasche den protonierten Epoxidring öffnet. Fumagillin wird bei niedrigen pH-Werten stärker gebunden.^[103]

sche Analyse lieferten weitere Einblicke in den Mechanismus der Katalyse durch *E.-coli*-MetAP:^[102–104] Demzufolge stabilisiert His-79 der MetAP aus *E. coli* (analog zu His-231 in humaner MetAP-2) die tetraedrische Zwischenstufe, die beim Angriff eines aktivierten Hydroxids auf das Peptid entsteht, indem es direkt mit dem Stickstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung wechselwirkt. Somit scheint der Histidinrest, der durch Fumagillin angegriffen wird, eine wichtige unterstützende Rolle bei der Katalyse zu spielen; dies erklärt wiederum die drastisch verringerte Enzymaktivität der His231Asn-MetAP-2-Mutante.^[84] Die Wirkung von Fumagillin gegenüber MetAP-2, die ein Wassermolekül als Nucleophil für die Hydrolyse der Peptidbindung verwendet, unterstreicht die bemerkenswerte Fähigkeit von Naturstoffen, auch aktive Zentren von Enzymen selektiv zu markieren, die keine kovalente Katalyse eingehen.

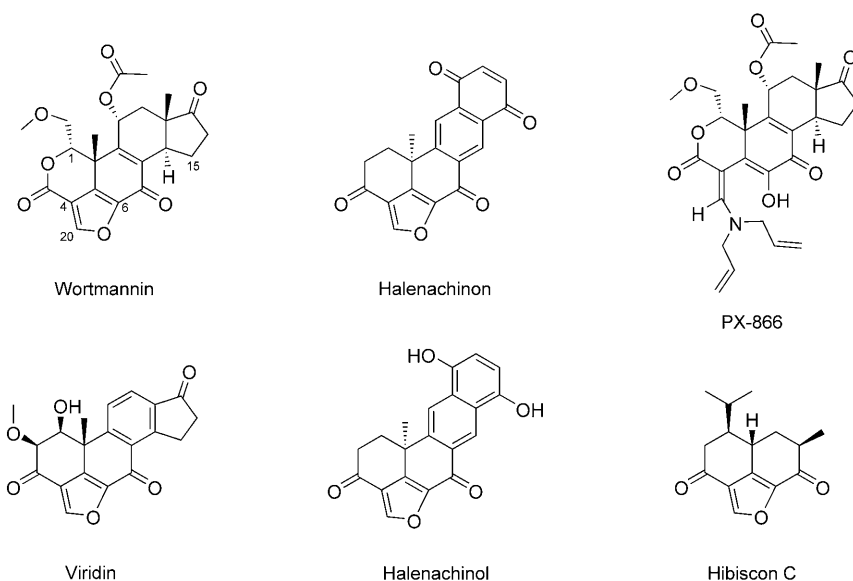
3.2. Wortmannin

Das antifungale Antibiotikum Wortmannin (Schema 10) wurde aus *Penicillium wortmannii* isoliert, und seine komplexe Struktur wurde durch chemischen Abbau und NMR-Spektroskopie bestimmt.^[105] Das zentrale Element von Wortmannin ist sein reaktiver Furanring, der zwischen C(4) und C(6) an das Steroidgerüst anelliert ist.^[106] Dieses Motiv findet man auch in Viridin, Demethoxyviridin sowie in den marinen pp60^{v-src}-Proteintyrosinkinase-Inhibitoren Halenachinon und Halenachinol, ebenso wie in Hibiscin C (Gmelofuran) aus dem Kernholz von *Gmelina arborea* und im Jamaikanischen Blauholz (Schema 10).^[107]

Wortmannin^[108] und das verwandte Viridin^[109] werden aus dem Triterpenoidalkohol Lanosterol biosynthetisiert^[110] und sind wirksame zellpermeable Inhibitoren der Lipidkinase Phosphatidylinosit-3-kinase (PI-3-Kinase). Dieses Enzym ist ein zentraler Bestandteil in zwei rezeptorvermittelten Signaltransduktionswegen:^[111] dem Weg mit G-Protein-gekoppeltem Rezeptor und dem Rezeptor-Tyrosinkinase-Weg. Die PI-3-Kinase phosphoryliert den Inositolring von Phosphatidylinosit (PtdIns) in 3-Position, was zur Produktion der Second-Messenger-Moleküle PtdIns-3-phosphat, PtdIns-3,4-diphosphat

und PtdIns-3,4,5-triphosphat führt. Der genaue Katalysemechanismus der PI-3-Kinase ist noch unbekannt.^[112] Bei der PI-3-Kinase aus Schweinen wird der Kontakt mit den ATP- α - und ATP- β -Phosphaten durch die konservierten Seitenketten Lys-833 bzw. Ser-806 vermittelt. Ein früheres Modell für den Mechanismus bezog Asp-946 ein, das die Hydroxygruppe des Lipidsubstrats deprotoniert und ein Nucleophil erzeugt, das am γ -Phosphat von ATP angreifen kann. Obwohl Mutationen an dieser Stelle die Aktivität auslöschen, deutet die Struktur der PI-3-Kinase im Kristall an, dass der Asparaginsäurerest nicht angemessen positioniert ist, um als katalytische Base zu wirken. His-948 wurde als alternative Base postuliert, bislang fehlen jedoch experimentelle Beweise für diese Theorie.^[112b] Abgesehen davon könnte die PI-3-Kinase auch ohne Basenkatalysator wirken und stattdessen einen dissoziativen Übergangszustand bilden.^[113]

Außer bei dem gut untersuchten Lipidkinase-Target wirkt Wortmannin auch bei anderen Serin/Threonin-Kinasen als Inhibitor, etwa bei mTOR, dem Target von Rapamycin in Säugetieren, und der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK),^[114] ebenso wie bei der Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK), dem Gentamicinresistenzenzym AAC(6')-APH-(2'') sowie einer membrangebundenen PI-4-Kinase.^[115]



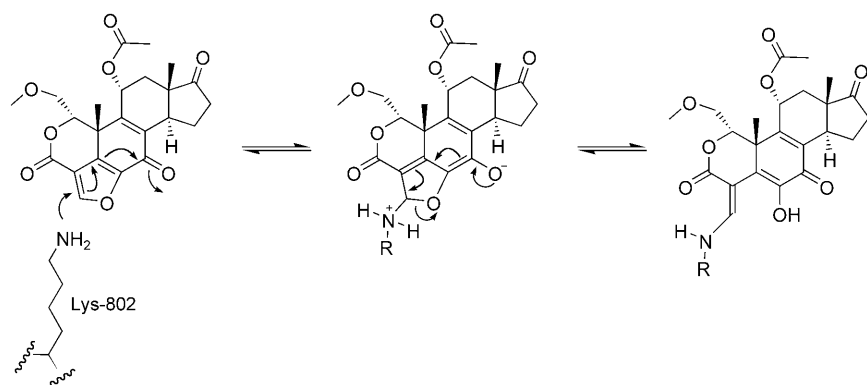
Schema 10. Steroid-Naturstoffe der Wortmannin-Familie. PX-866 wurde aus Wortmannin synthetisiert.

PI-3-Kinasen sind an vielen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, beispielsweise an der Apoptose, der Proliferation, der Zellbeweglichkeit und -adhäsion. Sie wurden auch mit der Umwandlung von normalen in maligne Zellen in Verbindung gebracht. Erhöhte Niveaus an PI-3-Kinase-Produkten wurden bei Dickdarmtumoren und Brustkrebsarten gefunden.^[116] Außerdem wurde beschrieben, dass die Dephosphorylierung von PI-3-Kinase-Produkten die Tumorbildung unterdrückt.^[117] Als Inhibitoren der PI-3-Kinase von Wirbeltieren sind Wortmannin und strukturell verwandte Verbindungen potenzielle Therapeutika zur Behandlung humaner Neoplasmen und anderer Krankheiten wie Diabetes, Entzündungen, Blutplättchenaggregation, Arteriosklerose und Osteoporose. Zehn Verbindungen aus einer halbsynthetischen Bibliothek von Wortmannin-Derivaten wurden in pharmakokinetischen Studien und Toxizitätsuntersuchungen geprüft.^[118] PX-866 (Schema 10), ein Diallylaminoderivat von Wortmannin ohne Furanring hatte gute pharmakokinetische und toxikologische Eigenschaften und bewirkte eine längere Inhibition der PI-3-Kinase in vivo. Diese Verbindung verstärkte auch die Antitumorwirkung des etablierten Chemotherapeutikums Cisplatin.^[119] Man vermutete, dass Verbindungen ohne Furanring chemisch stabiler sein oder sich besser an die ATP-Bindungstasche anpassen könnten.^[118]

Aminnucleophile greifen den doppelt aktivierten und hochgradig elektrophilen, gespannten Furanring von Wortmannin am C(20)-Atom an und erzeugen über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus vinyloge Carbamate.^[120] Die Gruppe um Wipf stellte kürzlich eine Bibliothek aus 94 C(20)-substituierten halbsynthetischen Wortmannin-Derivaten her, indem sie den Naturstoff mit einem breiten Spektrum an Amin- und Thiolnucleophilen umsetzten.^[118] Wymann und Mitarbeiter entdeckten, dass derartige Reaktionen insbesondere auch im aktiven Zentrum der PI-3-Kinase stattfinden.^[121] Die ϵ -Aminogruppe von Lys-802 der PI-3-Kinase (Lys-833 in Schweine-PI-3-Kinase)^[122] greift am C(20)-Atom von Wortmannin an, und unter Öffnung des Furanrings entsteht ein vinyloges Carbamat (Schema 11). Diese kovalente Verknüpfung inhibiert das Enzym irreversibel. Die Isolierung der Wortmannin-markierten Peptide wird durch die Säureempfindlichkeit der vinylogen Carbamatgruppe er-

schwert, diese Gruppe konnte jedoch mit Natriumcyanoborhydrid unter Bildung eines stabileren Amin-Wortmannin-Addukts reduziert werden. Wenn sie vor dem Inhibitor zugegeben wurden, interferierten ATP, Adenin und FSBA (5'-*para*-Fluorsulfonylbenzoyladenosen) in Konzentrationen von 1 mM mit der Alkylierung der PI-3-Kinase durch Wortmannin, Substanzen mit nucleophilen Aminosäureseitenketten zeigten in diesen Konzentrationen hingegen keinen Effekt. FSBA ist ein Adenin-Derivat, das kovalent an nucleophile Aminosäuren bindet; es wird bei der Suche nach Nucleotidbindungsstellen verwendet.^[121] Das PI-3-Kinase-Substrat PtdIns-4,5-diphosphat konkurriert bei der Bindung effektiv mit Wortmannin. Diese Ergebnisse brachten Wymann und Mitarbeiter zu dem Schluss, dass Wortmannin die PI-3-Kinase an einer Nucleotidbindungsstelle in der Nähe der Substratbindungsstelle angreift. Ihre Postulate wurden durch eine Kristallstrukturanalyse des Komplexes von Schweine-PI-3-Kinase mit Wortmannin bestätigt.^[122]

Wie bereits erwähnt, könnte Lys-802 eine Rolle bei der Stabilisierung des α -Phosphats von ATP in der Bindungstasche spielen, ähnlich, wie man es für Lys-72 in der Proteinkinase A (PKA) annimmt.^[121] Lys-72 verankert die nicht zu spaltenden Phosphat-Einheiten von ATP und kompensiert ihre Ladungen durch ionische Wechselwirkungen. In Hefe-PKA führt der Austausch von Lys-72 gegen Ala zu einer Abnahme von V_{\max} um das 800fache.^[123] Der Einfluss von Lys-72 in PKA und möglicherweise Lys-802 in PI-3-Kinase auf die Enzymaktivität resultiert vermutlich primär aus Struktureffekten und weniger aus einer direkten Beteiligung an der Katalyse. Die Mikroumgebung im Protein könnte die Nucleophilie des anvisierten Lysins erhöhen; alternativ könnte die Bindung von Wortmannin im aktiven Zentrum einer Kinase produktive Wechselwirkungen mit den katalytischen Resten verhindern. Auf jeden Fall sollte die Wirksamkeit von Wortmannin dazu ermutigen, Cofaktorbindungsstellen als Targets für niedermolekulare Sonden in Betracht zu ziehen. Hierdurch könnte ein breiteres Spektrum an Proteinen für funktionelle Proteommethoden wie ABPP zugänglich werden. Kürzlich gelang es mithilfe eines Rhodamin-markierten Wortmannin-Analogons, bei Proteomuntersuchungen als zusätzliches Target des Naturstoffs eine Säugtier-Polo-Kinase zu identifizieren,^[124] die eine wichtige Rolle bei der Mitose spielt und in zahlreichen humanen Krebsarten nachweislich überexprimiert wird. Mithilfe der Wortmannin-basierten Sonde konnten Veränderungen in der Kinaseaktivität bei Zugabe von Wirkstoffen sowie in unterschiedlichen Zellzyklusstadien nachvollzogen werden. Diese Ergebnisse weisen Wortmannin als eine gute Leitstruktur für die Entwicklung von Polo-Kinase-Inhibitoren aus, die in der Krebstherapie eingesetzt werden können.



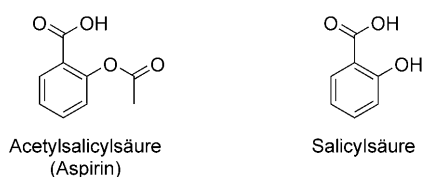
Schema 11. Der Lysinrest 802 in der PI-3-Kinase öffnet den doppelt aktivierten Furanring von Wortmannin über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus unter Bildung eines vinylogen Carbamats.

3.3. Aspirin

In einem Brief an Seine Durchlaucht George, den Grafen von Macclesfield und Prä-

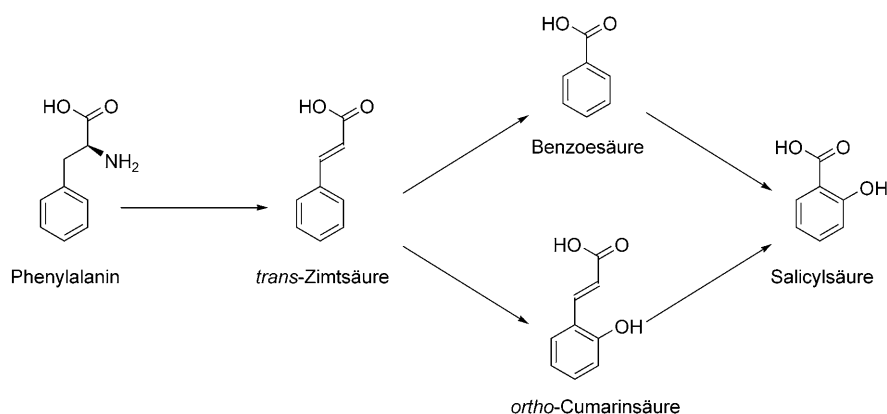
sidenten der Royal Society, schrieb der Pfarrer Edward Stone am 25. April 1763: „Ich habe von einer Rinde eines englischen Baumes herausgefunden, dass sie ein wirksames Adstringens und sehr heilsam bei Wechselfieber und vorübergehendem Unwohlsein ist.“^[125]

Stone war nicht der Erste, der die fieber- und schmerzlindernden Eigenschaften des Weidenbaum-Extrakts bemerkte. Im Jahre 200 v. Chr. verschrieb der griechische Arzt Hippokrates Weidenrinde und -blätter zur Schmerzlinderung. Der Römer Plinius der Ältere erwähnt Weidenblätter in seinem Werk *Naturalis historia*. Acetylsalicylsäure oder Aspirin (Schema 12),^[126] eine modifizierte Form der Salicylsäure, des aktiven Bestandteils der Weidenrinde, ist heute eines der am weitesten verbreiteten Schmerzmittel.



Schema 12. Aspirin und Salicylsäure, der Naturstoff von dem der Wirkstoff abgeleitet wurde.

Salicylsäure und strukturell verwandte Sekundärmetaboliten, die Salicylate, dienen in nahezu allen höheren Pflanzen zur Abwehr von Schädlingen und zur Abschreckung von Pflanzenfressern.^[127] Die Biosynthese von Salicylsäure (Schema 13) lässt sich bis in den Phenylpropanoid-Stoffwechselweg zurückverfolgen,^[127] der mit der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-katalysierten Bildung von *trans*-Zimtsäure durch Eliminierung von Ammoniak aus der Aminosäure Phenylalanin beginnt.^[127a] Anschließend stehen den unterschiedlichen Pflanzenspezies zwei Wege offen:^[127b] Der erste Weg verläuft über die Abspaltung einer C₂-Einheit aus Zimtsäure, wodurch Benzoessäure entsteht, gefolgt von der *ortho*-Hydroxylierung zur Salicylsäure. Im zweiten Weg ist die Reihenfolge der beiden Schritte umgekehrt, sodass zunächst *ortho*-Cumarinsäure gebildet wird. Der Decarboxylierungsschritt verläuft vermutlich ähnlich wie bei den β -Oxidationen im Fettsäurekatabolismus.^[127] Diese Annahme wird durch die



Schema 13. Zwei Biosynthesewege für Salicylsäure in Pflanzen.

Beobachtung gestützt, dass die Decarboxylierung in zellfreien Pflanzenextrakten ATP- und CoA-abhängig ist.^[128]

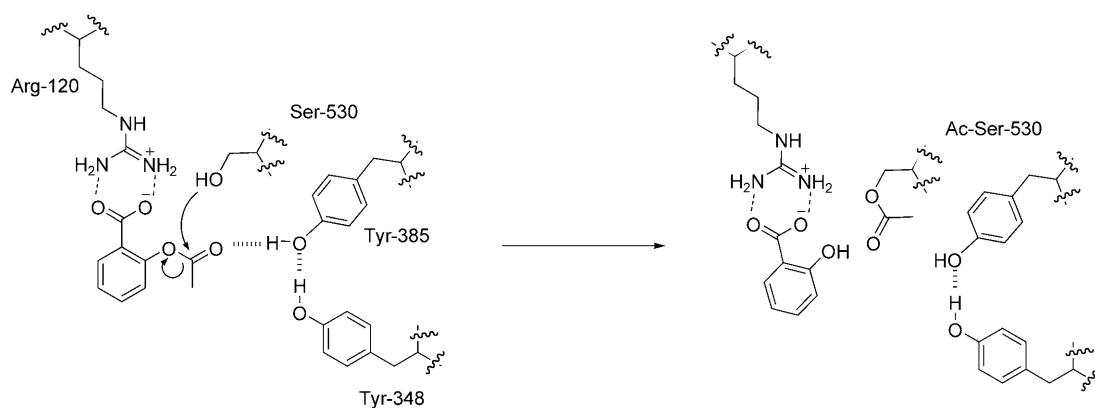
1860 synthetisierte Hermann Kolbe an der Universität Marburg Salicylsäure und ihr Natriumsalz aus Phenol, Kohlenstoffdioxid und Natrium. Kolbes Student Friedrich von Heyden richtete in Radebeul in der Nähe von Dresden eine Fabrik zur Großproduktion von Salicylaten ein. Die als Nebenwirkung von Salicylat auftretenden Magenbeschwerden wurden durch die weite Verbreitung des Wirkstoffs schnell offenkundig. Felix Hoffmann, ein Chemiker bei Bayer, umging 1897 dieses Problem durch die Synthese eines besser verträglichen Derivats, der Acetylsalicylsäure.^[129] Das Patent wurde 1899 erteilt, und Heinrich Dreser, der Forschungsdirektor bei Bayer, prägte den Namen „Aspirin“ – eine Kombination aus Spirsäure (Salicylsäure) und dem Anfangsbuchstaben „A“ für Acetyl.

Der Wirkmechanismus von Aspirin blieb fast ein ganzes Jahrhundert unbekannt, bis 1971 Untersuchungen von Vane darauf hindeuteten, dass Aspirin die Prostaglandin-Biosynthese inhibiert.^[130] Für dieses wegweisende Ergebnis, das sowohl die zuträglichen Eigenschaften als auch die Nebenwirkungen von Aspirin erklärte, wurde Vane 1982 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.^[131] Die Prostaglandine sind parakrine Hormone, die in Zellen in der Nähe ihres Syntheseorts wirken. Eine Zellschädigung steigert die lokale Prostaglandin-Synthese, was eine erhöhte Körpertemperatur, Entzündung und Schmerz zur Folge hat.^[132] Aspirin inaktiviert die Prostaglandin-Endoperoxid-(PGG/H)-Synthase, auch Cyclooxygenase (COX) genannt, irreversibel durch Acetylierung.^[133] Darüber hinaus acetyliert Aspirin humanes Hämoglobin sowie humanes Serumalbumin.^[134]

Das COX-Enzym hat zwei bekannte Isoformen, die konstitutive COX-1 und die induzierbare COX-2.^[135] COX-Enzyme katalysieren die beiden ersten Schritte bei der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine. Die Cyclooxygenase-Aktivität addiert zwei Sauerstoffmoleküle an Arachidonsäure. So entsteht Prostaglandin G₂ (PGG₂), dessen Hydroperoxygruppe anschließend durch die Peroxidase-Domäne der Enzyme katalytisch zur Hydroxygruppe des Hydroxyendoperoxids PGH₂ reduziert wird.^[133b, 136]

Es ist bekannt, dass Aspirin die Cyclooxygenase-Aktivität der COX-Enzyme inhibiert, jedoch nicht ihre Peroxidase-Aktivität.^[137] Die Hemmwirkung scheint daraus zu resultieren, dass Aspirin die Bindung des Substrats Arachidonsäure an das aktive Zentrum der Cyclooxygenase stört, da der durch Aspirin acetylierte Serinrest (Ser-530 in COX-1, Ser-516 in COX-2) für die Katalyse nicht entscheidend ist.^[133b]

Untersuchungen an den aktiven Zentren haben einen Einblick in die Mechanismen der COX-Enzyme und der Acetylierung durch Aspirin gegeben. Am Acetyltransfer sind mehrere Aminosäuren im aktiven Zentrum der COX beteiligt, unter anderem konservierte Tyrosin- und Argininreste



Schema 14. Ein komplexes Netz aus Wasserstoffbrücken und anderen Wechselwirkungen richtet Aspirin für die Acetylierung von Ser-530 der Cyclooxygenase-1 aus.

(Schema 14).^[138] 1990 ergaben spektroskopische und biochemische Untersuchungen, dass Tyr-385 für die Cyclooxygenase-Aktivität der COX-1 essenziell ist.^[139] Dieser Tyrosinrest ist richtig positioniert für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cyclooxygenierung, die Abstraktion des 13-pro-S-Wasserstoffatoms aus dem Arachidonat.^[139,140] Eine Tyr385Phe-Mutante von COX-2 zeigt so gut wie keine Serinacetylierung durch Aspirin, und eine Tyr348Phe-Mutante hat eine verminderte Aktivität und wird durch Aspirin weniger acetyliert.^[141] Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung von Tyr-348, das Wasserstoffbrücken zu Tyr-385 bildet und eine Rolle bei der Positionierung des Substrats spielt. Arginin-120 ist ein wichtiger Rest in COX-1, sowohl für die Substraterkennung als auch für die Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren mit einer freien Carboxyfunktion.^[142] Eine Kristallstrukturanalyse von COX-1 deutet darauf hin, dass die Guanidinogruppe mit dem Arachidonat-Carboxylat in Wechselwirkung tritt.^[143] Außerdem waren reversible Inhibitoren mit einer freien Carboxyfunktion, etwa Flurbiprofen, gegenüber COX-1-Enzymen mit einer Mutation an Arg-120 ineffektiv.^[142,143] Später stellte sich heraus, dass bei einer entsprechenden COX-2-Mutante, in der Arg durch Gln ersetzt wurde, 73 % weniger Acetylierung an Ser-516 auftritt.^[141]

Auf der Grundlage dieser experimentellen Daten wurde ein Mechanismus für die Acetylierung von Serin durch Aspirin postuliert (Schema 14). Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht hier sowie im folgenden Absatz der von COX-1. Zunächst positioniert die Wechselwirkung der Carboxylatgruppe von Aspirin mit der Seitenkette von Arg-120 den Wirkstoff in der Substratbindungstasche, wo er mit den Hydroxygruppen von Tyr-385 und Tyr-348 weitere Wasserstoffbrücken bildet. Diese dirigieren die Acetylgruppe in Richtung von Ser-530 und erhöhen die Reaktivität von Aspirin, indem sie die negative Ladung der tetraedrischen Zwischenstufe stabilisieren, die durch die Addition entsteht. Die Möglichkeit einer vorübergehenden Tyrosinacetylierung konnte ausgeschlossen werden, da bei der Acetylierung einer Ser530Ala-Mutanten kein *O*-Acetyltyrosin gefunden wurde.^[141] Eine Kristallstrukturanalyse von durch Bromaspirin (Bromacetylsalicylsäure) inaktivierter COX-1 stützt dieses Modell. Bromaspirin wurde verwendet, da man seine

Position durch die Gegenwart des Schweratoms Brom auch bei einer relativ geringen Auflösung (3.4 Å) der Kristallstruktur definitiv identifizieren konnte. Der Abstand zwischen dem phenolischen Sauerstoffatom von Tyr-385 und der Acetylgruppe lässt Wasserstoffbrücken möglich erscheinen.^[144]

Ein ausgeklügeltes Wasserstoffbrücken-Bindungsmuster sowie ionische Wechselwirkungen dienen also der Positionierung des Aspirins im aktiven Zentrum der COX, was die effektive Molarität erhöht, die Reaktivität verbessert und somit zur selektiven Acetylierung von Ser-530 führt. Aus der Röntgenstrukturanalyse war auch ersichtlich, in welcher Weise die Acetylierung durch Aspirin inhibierend wirkt. Ser-530 liegt in einer hochgradig konservierten Region,^[133b] an einem hydrophoben Kanal, der von der Enzymoberfläche zum katalytischen Tyrosin führt. Die Acetylgruppe von Aspirin ragt in diesen Kanal hinein und verhindert dadurch vermutlich, dass die Arachidonsäure das aktive Zentrum erreicht.^[133b,144]

Schließlich ist noch anzumerken, dass auch Salicylsäure entzündungshemmend wirkt, selbst jedoch nicht in der Lage ist, COX-Enzyme kovalent zu modifizieren. Der genaue Wirkmechanismus von Salicylat wird noch diskutiert.^[145] Die Umwandlung dieses Naturstoffs in das halbsynthetische Derivat Aspirin war in zweierlei Weise vorteilhaft: Der Wirkmechanismus wurde irreversibel, und der therapeutische Eingriff erfolgt gezielt an den bevorzugten Protein-Targets.

3.4. Microcystin

Cyanobakterien in den Blüten von Blau- und Grünalgen in kontaminiertem Trinkwasser haben bereits viele Tiere das Leben gekostet. Seit 1878^[146] wurde es zunehmend offenkundig, dass die Blüten der Gattungen *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* und *Microcystis* in Süß- und Meerwasser zu den entsprechenden akuten Vergiftungen führen.^[147] Man isolierte die aktiven Komponenten, eine Familie wirksamer Hepatotoxine, und begann, ihre Strukturen zu analysieren.^[148] Obgleich bereits 1959 bestätigt wurde, dass es sich bei den Toxinen um Peptide handelt,^[149] blieb ihre Aminosäurezusammensetzung über viele Jahre unklar.^[150] Die erste Struktur

wurde 1984 mithilfe von NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie vollständig bestimmt,^[151] und die Charakterisierung weiterer Familienmitglieder folgte bald darauf.^[152] Die Toxine sind cyclische Heptapeptide mit variablen L-Aminosäuren an zwei Positionen (X und Y genannt) und enthalten Adda, eine ungewöhnliche aromatische β -Aminosäure mit einer ungesättigten Alkylkette (Schema 15). Eine Konfigurationsbestimmung identifizierte Adda im Jahre 1988 eindeutig als (2*S*,3*S*,8*S*,9*S*)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-(4*E*,6*E*)-decadiensäure.^[153] In der Literatur findet man zahlreiche Bezeichnungen für diese Adda-haltigen cyclischen Peptidnaturstoffe, letztlich entschied man sich jedoch für den Namen Microcystin (Schema 15).^[154]

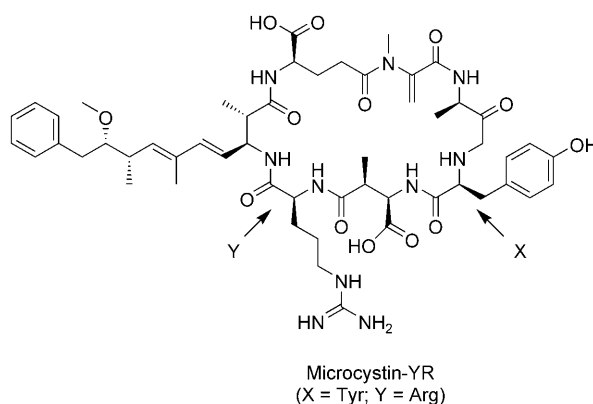
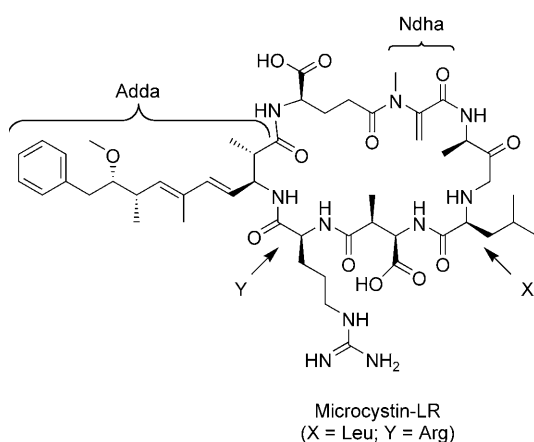
Die Microcystin-Familie umfasst mehr als 60 Mitglieder;^[155] ein Großteil davon unterscheidet sich lediglich in den beiden variablen Aminosäuren oder in der Methylierung von Dehydroalanin und/oder Asparaginsäure. Die Namen der Microcystine enthalten zwei Buchstaben, entsprechend den Abkürzungen der Aminosäuren auf den variablen Positionen. Biosyntheseuntersuchungen an Microcystinen haben sich besonders mit der Herkunft der Kohlenstoffatome in der Adda-Einheit sowie im Methylasparaginsäurerest beschäftigt. Methylasparaginsäure entsteht aus Acetyl-CoA und Pyruvat über eine Methylbernsteinsäure-Zwischenstufe, die Adda-Einheit leitet sich von Acetat ab; bestimmte Methylgruppen stammen aus Methionin.^[156] Die Microcystine werden normalerweise nichtribosomal biosynthetisiert.^[157] Analysen von Microcystin-Synthetasegenen ergaben, dass es sich um Polyketidsynthasengene handelt.^[158]

Man versuchte auch, die molekularen Grundlagen der Toxizität von Microcystinen zu entschlüsseln. So zeigte sich bald nach der Strukturaufklärung, dass die Naturstoffe wirksame Inhibitoren der Serin/Threonin-Phosphatasen 1 und 2A^[7,147b,159] sowie weiterer, weniger gut charakterisierter Phosphatasen sind.^[160] Die reversible Proteinphosphorylierung ist von entscheidender Bedeutung für die Regulierung zellulärer Prozesse.^[161] Mehr als 98 % der Proteinphosphorylierung in eukaryotischen Zellen finden an Serin- und Threoninresten statt.^[160] Die Serin/Threonin-Phosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A) wurden mit der Regulierung unterschiedlicher Prozesse in Verbindung gebracht, etwa im Gly-

cogenmetabolismus, bei der Synapsenplastizität, im Zellzyklus, bei der Embryogenese, der Apoptose sowie bei der Kontraktion glatter Muskulatur.^[162] Die Strukturen, Aktivitäten und Inhibitionsmöglichkeiten von PP1 und PP2A sind ausführlich zusammengefasst worden.^[163] Diese Enzyme haben kein katalytisches Nucleophil; statt dessen aktivieren proteingebundene Metallionen als Cofaktoren ein Wassermolekül.^[163]

Die unselektive Inhibition der vielfältigen Funktionen von PP1 und PP2A könnte zur schweren Toxizität der Microcystine beitragen: Eine intraperitoneale Dosis von ein bis zwei Mikrogramm führte bei Mäusen bereits zum Tod.^[147b] Obgleich dies die Eignung der Microcystine für therapeutische Zwecke einschränkt, wurden Derivate synthetisiert, um deren Toxizität und Spezifität zu erforschen.^[164] Bisher gelang eine vollständige Totalsynthese nur für ein Mitglied der Microcystin-Familie.^[165] Die Microcystine haben die funktionelle Charakterisierung von Phosphatasen und Phosphatase-Protein-Komplexen in Proteomen stark vereinfacht.^[159b,166] Ein Konjugat aus Microcystin-LR und Rhodamin reagierte mit zahlreichen Serin/Threonin-Phosphatasen in einer nicht vorbehandelten Zellprobe. Mithilfe des Konjugats konnten Veränderungen in der Phosphataseaktivität detektiert werden.^[166] Diese Sonden erweiterten das Spektrum der Enzymfamilien, die der funktionellen Proteomanalyse zugänglich sind.

Ähnlich wie die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des Methyldehydroalaninrests von Microcystin wirken einige bioaktive Naturstoffe wie Leptomycin B,^[167] Isoavenaciolid^[168] und Pironetin^[169] als Kohlenstoffelektrophile. 1995 berichteten zwei Gruppen übereinstimmend über konjugierte Additionen am Dehydroalaninrest von Microcystin, an denen Cys-273 in der Nähe des C-Terminus von PP1 beteiligt war;^[7,159a] bei PP2A ist Cys-266 der analoge anvisierte Rest.^[159a] Die Aminosäuresequenz Ser-Ala-Pro-Asn-Tyr-Cys, die den Cysteinrest enthält, der durch Microcystin modifiziert wird, ist in Ser/Thr-Phosphatasen hochgradig konserviert.^[7] Die kovalenten Verknüpfungen zwischen zahlreichen Microcystinen und PP1 sind hitze- und säurebeständig. Hingegen wurde keine kovalente Bindung von Microcystin-YR an Phosphatasen beobachtet, wenn die Proteine vor Zugabe des



Schema 15. Zwei Beispiele für Microcystine: Die X- und Y-Positionen können mit unterschiedlichen Aminosäuren besetzt sein. Ndha = N-Methyldehydroalanin.

Naturstoffs mit Natriumdodecylsulfat denaturiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkungen ein aktives Zentrum mit intakter Struktur voraussetzen.^[7]

Microcystine binden mit subnanomolarer Affinität an PP1;^[170] im Kristall bildet die Adda-Seitenkette von Microcystin-LR Kontakte mit einer konservierten hydrophoben Spalte von PP1, und die Glutamat-Carboxygruppe sowie das benachbarte Carbonylkohlenstoffatom sind mit dem Metallion indirekt über Wassermoleküle verbunden.^[163c] Die Leucin-Seitenkette des Toxins ist in einer Schleife der C-terminalen Domäne positioniert. Darüber hinaus bildet die Methylaspartat-Carboxygruppe eine Wasserstoffbrücke zu Arg-96, einem entscheidenden Rest für die Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der Substrate. Somit ist der Zugang zum aktiven Zentrum komplett blockiert.

Die ausgedehnten Wechselwirkungen zwischen den Microcystinen und den aktiven Zentren der Phosphatasen sprechen dafür, dass die kovalente Reaktivität nur einen Teil des Wirkspektrums dieser Naturstoffe ausmacht. Auch als Aminoethanthiol-Addukt an Sepharose-Kügelchen immobilisierte Microcystine inhibierten PP1 und PP2A.^[159b] Microcystin-LR, -YR und -RR wurden synthetisch in ihre Glutathion- und Cystein-Konjugate überführt; beide Thiole reagierten mit der Dehydroalaningruppe, die 1,4-Additionsprodukte behielten jedoch eine abgeschwächte In-vivo-Toxizität (LD_{50} von $38 \mu\text{g kg}^{-1}$ für Microcystin-LR und $630 \mu\text{g kg}^{-1}$ für sein Glutathion-Konjugat).^[171] Dabei sollte man beachten, dass eine Retro-Michael-Reaktion derartiger Addukte in vivo zur beobachteten biologischen Aktivität führen könnte.^[172] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Dehydroalaninrest vermutlich keine Rolle bei den anfänglichen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor spielt.

Mechanistische Untersuchungen von Craig und Mitarbeitern bestätigten einen zweistufigen Mechanismus für die irreversible Inhibition durch Microcystine (Schema 16).^[173] Im ersten Schritt wird das Microcystin schnell nichtkovalent gebunden, und es resultiert eine Inhibition mit allen zuvor

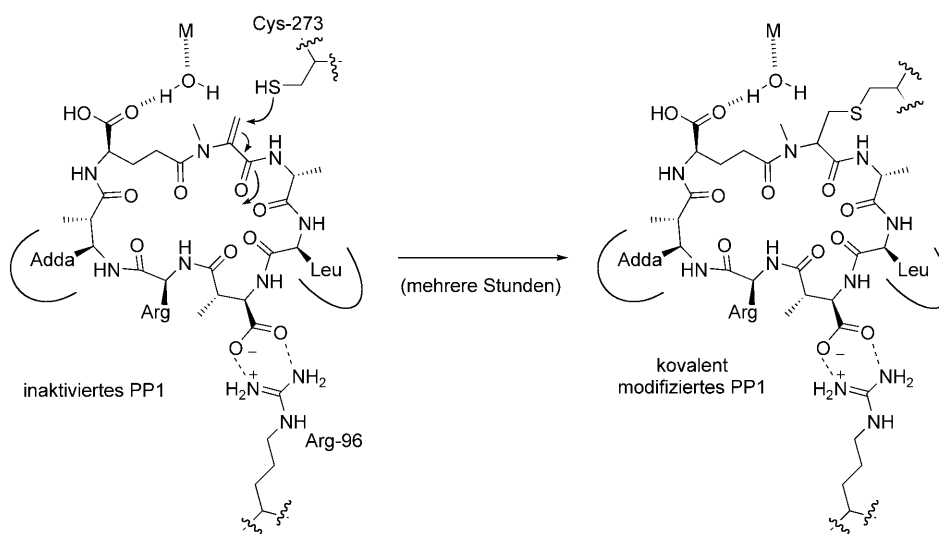
beschriebenen Kontakten. Über einen Zeitraum von mehreren Stunden wird langsam die kovalente Bindung zu Cys-273 gebildet.^[173] Die Tendenz zur konjugierten Addition wird wahrscheinlich durch die hohe effektive Molarität von Microcystin in der passend gefalteten Bindungstasche verstärkt; dafür spricht die erwähnte Kontrollreaktion mit dem denaturierten Protein. Zudem könnte die Nucleophilie des Cysteinrests in seiner Proteinumgebung erhöht sein. Mutageneseuntersuchungen ergaben jedoch, dass Cys-273 für die Katalyse nicht notwendig ist, denn eine Cys273Ser-Mutante zeigte dieselbe Aktivität wie das Wildtyp-Enzym.^[174] Somit sind Microcystine ein hervorragendes Beispiel dafür, wie ein kompliziertes Netz nichtkovalenter Wechselwirkungen mit einem Enzym die kovalente Modifikation von nichtkatalytischen Resten im aktiven Zentrum erleichtern kann. Ähnliche Strategien haben sich bei der Umwandlung stark bindender reversibler Inhibitoren in kovalente Inaktivatoren des EGF-Rezeptors^[175a-c] und der p90-Ribosomenprotein-S6-Kinase^[175d] bewährt: Hier wurden elektrophile Gruppen in der Nähe von Cysteinresten in den aktiven Zentren eingeführt.^[175]

4. Angriff auf nichtenzymatische Proteine

Die meisten proteinreaktiven Naturstoffe greifen die aktiven Zentren von Enzymen an, doch es gibt Ausnahmen. Beispielsweise bindet Leptomycin B kovalent an ein Rezeptorprotein, das am Kerntransport beteiligt ist.

4.1. Leptomycin B

Ein aus Bodenproben isolierter *Streptomyces*-Stamm lieferte zwei neue antifungale Antibiotika. Die aktiven Komponenten wurden isoliert und als Leptomycin A und B bezeichnet.^[176] Diese Verbindungen zählen zu einer Familie strukturell ähnlicher Naturstoffe, der auch Callistatin A,



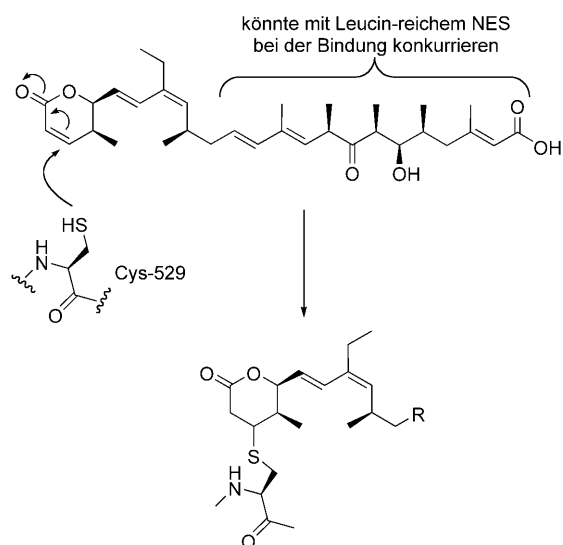
Schema 16. Microcystin inaktiviert PP1, bevor es langsam kovalent an Cys-273 bindet. Die nichtkovalenten Wechselwirkungen schaffen die Voraussetzung für eine erfolgreiche konjugierte Addition.

Ratjadon, Kazusamycin, Anguinomycin, Leptofuranin und Leptolstatin angehören (Schema 17).^[177] Die Strukturen der Leptomycine wurden mithilfe von NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und IR-Spektroskopie ermittelt.^[178] Sie enthalten eine ungesättigte Fettsäure mit einem terminalen δ -Lactonring. Leptomycin B leitet sich von einem Polyketid ab; es lässt sich retrosynthetisch in vier Acetat-Einheiten, sieben Propionat-Einheiten und eine Butyrat-Einheit aufspalten.^[179] Leptomycin B interferiert mit DNA-Syntheseschritten im Zellzyklus,^[180] was vermutlich aus seinem inhibitorischen Effekt auf den Kerntransport resultiert.^[181] Ein nanomolarer Bindungspartner von Leptomycin B wurde entdeckt und CRM1 (chromosome maintenance region 1; auch bekannt als Exportin 1) genannt.^[182] CRM1 ist ein evolutionär konservierter Rezeptor des Leucin-reichen Kernexportsignals (NES)^[183] von Proteinen und ein essenzieller Mediator des NES-abhängigen Kernexports von Proteinen und Ribonucleoproteinkomplexen in eukaryotischen Zellen.^[182, 184]

In Verbindung mit CRM1 ermöglicht das Protein Rev den Transport von partiell prozessierten HIV-mRNAs aus dem Zellkern; so kann das HIV-Virus die zelluläre Proteinsynthesemaschinerie nutzen.^[182, 185] Leptomycin B und verwandte Substanzen blockieren die Wechselwirkungen zwischen Rev und den Kerntransportproteinen und können somit potenziell die Replikation von HIV-1 inhibieren.^[186] Leptomycin B bewirkt außerdem eine Anreicherung des Tumorsuppressors p53 im Zellkern.^[187] Diese subzelluläre Lokalisation führt zu einer Aktivierung von p53, Stillstand des Zellzyklus und schließlich zur Apoptose. Somit könnte Leptomycin neue Therapieansätze für HIV und Krebs aufzeigen.^[187, 188]

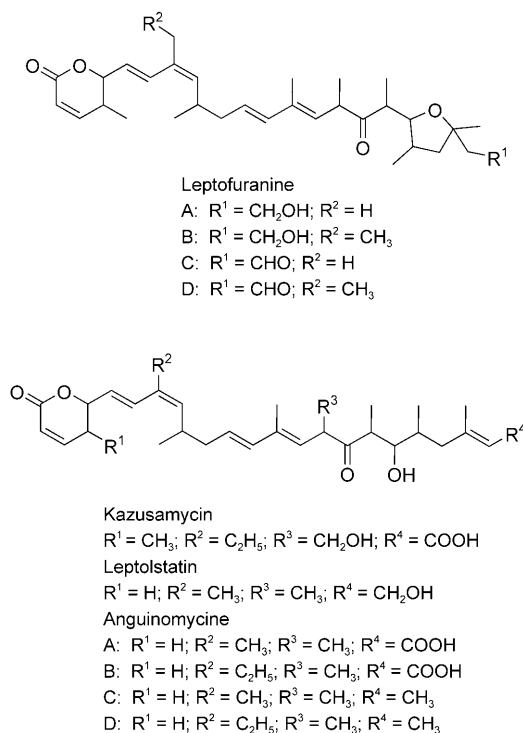
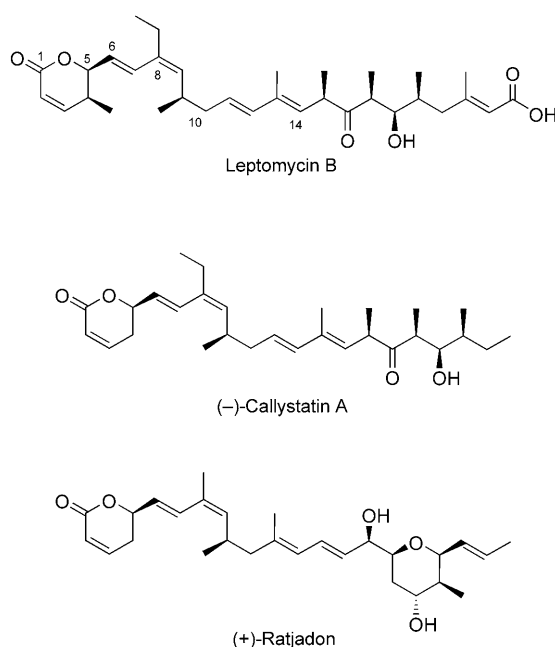
Leptomycin B bindet an CRM1, modifiziert Cys-529 in einer zentralen konservierten Region des Proteins kovalent

und inhibiert so die Erkennung von NES; Ratjadon wirkt ebenfalls nach diesem Mechanismus (Schema 18).^[167, 181, 186a, 189] Es zeigte sich, dass eine einzige Mutation, Cys529Ser, in *Schizosaccharomyces pombe* ausreichte, um die Empfindlichkeit gegenüber Leptomycin B drastisch zu mindern.^[167, 190]



Schema 18. Der α,β -ungesättigte Lactonring von Leptomycin reagiert in einer konjugierten Addition mit Cys-529 von Exportin.

Um herauszufinden, welcher Teil des Naturstoffs als Pharmakophor wirkt, untersuchten Kobayashi und Mitarbeiter eine Reihe von Callystatin-Analoga. Dabei erwies sich der



Schema 17. Die Naturstoff-Familie der Leptomycine.

α,β -ungesättigter Lactonring als das entscheidende reaktive Element.^[191] Weitere Arbeitsgruppen reduzierten den Lactonring zu einem gesättigten Analogon^[192] oder bildeten ein Michael-Addukt mit Nitromethan;^[185a] in beiden Fällen wurde die inhibitorische Wirkung stark abgeschwächt. Außerdem reagierten *N*-Acetylcysteinmethylester und Leptomycin B unter Bildung eines stabilen 1,4-Additionsprodukts, das NMR-spektroskopisch nachgewiesen wurde.^[167] All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein Angriff der Sulfanylgruppe von Cys-529 in CRM1 auf den elektrophilen α,β -ungesättigten Lactonring von Leptomycin zu einer kovalenten Verknüpfung führt (Schema 18).

Die Rolle von Cys-529 in CRM1 ist noch nicht geklärt, doch scheint dieser Cysteinrest für die Funktion von CRM1 nicht notwendig zu sein. Die Cys529Ser-Mutante vermittelt den Kernexport ebenso gut wie Wildtyp-CRM1, und sie ist nicht temperaturempfindlich.^[167] Darüber hinaus enthält Wildtyp-CRM1 aus *Saccharomyces cerevisiae* einen Threoninrest an der Stelle des Cysteinrests.^[167]

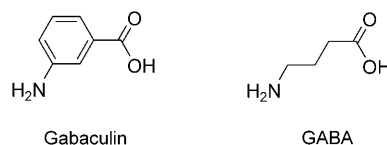
Solange die Struktur nicht bestimmt ist,^[188,193] kann nur über die Wechselwirkungen zwischen CRM1 und Leptomycin B spekuliert werden. Dabei ist diese Information entscheidend für die Entwicklung neuer Inhibitoren der Kerntranslokation. In klinischen Phase-I-Tests stellte sich heraus, dass Leptomycin B selbst sehr toxisch ist, und es wurde von einer Weiterentwicklung abgesehen.^[194] Leptomycin B und einige verwandte Verbindungen wurden jedoch synthetisiert, um ihre Funktionsweise zu untersuchen.^[191a,195] Die Hoffnung, dass einige dieser Reagentien den Transport spezifischer mRNA-Moleküle selektiv ausschalten könnten, treibt weitere Forschungsaktivitäten an.

CRM1 ist ein besonders bemerkenswertes Target für einen proteinreaktiven Naturstoff, da dieses Protein kein Enzym ist. Dennoch wird es von Leptomycin B spezifisch an Cys-529 markiert, was dafür spricht, dass dieser Rest in einer strukturierten Bindungsstelle für kleine Moleküle lokalisiert ist. Man könnte sich vorstellen, dass die zentrale konservierte Region von CRM1 eine hydrophobe Tasche bildet, die sowohl mit Leucin-reichen NESn als auch mit dem strukturell deutlich verschiedenen Leptomycin B wechselwirken kann – ähnlich wie die aktiven Zentren von Enzymen, die Substrate und Inhibitoren mit stark unterschiedlichen Strukturen binden.^[167]

5. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Aufsatz haben wir die vielfältigen Mechanismen vorgestellt, mit denen Naturstoffe an Proteine und aktive Zentren von Proteinen binden und diese kovalent modifizieren. Die diskutierten Beispiele bilden keine vollständige Liste, sie stehen vielmehr repräsentativ für die unterschiedlichen Klassen proteinreaktiver Naturstoffe, die bislang entdeckt worden sind. Beim Vergleich dieser Naturstoffe sollte man beachten, dass ihre Reaktivität nicht auf einen spezifischen Aminosäuretyp beschränkt ist, sondern dass eine ganze Reihe von Resten im aktiven Zentrum infrage kommt, z.B. Serin (Lipstatin, Aspirin), Threonin (Lactacystin), Lysin (Wortmannin), Cystein (E-64, Microcystin) und Histidin

(Fumagillin). Darüber hinaus müssen diese Reste weder katalytische Funktionen ausüben (z.B. Cys-273 in PP1) noch Teil eines aktiven Zentrums sein (z.B. Cys-529 in CRM1). Dies verdeutlicht, wie kreativ die Natur „unechte“ Nucleophile einsetzt, um die Bindungstaschen von Proteinen selektiv zu modifizieren. Zwar inaktivieren alle in diesem Aufsatz besprochenen Naturstoffe ihre Protein-Targets durch die Modifizierung von Aminosäureresten, doch es sind auch andere Mechanismen der Enzyminhibition möglich. Beispielsweise inaktiviert die seltene Aminosäure Gabaculin (Schema 19) aus dem Schimmelpilz *Streptomyces toyocaen-*



Schema 19. Der Naturstoff Gabaculin ist ein GABA-Analogon mit festgelegter Konformation. GABA = γ -Aminobuttersäure.

sis^[196] mehrere miteinander verwandte Aminotransferasen durch die Bildung einer kovalenten Bindung mit dem Pyridoxalphosphat-Cofaktor des Enzyms (Tabelle 1).^[8c,197]

Tabelle 1: Repräsentative proteinreaktive Naturstoffe und ihre Targets.

| Naturstoff | Target | markierter Rest | katalytisches Nucleophil? |
|--------------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Lipstatin | Pankreaslipase | Ser-152 | ja |
| Lactacystin | Proteasomen- β -Untereinheiten | Thr-1 | ja |
| E-64 | Papain (Cys-Proteasen) | Cys-25 | ja |
| Fumagillin | MetAP-2 | His-231 | nein |
| Wortmannin | PI-3-Kinase | Lys-802 | nein |
| Aspirin | COX-1 | Ser-530 | nein |
| | COX-2 | Ser-516 | nein |
| Microcystin | PP1 | Cys-273 | nein |
| | PP2A | Cys-266 | nein |
| Leptomycin B | CRM1 | Cys-529 | nein |
| Gabaculin | Aminotransferasen | PLP-Cofaktor ^[a] | nein |

[a] PLP = Pyridoxalphosphat.

Welche Erfahrungen mit proteinreaktiven Naturstoffen können uns beim Design chemischer Sonden für das aufkeimende Gebiet der aktivitätsbasierten Proteinanalyse (ABPP) weiterhelfen?^[9] Als funktionelle Proteommethode zielt ABPP darauf ab, gegen das aktive Zentrum gerichtete molekulare Sonden zu entwickeln, die viele Enzyme parallel markieren können, um deren kollektive funktionelle Charakterisierung in biologischen Proben hoch komplexer Zusammensetzung zu vereinfachen. Durch ABPP-Methoden wurden Enzymaktivitäten entdeckt, die bei Krankheiten wie Krebs,^[69,198] Fettleibigkeit^[199] und Malaria^[200] hochreguliert sind. Außerdem gelang das Design selektiver Inhibitoren für diese Enzyme.^[201]

Der tiefgreifende Einfluss proteinreaktiver Naturstoffe auf die Entwicklung von ABPP zeigt sich auf mehreren Ebenen. Vermutlich am auffälligsten ist die Tatsache, dass sich viele ABPP-Sonden von Naturstoffen ableiten; etwa Reagentien, die eine Biotin-Einheit oder einen Fluorophor enthalten und auf Cysteinproteasen (basierend auf E-64),^[68a, b, 201b] Phosphatasen (basierend auf Microcystin)^[166] und Kinasen (basierend auf Wortmannin)^[124] wirken. Eine zweite Klasse von ABPP-Sonden bedient sich ebenfalls einer Strategie der Naturstoffe, indem sie konservierte katalytische Nucleophile in aktiven Zentren von Enzymen modifiziert. Hierzu zählen Fluorophosphonate sowie elektrophile Ketone für Serin-^[202] bzw. Cysteinhydrolasen.^[203] Diese Sonden zeichnen sich in der Regel dadurch aus, dass sie ein sehr breites Spektrum innerhalb einer bestimmten Enzymfamilie angreifen. Sogar ABPP-Sonden mit photoreaktiven (statt elektrophilen) Gruppen konnten von Naturstoffen abgeleitet werden, da auch sie klassenselektive funktionelle Gruppen nutzen, um an konservierte Strukturelemente in den aktiven Zentren der Enzyme zu binden.^[204] Schließlich wurde auf der Grundlage der Wirkprinzipien von proteinreaktiven Naturstoffen auch ein dritter ABPP-Ansatz etabliert, mit dessen Hilfe die Proteomreaktivität von strukturell unterschiedlichen Elektrophilen erforscht werden kann.^[199, 205] Für diesen „nichtgerichteten“ kombinatorischen ABPP-Ansatz wurden Bibliotheken von molekularen Sonden mit Kohlenstoffelektrophilen entworfen. Die meisten dieser Elektrophile wurden der Vielfalt von Naturstoffen nachempfunden, die mithilfe dieser vielseitigen reaktiven Gruppe die aktiven Zentren von Enzymen markieren (z. B. Fumagillin, Wortmannin und Microcystin). Man hat durch nichtgerichtete ABPP-Ansätze bereits Proteomsonden identifiziert, die die aktiven Zentren von mehr als zehn mechanistisch unterschiedlichen Enzymklassen angreifen.^[9, 199] Dass für die meisten dieser Enzyme keine affinen Substanzen bekannt waren, unterstreicht die Bedeutung von nichtgerichteter ABPP für die Suche nach neuen molekularen Sonden für Enzymfunktionen.

Wir müssen davon ausgehen, dass wir uns von den Mechanismen, die Naturstoffe beim Angriff auf die aktiven Zentren von Proteinen nutzten, heute erst ein unvollständiges Bild machen können. Die zentrale Rolle von Naturstoffen bei der Aufklärung biochemischer und zellbiologischer Proteinaktivitäten empfiehlt diese Verbindungen jedoch nachdrücklich für zukünftige Untersuchungen. Die Entdeckung und Charakterisierung neuer pharmakologischer Wirkstoffe sollte uns auch weiterhin faszinierende Einblicke in das schier unerschöpfliche Gebiet der Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen und Proteinen gewähren. Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sollten wiederum chemische Biologen einem Hauptziel der Post-Genom-Wissenschaft näher bringen – dem Design selektiver niedermolekularer Sonden für die funktionelle Analyse jedes einzelnen Proteins.

Wir danken K. Barglow und Dr. E. C. Taylor für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts sowie Dr. M. H. Bracey für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen. Unsere Forschung wurde von den NIH (CA087660), NIGMS (GM065483), einem Bristol Myers-Squibb Unrestricted Grant für organische Synthesechemie, vom Skaggs Institute for Chemical Biology

sowie von der Princeton University unterstützt. C.D. bedankt sich besonders für das Stipendium von Eli Lilly und der National Science Foundation.

Eingegangen am 10. März 2005

Übersetzt von Dr. Thomas Fritzsche, Heidelberg

- [1] a) A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837–846; b) N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853–1861.
- [2] a) D. T. Hung, T. F. Jamison, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 623–639; b) R. F. Standaert, A. Galat, G. L. Verdine, S. L. Schreiber, *Nature* **1990**, *346*, 671–674.
- [3] K. Nakanishi in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1 (Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, U. Sankawa), Elsevier, New York, **1999**, S. xxiii–xl.
- [4] N. Kasanah, M. T. Hamann, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2004**, *5*, 827–837.
- [5] P. Hadvary, W. Sidler, W. Meister, W. Vetter, H. Wolfer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2021–2027.
- [6] a) W. T. Lowther, D. A. McMillen, A. M. Orville, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12153–12157; b) N. Sin, L. H. Meng, M. Q. W. Wang, J. J. Wen, W. G. Bornmann, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6099–6103.
- [7] R. W. Mackintosh, K. N. Dalby, D. G. Campbell, P. T. W. Cohen, P. Cohen, C. Mackintosh, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 236–240.
- [8] a) R. B. Silverman, *Methods Enzymol.* **1995**, *249*, 240–283; b) R. R. Rando, *Pharmacol. Rev.* **1984**, *36*, 111–142; c) C. Walsh, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 871–909.
- [9] a) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41–47; b) G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 781–790; c) B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 663–668.
- [10] P. R. Graves, T. A. J. Haystead, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 39–63.
- [11] a) J. F. Fisher, S. Q. Meroueh, S. Mobashery, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 395–424; b) S. J. Coulthurst, A. M. L. Barnard, G. P. C. Salmond, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 295–306; c) B. F. Gherman, S. D. Goldberg, V. W. Cornish, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7652–7664; d) J. R. Knowles, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 97–104.
- [12] a) D. L. Boger, R. M. Garbaccio, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 1043–1052; b) K. S. Gates in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 7 (Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, E. T. Kool), Elsevier, New York, **1999**, S. 491–552; c) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1438–1474.
- [13] J. A. Gerlt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 786–787.
- [14] a) P. Hadvary, H. Lengsfeld, H. Wolfer, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 357–361; b) E. K. Weibel, P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, H. Lengsfeld, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1081–1086.
- [15] E. Hochuli, E. Kupfer, R. Maurer, W. Meister, Y. Mercadal, K. Schmidt, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1086–1091.
- [16] a) P. Barbier, F. Schneider, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 196–202; b) P. Barbier, F. Schneider, U. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1412–1418.
- [17] H. Umezawa, T. Aoyagi, T. Hazato, K. Uotani, F. Kojima, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 639–641.
- [18] K. Yoshinari, M. Aoki, T. Ohtsuka, N. Nakayama, Y. Itezono, M. Mutoh, J. Watanabe, K. Yokose, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1376–1384.
- [19] a) K. Uotani, H. Naganawa, S. Kondo, T. Aoyagi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1495–1499; b) K. Uotani, H. Naganawa, T.

- Aoyagi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1982**, 35, 1670–1674; c) H. Umezawa, T. Aoyagi, K. Uotani, M. Hamada, T. Takeuchi, S. Takahashi, *J. Antibiot.* **1980**, 33, 1594–1596.
- [20] M. Kitahara, M. Asano, H. Naganawa, K. Maeda, M. Hamada, T. Aoyagi, H. Umezawa, Y. Iitaka, H. Nakamura, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 1647–1650.
- [21] a) C. A. Schuhr, W. Eisenreich, M. Goese, P. Stohler, W. Weber, E. Kupfer, A. Bacher, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2257–2262; b) M. Goese, W. Eisenreich, E. Kupfer, P. Stohler, W. Weber, H. G. Leuenberger, A. Bacher, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4673–4678; c) M. Goese, W. Eisenreich, E. Kupfer, W. Weber, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 21192–21196; d) W. Eisenreich, E. Kupfer, W. Weber, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 867–874.
- [22] a) B. Borgstrom, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 962, 308–316; b) F. H. Stodola, A. Lesuk, R. J. Anderson, *J. Biol. Chem.* **1938**, 126, 505–513.
- [23] A. Pommier, J. M. Pons, P. J. Kocienski, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7334–7339.
- [24] a) J. A. Bodkin, E. J. Humphries, M. D. McLeod, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2869–2872; b) A. K. Ghosh, S. Fidanze, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2405–2407; c) P. J. Parsons, J. K. Cowell, *Synlett* **2000**, 107–109; d) A. K. Ghosh, C. F. Liu, *Chem. Commun.* **1999**, 1743–1744; e) C. Lowe, J. C. Vederas, *Org. Prep. Proced. Int.* **1995**, 27, 305–346; f) A. Pommier, J. M. Pons, P. I. Kocienski, L. Wong, *Synthesis* **1994**, 1294–1300.
- [25] F. K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Nature* **1990**, 343, 771–774.
- [26] a) M. E. Lowe, *J. Lipid Res.* **2002**, 43, 2007–2016; b) A. M. Heck, J. A. Yanovski, K. A. Calis, *Pharmacotherapy* **2000**, 20, 270–279; c) M. E. Lowe, *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, 17, 141–158; d) S. Ransac, Y. Gargouri, F. Marguet, G. Buono, C. Beglinger, P. Hildebrand, H. Lengsfeld, P. Hadvary, R. Verger, *Methods Enzymol.* **1997**, 286, 190–231.
- [27] a) P. Hollander, *Prim. Care.* **2003**, 30, 427–440; b) K. H. Lucas, B. Kaplan-Machlis, *Ann. Pharmacother.* **2001**, 35, 314–328; c) A. Ballinger, *Expert Opin. Pharmacother.* **2000**, 1, 841–847.
- [28] a) L. M. Prisant, *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, 44, 406–413; b) D. E. Kelley, M. Jneidi, *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, 3, 599–605; c) L. J. Aronne, *Prog. Cardiovasc. Nurs.* **2001**, 16, 98–106, 115; d) G. M. Keating, B. Jarvis, *Drugs* **2001**, 61, 2107–2119.
- [29] S. J. Kridel, F. Axelrod, N. Rozenkrantz, J. W. Smith, *Cancer Res.* **2004**, 64, 2070–2075.
- [30] a) H. Stalder, G. Oesterhelt, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 1593–1603; b) Q. Q. Luthipeng, H. P. Marki, P. Hadvary, *FEBS Lett.* **1992**, 299, 111–115; c) H. Stalder, P. R. Schneider, G. Oesterhelt, *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1022–1036.
- [31] D. J. Waxman, J. L. Strominger, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, 52, 825–869.
- [32] C. Therrien, R. C. Levesque, *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, 24, 251–262.
- [33] A. Lookene, N. Skotlova, G. Olivecrona, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 222, 395–403.
- [34] S. Omura, T. Fujimoto, K. Otaguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka, Y. Sasaki, *J. Antibiot.* **1991**, 44, 113–116.
- [35] S. Omura, K. Matsuzaki, T. Fujimoto, K. Kosuge, T. Furuya, S. Fujita, A. Nakagawa, *J. Antibiot.* **1991**, 44, 117–118.
- [36] a) C. E. Masse, A. J. Morgan, J. Adams, J. S. Panek, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2513–2528; b) E. J. Corey, W.-D. Z. Li, G. A. Reichard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2330–2336; c) E. J. Corey, W. D. Li, T. Nagamitsu, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1784–1787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1676–1679; d) N. Chida, J. Takeoka, K. Ando, N. Tsutsumi, S. Ogawa, *Tetrahedron* **1997**, 53, 16287–16298; e) H. Uno, J. E. Baldwin, I. Churcher, A. T. Russell, *Synlett* **1997**, 390–392; f) T. Nagamitsu, T. Sunazuka, H. Tanaka, S. Omura, P. A. Sprengeler, A. B. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3584–3590; g) N. Chida, J. Takeoka, N. Tsutsumi, S. Ogawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 793–794; h) H. Uno, J. E. Baldwin, A. T. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2139–2140; i) T. Sunazuka, T. Nagamitsu, K. Matsuzaki, H. Tanaka, S. Omura, A. B. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5302–5302; j) E. J. Corey, G. A. Reichard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10677–10678.
- [37] a) A. Nakagawa, M. Kainosho, S. Omura, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 2411–2413; b) A. Nakagawa, S. Takahashi, K. Uchida, K. Matsuzaki, S. Omura, A. Nakamura, N. Kurihara, T. Nakamatsu, Y. Miyake, K. Take, M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5009–5012.
- [38] a) L. R. Dick, A. A. Cruikshank, L. Grenier, F. D. Melandri, S. L. Nunes, R. L. Stine, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7273–7276; b) G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, 268, 726–731; c) G. Fenteany, R. F. Standaert, G. A. Reichard, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3358–3362.
- [39] a) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, **2002**, S. 358–359; b) M. Bogoy, M. Gaczynska, H. L. Ploegh, *Biopolymers* **1997**, 43, 269–280.
- [40] P. J. Elliott, T. M. Zollner, W. H. Boehncke, *J. Mol. Med.* **2003**, 81, 235–245.
- [41] M. Groll, L. Ditzel, J. Loewe, D. Stock, M. Bochter, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463–471.
- [42] a) E. Seemüller, A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber, H. Baumeister, *Science* **1995**, 268, 579–582; b) O. Coux, K. Tanaka, A. L. Goldberg, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 801–847.
- [43] a) L. Kozlowski, T. Stoklosa, S. Omura, C. Wojcik, M. Z. Wojtukiewicz, K. Worowski, H. Ostrowska, *Tumor Biol.* **2001**, 22, 211–215; b) H. Ostrowska, C. Wojcik, S. Wilk, S. Omura, L. Kozlowski, T. Stoklosa, K. Worowski, P. Radziwon, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, 32, 747–757; c) H. Ostrowska, C. Wojcik, S. Omura, K. Worowski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 234, 729–732.
- [44] a) A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 739–758; b) G. Fenteany, S. L. Schreiber, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 8545–8548.
- [45] a) D. H. Lee, A. L. Goldberg, *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 397–403; b) M. Bogoy, J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 6629–6634; c) M. C. Sousa, B. M. Kessler, H. J. Overkleeft, R. B. McKay, *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 779–785.
- [46] G. Martinelli, P. Tosi, E. Ottaviani, S. Soverini, S. Tura, *Haematologica* **2001**, 86, 908–917.
- [47] R. Twombly, *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, 95, 845.
- [48] F. Soucy, L. Grenier, M. L. Behnke, A. T. Destree, T. A. McCormack, J. Adams, L. Plamondon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9967–9976.
- [49] a) E. J. Corey, W.-D. Z. Li, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 1–10; b) L. R. Dick, A. A. Cruikshank, A. T. Destree, L. Grenier, T. A. McCormack, F. D. Melandri, S. L. Nunes, V. J. Palombella, L. A. Parent, L. Plamondon, R. L. Stein, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 182–188.
- [50] A. Craiu, M. Gaczynska, T. Akopian, C. F. Gramm, G. Fenteany, A. L. Goldberg, K. L. Rock, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 13437–13445.
- [51] A. F. Kisselev, Z. Songyang, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 14831–14837.
- [52] E. J. Corey, W. D. Z. Li, T. Nagamitsu, G. Fenteany, *Tetrahedron* **1999**, 55, 3305–3316.
- [53] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kaufmann, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 369–371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 355–357.
- [54] L. R. Reddy, P. Saravanan, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6230–6231.

- [55] M. Stadler, S. Seip, H. Mueller, A. Mayer-Bartschmid, M.-A. Bruenig, J. Benet-Buchholz, H. Togame, R. Dodo, P. Reinemer, K. Bacon, K. Fuchikami, S. Matsukawa, K. Urbahns, *PCT Int. Appl.* **2004**, 79 S. CODEN: PIXXD2 WO 2004071382 A2 20040826 CAN 141:224070 AN 2004:701941.
- [56] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 523–528.
- [57] K. Hanada, M. Tamai, S. Ohmura, J. Sawada, T. Seki, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 529–536.
- [58] K. Hanada, M. Tamai, S. Morimoto, T. Adachi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 537–541.
- [59] a) L. H. Meng, R. Mohan, B. H. B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10403–10408; b) N. Sin, K. B. Kim, M. Elofsson, L. H. Meng, H. Auth, B. H. B. Kwok, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2283–2288.
- [60] L. H. Meng, B. H. B. Kwok, N. Sin, C. M. Crews, *Cancer Res.* **1999**, 59, 2798–2801.
- [61] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, 201, 189–198.
- [62] M. J. Harrison, N. A. Burton, I. H. Hillier, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12285–12291.
- [63] a) M. Lee, R. Fridman, S. Mobashery, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 401–409; b) A. Baruch, D. Greenbaum, E. T. Levy, P. A. Nielsen, N. B. Gilula, N. M. Kumar, M. Bogyo, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 28999–29006; c) J. G. Tidball, M. J. Spencer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, 32, 1–5; d) H. H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 133–171.
- [64] B. K. Na, T. S. Kim, P. J. Rosenthal, J. K. Lee, Y. Kong, *Parasitol. Res.* **2004**, 94, 312–317.
- [65] T. Noda, K. Isogai, N. Katunuma, Y. Tarumoto, M. Ohzeki, *J. Biochem.* **1981**, 90, 893–896.
- [66] a) Y. Shoji-Kasai, M. Senshu, S. Iwashita, K. Imahori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 146–150; b) M. Tamai, K. Matsumoto, S. Omura, I. Koyama, Y. Ozawa, K. Hanada, *J. Pharmacobio-Dyn.* **1986**, 9, 672–677.
- [67] a) *Drugs Future* **1994**, 19, 1040; b) P. Mathur, S. K. Gupta, A. R. Wegener, W. Breipohl, M. H. Ahrend, Y. D. Sharma, Y. K. Gupta, R. B. Vajpayee, *Curr. Eye Res.* **2000**, 21, 926–933; c) M. Inomata, H. Hayashi, S. Shumiya, S. Kawashima, Y. Ito, *J. Biochem.* **2000**, 128, 771–776.
- [68] a) R. A. L. van der Hoorn, M. A. Leeuwenburgh, M. Bogyo, M. H. A. J. Joosten, S. C. Peck, *Plant Physiol.* **2004**, 135, 1170–1178; b) D. Greenbaum, K. F. Medzihradsky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 569–581; c) H. Cheng, C. A. Parish, B. A. Gilbert, R. R. Rando, *Biochemistry* **1995**, 34, 16662–16671; d) G. Velasco, A. A. Ferrando, X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. Lopezotin, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27136–27142.
- [69] J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraud, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogyo, D. Hanahan, *Cancer Cell* **2004**, 5, 443–453.
- [70] Y. Yabe, D. Guillaume, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4043–4044.
- [71] K. Matsumoto, K. Mizoue, K. Kitamura, W. C. Tse, C. P. Huber, T. Ishida, *Biopolymers* **1999**, 51, 99–107.
- [72] a) K. Matsumoto, M. Murata, S. Sumiya, K. Mizoue, K. Kitamura, T. Ishida, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1383, 93–100; b) A. Fujishima, Y. Imai, T. Nomura, Y. Fujisawa, Y. Yamamoto, T. Sugawara, *FEBS Lett.* **1997**, 407, 47–50; c) B. G. Zhao, C. A. Janson, B. Y. Amegadzie, K. D'Alessio, C. Griffin, C. R. Hanning, C. Jones, J. Kurdyla, M. McQueney, X. Y. Qiu, W. W. Smith, S. S. Abdel-Meguid, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 109–111; d) N. A. Katerelos, M. A. J. Taylor, M. Scott, P. W. Goodenough, R. W. Pickersgill, *FEBS Lett.* **1996**, 392, 35–39; e) K. I. Varughese, Y. Su, D. Cromwell, S. Hasnain, N. H. Xuong, *Biochemistry* **1992**, 31, 5172–5176; f) D. Yamamoto, K. Matsumoto, H. Ohishi, T. Ishida, M. Inoue, K. Kitamura, K. Hanada, *FEBS Lett.* **1990**, 263, 134–136; g) D. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Ishida, M. Inoue, S. Sumiya, K. Kitamura, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 2577–2581.
- [73] F. R. Hanson, E. Eble, *J. Bacteriol.* **1949**, 58, 527–529.
- [74] a) J. R. Turner, D. S. Tarbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 59, 733–735; b) D. S. Tarbell, R. M. Carman, D. D. Chapman, S. E. Cremer, A. D. Cross, K. R. Huffman, M. Kunstmann, N. J. McCorkindale, J. J. G. McNally, A. Rosowsky, F. H. L. Varino, R. L. West, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 3096–3113; c) D. S. Tarbell, R. M. Carman, D. D. Chapman, K. R. Huffman, N. J. McCorkindale, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 1005–1007.
- [75] N. McCorkindale, J. G. Sime, *Proc. Chem. Soc. London* **1961**, 331.
- [76] a) B. B. Snider, Dissertation, Harvard University **1973**; b) E. J. Corey, B. B. Snider, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2549–2550.
- [77] a) D. Kim, S. K. Ahn, H. Bae, W. J. Choi, H. S. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4437–4440; weitere Synthesen von Fumagillin/Fumagillol: b) O. Bedel, A. Haudrechy, Y. Langlois, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3813–3819; c) D. F. Taber, T. E. Christos, A. L. Rheingold, I. A. Guzei, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5589–5590.
- [78] D. A. Vosburg, S. Weiler, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1024–1027; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 971–974.
- [79] a) P. Bollinger, H. P. Sigg, H. P. Weber, *Helv. Chim. Acta* **1973**, 56, 819–830; b) H. P. Sigg, H. P. Weber, *Helv. Chim. Acta* **1968**, 51, 1395–1408.
- [80] a) H. Hatanaka, T. Kino, M. Hashimoto, Y. Tsurumi, A. Kuroda, H. Tanaka, T. Goto, M. Okuhara, *J. Antibiot.* **1988**, 41, 999–1008; b) S. Amano, N. Ogawa, M. Ohtsuka, N. Chida, *Tetrahedron* **1999**, 55, 2205–2224.
- [81] a) D. E. Cane, D. B. McIlwaine, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6545–6548; b) D. E. Cane, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 6132–6134; c) D. E. Cane, G. G. S. King, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 4737–4740; d) D. E. Cane, R. H. Levin, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 1183–1188; e) D. E. Cane, R. H. Levin, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1282–1284; f) M. Tanabe, K. T. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 4417–4420; g) A. J. Birch, S. F. Hussain, *J. Chem. Soc. C* **1969**, 1473–1474.
- [82] Y. Honda, M. Ueki, G. Okada, R. Onose, R. Usami, K. Horikoshi, H. Osada, *J. Antibiot.* **2001**, 54, 10–16.
- [83] H. Nakajima, S. Takase, H. Terano, H. Tanaka, *J. Antibiot.* **1997**, 50, 96–99.
- [84] E. C. Griffith, Z. Su, S. Niwayama, C. A. Ramsay, Y. H. Chang, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 15183–15188.
- [85] E. C. Griffith, Z. Su, B. E. Turk, S. P. Chen, Y. H. Chang, Z. C. Wu, K. Biemann, J. O. Liu, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 461–471.
- [86] J. Y. Wang, G. S. Sheppard, P. P. Lou, M. Kawai, C. Park, D. A. Egan, A. Schneider, J. Bouska, R. Lesniewski, J. Henkin, *Biochemistry* **2003**, 42, 5035–5042.
- [87] S. P. Liu, J. Widom, C. W. Kemp, C. M. Crews, J. Clardy, *Science* **1998**, 282, 1324–1327.
- [88] M. D. Vaughan, P. B. Sampson, J. F. Honek, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 385–409.
- [89] a) R. A. Bradshaw, W. W. Brickey, K. W. Walker, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 263–267; b) R. L. Kendall, R. Yamada, R. A. Bradshaw, *Methods Enzymol.* **1990**, 185, 398–407.
- [90] C. M. Brdlik, C. M. Crews, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 9475–9480.
- [91] a) A. Catalano, M. Romano, I. Robuffo, L. Strizzi, A. Procopio, *Am. J. Pathol.* **2001**, 159, 721–731; b) N. Wernert, A. Stanjek, S. Kiriakidis, A. Hügel, H. C. Jha, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3432–3435; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3228–3231; c) B. E. Turk, Z. Su, J. O. Liu, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1163–1169.
- [92] J. Taunton, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 493–496.

- [93] a) H. Katznelson, C. A. Jamieson, *Science* **1952**, *115*, 70–71; b) J. H. Killough, G. B. Magill, R. C. Smith, *Science* **1952**, *115*, 71–72; c) M. C. McCowen, M. E. Callender, J. F. Lawlis, *Science* **1951**, *113*, 202–203.
- [94] J. H. Wilkins, N. Joshi, T. P. Margolis, V. Cevallos, C. R. Dawson, *Eye* **1994**, *8*, 703–704.
- [95] a) J. M. Molina, M. Tourneur, C. Sarfati, S. Chevret, A. de Gouvello, J. G. Gobert, S. Balkan, F. Derouin, *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1963–1969; b) J. M. Molina, J. Goguel, C. Sarfati, J. F. Michiels, I. Desportes-Livage, S. Balkan, C. Chastang, L. Cotte, C. Maslo, A. Struxiano, F. Derouin, J. M. Decazes, *AIDS* **2000**, *14*, 1341–1348.
- [96] P. Zhang, D. E. Nicholson, J. M. Bujnicki, X. Z. Su, J. J. Brendle, M. Ferdig, D. E. Kyle, W. K. Milhous, P. K. Chiang, *J. Biomed. Sci.* **2002**, *9*, 34–40.
- [97] a) E. S. Didier, M. E. Stovall, L. C. Green, P. J. Brindley, K. Sestak, P. Didier, *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 145–166; b) E. S. Didier, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1541–1546.
- [98] D. Ingber, T. Fujita, S. Kishimoto, K. Sudo, T. Kanamaru, H. Brem, J. Folkman, *Nature* **1990**, *348*, 555–557.
- [99] a) G. Bergers, K. Javaherian, K. M. Lo, J. Folkman, D. Hanahan, *Science* **1999**, *284*, 808–812; b) R. Offodile, T. Walton, M. Lee, A. Stiles, M. Nguyen, *Tumori* **1999**, *85*, 51–53; c) M. Kusaka, K. Sudo, E. Matsutani, Y. Kozai, S. Marui, T. Fujita, D. Ingber, J. Folkman, *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 212–216; d) T. Yanase, M. Tamura, K. Fujita, S. Kodama, K. Tanaka, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2566–2570.
- [100] C. K. Han, S. K. Ahn, N. S. Choi, R. K. Hong, S. K. Moon, H. S. Chun, S. J. Lee, J. W. Kim, C. I. Hong, D. Kim, J. H. Yoon, K. T. No, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 39–43.
- [101] S. Kim, K. LaMontagne, M. Sabio, S. Sharma, R. W. Versace, N. Yusuff, P. E. Phillips, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2984–2987.
- [102] W. T. Lowther, A. M. Orville, D. T. Madden, S. J. Lim, D. H. Rich, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7678–7688.
- [103] C. D. P. Klein, R. Schiffmann, G. Folkers, S. Piana, U. Rothlisberger, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47862–47867.
- [104] W. T. Lowther, Y. Zhang, P. B. Sampson, J. F. Honek, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14810–14819.
- [105] a) J. MacMillan, A. E. Vanstone, S. K. Yeboah, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 2892–2898; b) J. MacMillan, T. J. Simpson, A. E. Vanstone, S. K. Yeboah, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 2898–2903; c) J. MacMillan, T. J. Simpson, S. K. Yeboah, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 1063; d) J. MacMillan, A. E. Vanstone, S. K. Yeboah, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 613–614; e) P. W. Brian, P. J. Curtis, H. G. Hemming, G. L. F. Norris, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1957**, *40*, 365–368.
- [106] a) P. Wipf, R. J. Halter, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 2053–2061; b) J. R. Hanson, *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 381–384.
- [107] a) R. H. Lee, D. L. Slate, R. Moretti, K. A. Alvi, P. Crews, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 765–772; b) M. A. Ferreira, T. J. King, S. Ali, R. H. Thomson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 249–256; c) K. C. Joshi, P. Singh, R. T. Pardasani, A. Pelter, R. S. Ward, R. Reinhardt, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 4719–4722.
- [108] a) T. Mizutani, S. Honzawa, S. Tosaki, M. Shibasaki, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4874–4876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4680–4682; b) S. Sato, M. Nakada, M. Shibasaki, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6141–6144.
- [109] a) P. W. Brian, J. C. McGowan, *Nature* **1945**, *156*, 144–145; b) Totalsynthese von racemischem Viridin: E. A. Anderson, E. J. Alexanian, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2032–2035; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1998–2001.
- [110] W. S. Golder, T. R. Watson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 422–425.
- [111] C. P. Downes, A. N. Carter, *Cell. Signalling* **1991**, *3*, 501–513.
- [112] a) E. H. Walker, O. Perisic, C. Reid, L. Stephens, R. L. Williams, *Nature* **1999**, *402*, 313–320; b) J. Djordjevic, P. C. Driscoll, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 426–432.
- [113] K. Kim, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11096–11097.
- [114] a) G. J. Brunn, J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J. C. Lawrence, R. T. Abraham, *EMBO J.* **1996**, *15*, 5256–5267; b) S. Boulton, S. Kyle, L. Yalcintepe, B. W. Durkacz, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2285–2290.
- [115] a) D. D. Boehr, W. S. Lane, G. D. Wright, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 791–800; b) S. Corvera, M. P. Czech, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 442–446; c) S. Nakanishi, S. Kakita, I. Takahashi, K. Kawahara, E. Tsukuda, T. Sano, K. Yamada, M. Yoshida, H. Kase, Y. Matsuda, Y. Hashimoto, Y. Nonomura, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2157–2163.
- [116] a) E. S. Gershtein, V. A. Shatskaya, V. D. Ermilova, N. E. Kushlinsky, M. A. Krasil'nikov, *Clin. Chim. Acta* **1999**, *287*, 59–67; b) W. A. Phillips, F. St. Clair, A. D. Munday, R. J. S. Thomas, C. A. Mitchell, *Cancer* **1998**, *83*, 41–47.
- [117] C. P. Downes, D. Bennett, G. McConnachie, N. R. Leslie, I. Pass, C. MacPhee, L. Patel, A. Gray, *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 846–851.
- [118] P. Wipf, D. J. Minion, R. J. Halter, M. I. Berggren, C. B. Ho, G. G. Chiang, L. Kirkpatrick, R. Abraham, G. Powis, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1911–1920.
- [119] N. T. Ihle, R. Williams, S. Chow, W. Chew, M. I. Berggren, G. Paine-Murrieta, D. J. Minion, R. J. Halter, P. Wipf, R. Abraham, L. Kirkpatrick, G. Powis, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 763–772.
- [120] a) B. H. Norman, C. Shih, J. E. Toth, J. E. Ray, J. A. Dodge, D. W. Johnson, P. G. Rutherford, R. M. Schultz, J. F. Worzalla, C. J. Vlahos, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1106–1111; b) B. H. Norman, J. Paschal, C. J. Vlahos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1183–1186; c) W. Haeffliger, Z. Kis, D. Hauser, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 1620–1633.
- [121] M. P. Wymann, G. Bulgarelli-Leva, M. J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield, G. Panayotou, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1722–1733.
- [122] E. H. Walker, M. E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P. T. Hawkins, M. P. Wymann, R. L. Williams, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 909–919.
- [123] Madhusudan, E. A. Trafny, N. H. Xuong, J. A. Adams, L. F. Teneyck, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 176–187.
- [124] Y. Liu, K. R. Shreder, W. Gai, S. Corral, D. K. Ferris, J. S. Rosenblum, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 99–107.
- [125] Im englischen Original lautet dieses Zitat: „There is a bark of an English tree, which I have found by experience to be a powerful astringent, and very efficacious in curing aguish und intermitting disorders.“ E. Stone, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1763**, *53*, 195–200.
- [126] a) G. Weissman, *Sci. Am.* **1991**, *264*, 84–90; b) K. D. Rainsford, *Aspirin and the Salicylates*, Thetford, England, **1984**.
- [127] a) T. M. Ruuhola, M. R. K. Julkunen-Tiitto, *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 895–905; b) H. I. Lee, J. Leon, I. Raskin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4076–4079; c) S. Z. El-Basyoni, D. Chen, R. K. Ibrahim, A. C. Neish, G. H. N. Towers, *Phytochemistry* **1964**, *3*, 485–492.
- [128] G. Alibert, R. Ranjeva, *FEBS Lett.* **1971**, *19*, 11–14.
- [129] H. Dreser, *Pfluegers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* **1899**, *76*, 306.
- [130] J. R. Vane, *Nature New Biol.* **1971**, *231*, 232–235.
- [131] J. A. Oates, *Science* **1982**, *218*, 765–768.
- [132] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth, New York, **2000**, S. 378.
- [133] a) W. L. Smith, D. L. Dewitt, T. Shimokawa, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **1991**, *21*, 77–80; b) D. L. Dewitt, E. A. El-Harith, S. A. Kraemer, M. J. Andrews, E. F.

- Yao, R. L. Armstrong, W. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 5192–5198.
- [134] a) A. S. L. Xu, Y. O. L. Vida, R. J. Labotka, R. E. London, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 60, 917–922; b) J. E. Walker, *FEBS Lett.* **1976**, 66, 173–175; c) D. Hawkins, R. N. Pinckard, R. S. Farr, *Science* **1968**, 160, 780–781.
- [135] L. P. Wennogle, H. Liang, J. C. Quintavalla, B. R. Bowen, J. Wasvary, D. B. Miller, A. Allentoff, W. Boyer, M. Kelly, P. Marshall, *FEBS Lett.* **1995**, 371, 315–320.
- [136] a) S. W. Rowlinson, J. R. Kiefer, J. J. Prusakiewicz, J. L. Pawlitz, K. R. Kozak, A. S. Kalgutkar, W. C. Stallings, R. G. Kurumbail, L. J. Marnett, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45763–45769; b) W. L. Smith, D. L. DeWitt, R. M. Garavito, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 149–182.
- [137] F. J. van der Ouderaa, M. Buytenhek, D. H. Nugteren, D. A. Vondorp, *Eur. J. Biochem.* **1980**, 109, 1–8.
- [138] E. D. Thuresson, K. M. Lakkides, C. J. Rieke, Y. Sun, B. A. Wingerd, R. Micielli, A. M. Mulichak, M. G. Malkowski, R. M. Garavito, W. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10347–10357.
- [139] T. Shimokawa, R. J. Kulmacz, D. L. DeWitt, W. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 20073–20076.
- [140] a) R. G. Kurumbail, J. R. Kiefer, L. J. Marnett, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 752–760; b) M. G. Malkowski, S. L. Ginell, W. L. Smith, R. M. Garavito, *Science* **2000**, 289, 1933–1937.
- [141] G. P. Hochgesang, S. W. Rowlinson, L. J. Marnett, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6514–6515.
- [142] J. A. Mancini, D. Riendeau, J. P. Falgoutyret, P. J. Vickers, G. P. O'Neill, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29372–29377.
- [143] D. K. Bhattacharyya, M. Lecomte, C. J. Rieke, M. Garavito, W. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 2179–2184.
- [144] P. J. Loll, D. Picot, R. M. Garavito, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 637–643.
- [145] R. Amann, B. A. Peskar, *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 447, 1–9.
- [146] G. Francis, *Nature* **1878**, 18, 11–12.
- [147] a) L. Zhou, H. Yu, K. Chen, *Biomed. Environ. Sci.* **2002**, 15, 166–171; b) C. Mackintosh, K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, G. A. Codd, *FEBS Lett.* **1990**, 264, 187–192.
- [148] D. G. Steyn, *S. Afr. J. Sci.* **1945**, 41, 243–244.
- [149] C. T. Bishop, E. F. L. J. Anet, P. R. Gorham, *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 453–471.
- [150] a) S. Santikarn, D. H. Williams, R. J. Smith, S. J. Hammond, D. P. Botes, A. Tuinman, P. L. Wessels, C. C. Viljoen, H. Kruger, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 652–654; b) D. P. Botes, C. C. Viljoen, H. Kruger, P. L. Wessels, D. H. Williams, *S. Afr. J. Sci.* **1982**, 78, 378–379; c) T. C. Elleman, I. R. Falconer, A. R. B. Jackson, M. T. Runnegar, *Aust. J. Biol. Sci.* **1978**, 31, 209–218.
- [151] D. P. Botes, A. A. Tuinman, P. L. Wessels, C. C. Viljoen, H. Kruger, D. H. Williams, S. Santikarn, R. J. Smith, S. J. Hammond, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1984**, 2311–2318.
- [152] a) W. W. Carmichael, J. W. He, J. Eschedor, Z. R. He, Y. M. Juan, *Toxicol.* **1988**, 26, 1213–1217; b) D. P. Botes, P. L. Wessels, H. Kruger, M. T. C. Runnegar, S. Santikarn, R. J. Smith, J. C. J. Barna, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, 2747–2748.
- [153] K. L. Rinehart, K. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8557–8558.
- [154] W. W. Carmichael, V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K. I. Harada, T. Krishnamurthy, M. J. Yu, R. E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg, M. Watanabe, *Toxicol.* **1988**, 26, 971–973.
- [155] a) L. A. Lawton, C. Edwards, *J. Chromatogr. A* **2001**, 912, 191–209; b) M. Namikoshi, B. W. Choi, R. Sakai, F. Sun, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, W. R. Evans, P. Cruz, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2349–2357; c) M. Craig, T. L. McCready, H. A. Luu, M. A. Smillie, P. Dubord, C. F. B. Holmes, *Toxicol.* **1993**, 31, 1541–1549.
- [156] R. E. Moore, J. L. Chen, B. S. Moore, G. M. L. Patterson, W. W. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5083–5084.
- [157] a) M. Kaebernick, E. Dittmann, T. Börner, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 449–455; b) E. Dittmann, B. A. Neilan, T. Börner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57, 467–473; c) L. H. Du, C. Sanchez, B. Shen, *Metab. Eng.* **2001**, 3, 78–95; d) D. Tillett, E. Dittmann, M. Erhard, H. von Dohren, T. Börner, B. A. Neilan, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 753–764.
- [158] a) G. Christiansen, J. Fastner, M. Erhard, T. Börner, E. Dittmann, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 564–572; b) T. Nishizawa, A. Ueda, M. Asayama, K. Fujii, K. Harada, K. Ochi, M. Shirai, *J. Biochem.* **2000**, 127, 779–789.
- [159] a) M. Runnegar, N. Berndt, S. M. Kong, E. Y. C. Lee, L. F. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 216, 162–169; b) G. Moorhead, R. W. Mackintosh, N. Morrice, T. Gallagher, C. Mackintosh, *FEBS Lett.* **1994**, 356, 46–50; c) R. Matsushima, S. Yoshizawa, M. F. Watanabe, K. Harada, M. Furusawa, W. W. Carmichael, H. Fujiki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 171, 867–874; d) R. E. Honkanen, J. Zwiller, R. E. Moore, S. L. Daily, B. S. Khatra, M. Dukelow, A. L. Boynton, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 19401–19404.
- [160] R. E. Honkanen, T. Golden, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 2055–2075.
- [161] W. P. Taylor, T. S. Widlanski, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 713–718.
- [162] a) P. T. W. Cohen, *J. Cell Sci.* **2002**, 115, 241–256; b) D. M. Virshup, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12, 180–185.
- [163] a) H. Ceulemans, M. Bollen, *Physiol. Rev.* **2004**, 84, 1–39; b) V. Janssens, J. Goris, *Biochem. J.* **2001**, 353, 417–439; c) J. Goldberg, H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, J. Kuriyan, *Nature* **1995**, 376, 745–753; d) S. Shenolikar, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1994**, 10, 55–86.
- [164] B. M. Gulledge, J. B. Aggen, H. B. Huang, A. C. Nairn, A. R. Chamberlin, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1991–2003.
- [165] J. M. Humphrey, J. B. Aggen, A. R. Chamberlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11759–11770.
- [166] K. R. Shreder, Y. Liu, T. Nomanhboy, S. R. Fuller, M. S. Wong, W. Z. Gai, J. Wu, P. S. Leventhal, J. R. Lill, S. Corral, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 790–798.
- [167] N. Kudo, N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, S. Horinouchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9112–9117.
- [168] K. Ueda, T. Usui, H. Nakayama, M. Ueki, K. Takio, M. Ubukata, H. Osada, *FEBS Lett.* **2002**, 525, 48–52.
- [169] T. Usui, H. Watanabe, H. Nakayama, Y. Tada, N. Kanoh, M. Kondoh, T. Asao, K. Takio, H. Watanabe, K. Nishikawa, T. Kitahara, H. Osada, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 799–806.
- [170] C. F. B. Holmes, J. T. Maynes, K. R. Perreault, J. F. Dawson, M. N. G. James, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1981–1989.
- [171] F. Kondo, Y. Ikai, H. Oka, M. Okumura, N. Ishikawa, K. Harada, K. Matsuura, H. Murata, M. Suzuki, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 591–596.
- [172] M. van Iersel, Dissertation, Wageningen Universiteit **1998**.
- [173] M. Craig, H. A. Luu, T. L. McCready, D. Williams, R. J. Andersen, C. F. B. Holmes, *Biochem. Cell Biol.* **1996**, 74, 569–578.
- [174] Z. Zhang, S. Zhao, S. Deans-Zirattu, G. Bai, E. Y. Lee, *Mol. Cell. Biochem.* **1993**, 127–128, 113–119.
- [175] a) J. B. Smaill, H. D. Showalter, H. Zhou, A. J. Bridges, D. J. McNamara, D. W. Fry, J. M. Nelson, V. Sherwood, P. W. Vincent, B. J. Roberts, W. L. Elliott, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 429–440; b) J. B. Smaill, B. D. Palmer, G. W. Rewcastle, W. A. Denny, D. J. McNamara, E. M. Dobrusin, A. J. Bridges, H. Zhou, H. D. Showalter, R. T. Winters, W. R. Leopold, D. W. Fry, J. M. Nelson, V. Slintak, W. L. Elliot, B. J.

- Roberts, P. W. Vincent, S. J. Patmore, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1803–1815; c) D. W. Fry, A. J. Bridges, W. A. Denny, A. Doherty, K. D. Greis, J. L. Hicks, K. E. Hook, P. R. Keller, W. R. Leopold, J. A. Loo, D. J. McNamara, J. M. Nelson, V. Sherwood, J. B. Smaill, S. Trumpp-Kallmeyer, E. M. Dobrusin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12022–12027; d) M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, *Science* **2005**, *308*, 1318–1321.
- [176] T. Hamamoto, S. Gunji, H. Tsuji, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 639–645.
- [177] a) Y. Hayakawa, K. Sohda, H. Seto, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 980–984; b) Y. Hayakawa, K. Sohda, K. Shin-ya, T. Hidaka, H. Seto, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 974–979; c) K. Gerth, D. Schummer, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 973–976; d) D. Schummer, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1995**, 685–688; e) K. Abe, M. Yoshida, S. Horinouchi, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 728–734; f) K. Abe, M. Yoshida, H. Naoki, S. Horinouchi, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 735–740; g) Y. Hayakawa, K. Adachi, N. Komeshima, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1349–1352; h) K. Komiyama, K. Okada, Y. Hirokawa, K. Masuda, S. Tomisaka, I. Umezawa, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 224–229; i) K. Komiyama, K. Okada, H. Oka, S. Tomisaka, T. Miyano, S. Funayama, I. Umezawa, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 220–223.
- [178] T. Hamamoto, H. Seto, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 646–650.
- [179] T. Hamamoto, T. Uozumi, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 533–535.
- [180] T. Hamamoto, T. Uozumi, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1573–1580.
- [181] a) T. Meissner, E. Krause, U. Vinkemeier, *FEBS Lett.* **2004**, *576*, 27–30; b) B. Wolff, J. J. Sanglier, Y. Wang, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 139–147.
- [182] M. Fukuda, S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, E. Nishida, *Nature* **1997**, *390*, 308–311.
- [183] E. A. Nigg, *Nature* **1997**, *386*, 779–787.
- [184] a) D. Goerlich, U. Kutay, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 607–660; b) B. Ossareh-Nazari, F. Bachelier, C. Dargemont, *Science* **1997**, *278*, 141–144; c) K. Stade, C. S. Ford, C. Guthrie, K. Weis, *Cell* **1997**, *90*, 1041–1050.
- [185] a) N. Kudo, B. Wolff, T. Sekimoto, E. P. Schreiner, Y. Yoneda, M. Yanagida, S. Horinouchi, M. Yoshida, *Exp. Cell Res.* **1998**, *242*, 540–547; b) M. Fornerod, M. Ohno, M. Yoshida, I. W. Mattaj, *Cell* **1997**, *90*, 1051–1060.
- [186] a) T. J. Hope, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 186–191; b) A. Heguy, *Front. Biosci.* **1997**, *2*, 283–293.
- [187] S. Lain, C. Midgley, A. Sparks, E. B. Lane, D. P. Lane, *Exp. Cell Res.* **1999**, *248*, 457–472.
- [188] T. R. Kau, P. A. Silver, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 78–85.
- [189] a) M. Köster, S. Lykke-Andersen, Y. A. Elnakady, K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, F. Sasse, J. Kjems, H. Hauser, *Exp. Cell Res.* **2003**, *286*, 321–331; Ratjadon führt überdies zu einem Zellzyklusstopp in der G1-Phase, und nicht in G1- und G2-Phase wie Leptomycin und Callystatin: b) M. Kalesse, K. P. Chary, M. Quitschalle, A. Burzlaff, C. Kasper, T. Scheper, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1129–1136. Die Konfiguration an C(10) ist entscheidend für die Aktivität von Ratjadon: c) M. Kalesse, M. Christmann, U. Bhatt, M. Quitschalle, E. Claus, A. Saeed, A. Burzlaff, C. Kasper, L. O. Haustedt, E. Hofer, T. Scheper, W. Beil, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 709–714; d) A. Burzlaff, M. Kalesse, C. Kasper, T. Scheper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 174–179.
- [190] M. Neville, M. Rosbash, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3746–3756.
- [191] a) M. Kalesse, M. Christmann, *Synthesis* **2002**, 981–1003; b) N. Murakami, M. Sugimoto, M. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 57–67; c) N. Murakami, M. Sugimoto, T. Nakajima, M. Kawanishi, Y. Tsutsui, M. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2651–2661.
- [192] M. Kuhnt, F. Bitsch, M. Ponelle, J. J. Sanglier, Y. Wang, B. Wolff, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 714–720.
- [193] K. Weis, *Cell* **2003**, *112*, 441–451.
- [194] E. S. Newlands, *Br. J. Cancer* **1996**, *74*, 648–649.
- [195] M. Kobayashi, W. Q. Wang, Y. Tsutsui, M. Sugimoto, N. Murakami, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8291–8294.
- [196] K. Kobayashi, S. Miyazawa, A. Terahara, H. Mishima, H. Kurihara, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 537–540.
- [197] a) S. A. Shah, B. W. Shen, A. T. Brunger, *Structure* **1997**, *5*, 1067–1075; b) G. Burnett, K. Yonaha, S. Toyama, K. Soda, C. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 428–432; c) R. R. Rando, F. W. Bangerter, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5141–5145; d) R. R. Rando, F. W. Bangerter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 1276–1281; e) R. R. Rando, *Biochemistry* **1977**, *16*, 4604–4610; f) R. R. Rando, F. W. Bangerter, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6762–6764.
- [198] a) N. Jessani, M. Humphrey, W. H. McDonald, S. Niessen, K. Masuda, B. Gangadharan, J. R. Yates, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13756–13761; b) N. Jessani, Y. S. Liu, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10335–10340.
- [199] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1523–1531.
- [200] D. C. Greenbaum, A. Baruch, M. Grainger, Z. Bozdech, K. F. Medzihradszky, J. Engel, J. DeRisi, A. A. Holder, M. Bogoy, *Science* **2002**, *298*, 2002–2006.
- [201] a) D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 687–691; b) D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradszky, M. Bogoy, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 60–68.
- [202] a) M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, *1*, 1067–1071; b) D. Kidd, Y. S. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005–4015; c) Y. S. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [203] a) L. Faleiro, R. Kobayashi, H. Fearnhead, Y. Lazebnik, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2271–2281; b) N. A. Thornberry, E. P. Peterson, J. J. Zhao, A. D. Howard, P. R. Griffin, K. T. Chapman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3934–3940.
- [204] a) E. W. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14435–14446; b) A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10000–10005.
- [205] a) G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1363–1368; b) G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805–809; c) G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 81–95.