

# Der Inhibitionsmechanismus der caseinolytischen Protease (ClpP)\*\*

Malte Gersch, Felix Gut, Vadim S. Korotkov, Johannes Lehmann, Thomas Böttcher,  
Marion Rusch, Christian Hedberg, Herbert Waldmann, Gerhard Klebe und Stephan A. Sieber\*

Die Aufrechterhaltung der Homöostase auf Proteinebene stellt eine wichtige Voraussetzung für die zelluläre Funktionsfähigkeit dar. Prokaryonten weisen hierfür einige proteolytische Enzyme auf, darunter ClpXP.<sup>[1]</sup> Der erste Kleinmolekülinhibitor für die proteolytische Untereinheit von ClpP wurde von uns 2008 vorgestellt. In der Folge konnten wir zeigen, dass die Inhibition des Enzyms in lebenden Bakterien deren Fähigkeit, virulente Faktoren wie beispielsweise lebensbedrohliche Toxine zu bilden, bedeutend abschwächt.<sup>[2]</sup> Obgleich ClpP Gegenstand umfangreicher Untersuchungen mit biochemischen und strukturanalytischen Methoden war,<sup>[3]</sup> ist der Mechanismus der Inhibition durch Kleinmoleküle weitgehend unverstanden. Um die chemische Inhibition als Ansatz einer neuen antibakteriellen Therapie nutzen zu können, ist es wichtig, systematisch das Bindungszentrum, den Mechanismus der Inhibition, stereochemische Präferenzen des Enzyms für Inhibitoren, den chemischen Raum möglicher Inhibitoren sowie die Hemmung weiterer Mitglieder der ClpP-Familie zu analysieren. Ein bedeutender Schritt in diese Richtung war die vor kurzem erfolgte Aufklärung der Kristallstruktur des homotetradekameren ClpP von *Staphylococcus aureus* (SaClpP) in dessen aktiver Konformation.<sup>[4]</sup> Anhand dieser Strukturdaten stellen wir hier eine detaillierte Untersuchung der SaClpP-Inhibition durch  $\beta$ -Lactone vor. Die Untersuchung einer fokussierten Substanzbibliothek von enantiomerenreinen  $\beta$ -Lactonen enthüllte die *S,S*-Stereopräferenz der Protease, die durch Docking-Experimente nachvollzogen werden konnte. Docking-Experimente gewährten zudem Einblicke in eine bisher unbeachtete, tiefe hydrophobe Tasche neben dem aktiven

Zentrum, welche die Substituenten der  $\beta$ -Lactone in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe beherbergen. Die Bindungshypothese konnte durch Bindungsstudien mit Modellverbindungen, detaillierte kinetische Analyse und Mutagenesestudien belegt werden. Darüber hinaus führte der Austausch des  $\beta$ -Lacton-Gerüstes gegen andere chemische Gruppen zu einem Verlust der Inhibition, wodurch das  $\beta$ -Lacton-Gerüst als zentraler Bestandteil des kovalenten Inhibitionsmechanismus von ClpP hervorgehoben wird. Diese Ergebnisse gewähren neue Einblicke in den Mechanismus der ClpP-Inhibition und geben Hinweise für das Design von potennten und pharmakologisch optimierten Inhibitoren.

Wir begannen damit, die 22 enantiomerenreinen *trans*-substituierten  $\beta$ -Lactone **1–22** auf ClpP-Inhibition zu testen (Abbildung S1 A in den Hintergrundinformationen).<sup>[5]</sup> Diese Moleküle verbindet eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit unseren bisherigen  $\beta$ -Lacton-Kandidaten. Sie weisen eine Decylkette als R<sup>1</sup>-Substituenten und Strukturvariationen, sowohl in der Kettenlänge als auch in ihren funktionellen Gruppen, an der R<sup>2</sup>-Position auf (Abbildung 1 A). Für alle Verbindungen wurden beide *trans*-konfigurierten Enantiomere (*R,R* und *S,S*) auf Inhibition von rekombinant exprimiertem SaClpP in einem Assay getestet, der auf der Spaltung eines fluorogenen Substrats basiert.<sup>[4]</sup> Fast alle Verbindungen inhibierten SaClpP bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M (100-facher Überschuss zum Enzym) nach 15 min Inkubation bei 32°C (Abbildung S1 A). Durch Herabsetzen der Inhibitorkonzentration auf 10  $\mu$ M waren wir in der Lage, Unterschiede zwischen den untersuchten Verbindungen zu beobachten. Während die meisten *S,S*-konfigurierten Lacto-

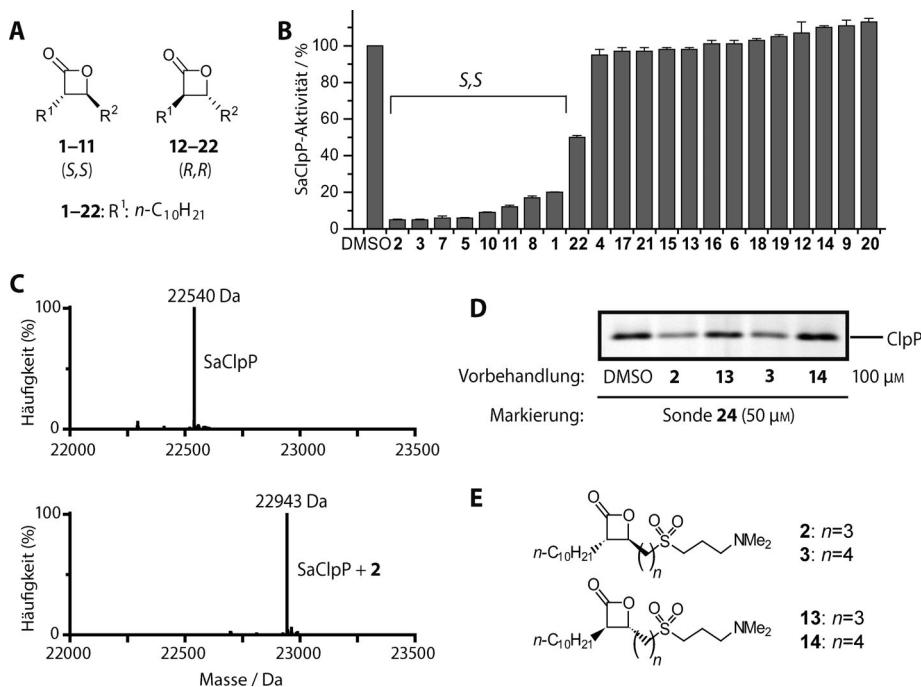
[\*] M. Gersch, Dr. V. S. Korotkov,<sup>[†]</sup> J. Lehmann, Prof. Dr. S. A. Sieber  
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPS<sup>M</sup>)  
Technische Universität München, Department für Chemie  
Institute of Advanced Studies (IAS)  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: stephan.sieber@tum.de  
F. Gut,<sup>[†]</sup> Prof. Dr. G. Klebe  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)  
Dr. M. Rusch, Dr. C. Hedberg, Prof. Dr. H. Waldmann  
Max Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Abteilung Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
und  
Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie  
Lehrbereich Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Dr. V. S. Korotkov,<sup>[†]</sup> Dr. T. Böttcher, Prof. Dr. S. A. Sieber  
Aviru Exist  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

Dr. T. Böttcher  
Harvard Medical School  
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology  
240 Longwood Ave., Boston, MA 02115 (USA)

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

[\*\*] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, FOR1409, SFB 749, SFB1035, CIPS<sup>M</sup> und dem Europäischen Forschungsrat (ERC Grant n°268309 und ERC Starting Grant n°259024) für finanzielle Förderung. Wir danken Martina Müller, Matthias Stahl, Mona Wolff, Jenny Sachweh, Daniela Bauer und Jan Vormacka für ihre Hilfe bei experimentellen Arbeiten, Ame Schröder und Marco Balabajew für ihre Unterstützung bei Docking-Experimenten und Matthew Nodwell für die kritische Begutachtung des Manuskriptes. M.G. und F.G. bedanken sich beim Heidelberger Life-Science Lab für die wissenschaftlich inspirierende Umgebung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (detaillierte Beschreibungen der chemischen Synthesen, biochemischen Methoden sowie der computergestützten Untersuchungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204690> zu finden.



**Abbildung 1.** A) Allgemeine Formel der untersuchten  $\beta$ -Lactone mit *S,S*- oder *R,R*-Konfiguration (**1-11** bzw. **12-22**).  $R^1$  ist  $n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$ ;  $R^2$  variiert. (Vergleiche Abbildung S1 für eine komplette Zusammenstellung der Strukturen.) B) Restaktivität von SaClpP (1  $\mu\text{M}$ ) nach Inkubation mit **1-22** (10  $\mu\text{M}$ ) für 15 min bei 32 °C. C) Massenspektroskopie mit intakten Proteinen offenbart eine Hemmung aller 14 SaClpP-Untereinheiten durch **2** (403.3 Da, 1.3-facher molarer Überschuss). D) Kompetitives Markierungsexperiment. *S. aureus*-NCTC-8325-Zellen wurden mit den genannten markierten Verbindungen bei 100  $\mu\text{M}$  für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Markierung erfolgte mit 50  $\mu\text{M}$  der ClpP-spezifischen Sonde **24** für 1 h. Nach der Lyse wurde Rhodaminazide an **24** über eine bioorthogonale Klick-Reaktion angehängt und das Proteom mit SDS-PAGE aufgetrennt. (Vergleiche Abbildung S2 für eine vollständige Darstellung des Gels und Abbildung S4A für Ladekontrollen.) E) Strukturformeln der Verbindungen **2** und **3** sowie **13** und **14**, die im kompetitiven Markierungsexperiment eingesetzt wurden.

ne zu einer Inhibition mit weniger als 10% Restaktivität führten, zeigten *R,R*-konfigurierte Lactone praktisch keine Inhibition (Abbildung 1B). Die Inkubation von SaClpP mit 1.3-fachem molarem Überschuss der potentesten Verbindung **2** führte zur Modifikation aller 14 Untereinheiten, wie durch Massenspektrometrie an intakten Proteinen gezeigt werden konnte (Abbildung 1C).

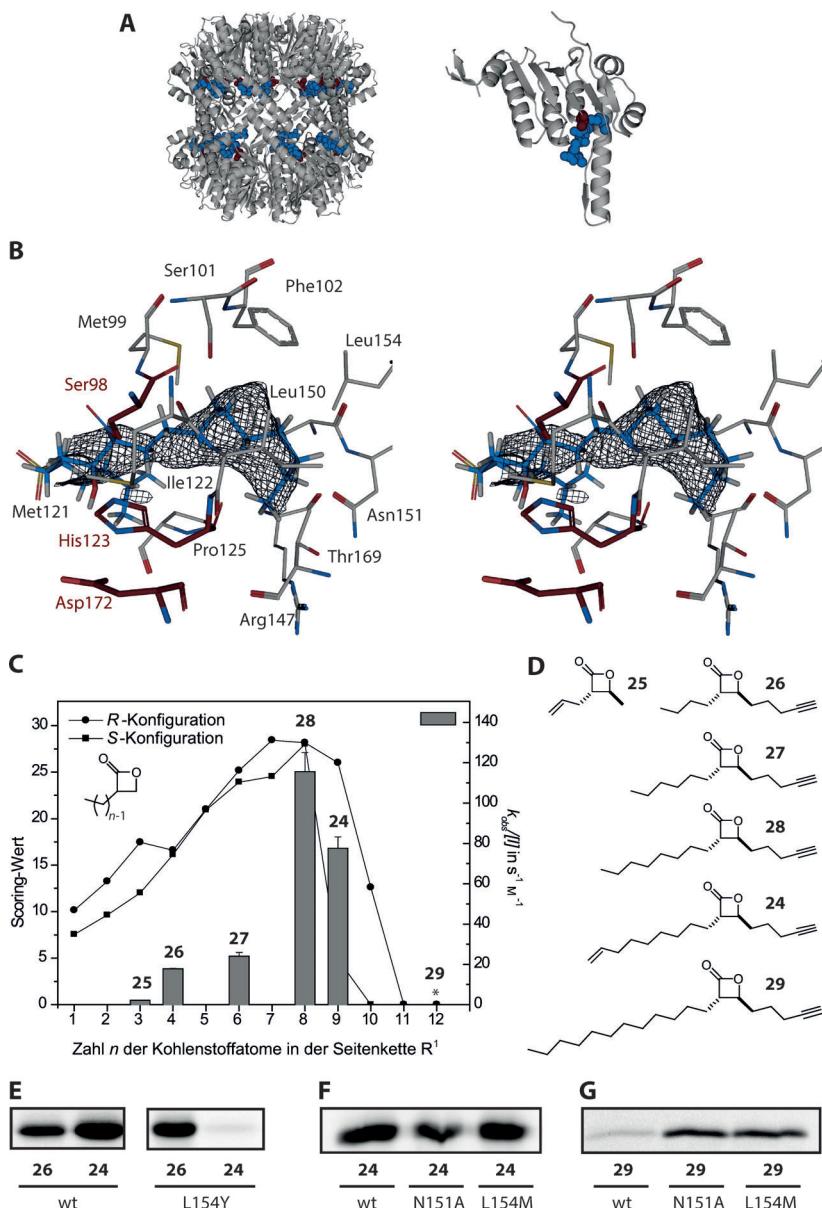
Um zu untersuchen, ob die starke In-vitro-Inhibition mit der ClpP-Bindung in lebenden Zellen korreliert, verwendeten wir die strukturell verwandte alkylierte Sonde **23** mit *S,S*-Konfiguration für eine In-situ-Markierung von *S. aureus* NCTC 8325 (Abbildung S2 A).<sup>[5b,6]</sup> Nach Inkubation und Zell-Lyse wurde ein Fluoreszenzfarbstoff über eine Klick-Reaktion<sup>[7]</sup> angehängt und das Proteom über SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese analysiert. Eine fluoreszierende Bande konnte auf derselben Höhe wie für die ClpP-spezifische Sonde **24**<sup>[2a]</sup> beobachtet werden; dies deutet darauf hin, dass das physiologische Zielprotein der getesteten Inhibitoren ClpP ist. Eine wesentlich schwächere Bande wurde bei dem *cis*-konfigurierten Analogon der Sonde **24** beobachtet und ist somit kennzeichnend für eine starke Bevorzugung von *trans*-konfigurierten  $\beta$ -Lactonen (Abbildung S2 B). Die Vorbe-

handlung von lebenden *S. aureus*-Zellen mit *S,S*-konfigurierten Lactonen **2** und **3** und eine folgende Markierung mit Verbindung **24** führten zu einem Rückgang der Fluoreszenzintensität der ClpP-Bande, während die entsprechenden *R,R*-konfigurierten Enantiomere **13** und **14** keinen Effekt zeigten (Abbildung 1D,E). Dieses kompetitive Markierungsexperiment bestätigt die physiologische Relevanz der In-vitro-Daten. Als Nächstes führten wir Molekül-Docking-Studien durch, um den Bindungsmodus zu entschlüsseln und die beobachteten Vorlieben für langketige aliphatische Substituenten und *S,S*-konfigurierte Lactone zu erklären.

$\beta$ -Lactone<sup>[8]</sup> binden kovalent an das katalytische Ser98,<sup>[2b]</sup> was zu einer Ringöffnung und einer Blockade des aktiven Zentrums durch einen katalytisch inaktiven  $\beta$ -Hydroxyacyl-Enzym-Komplex führt. Um die Geometrie des Acyl-Enzym-Komplexes zu bestimmen, wurde ein kovalentes Docking in die Kristallstruktur des aktiven SaClpP mit allen bekannten Inhibitoren durchgeführt (Abbildung 2 A,B).<sup>[4]</sup> Erstaunlicherweise ragte in allen gut bewerteten Docking-Lösungen die hydrophobe  $R^1$ -Kette in eine tiefe Tasche neben dem aktiven Zentrum des Proteins

(Abbildung 2B und Abbildung S3 A). Während der Eingang der Tasche eng ist und der S1-Tasche der Protease entspricht,<sup>[9]</sup> weitet sich der Kanal zu einem abgeschlossenen Hohlraum, dessen physiologische Rolle unklar ist. Die Besetzung dieses Kanals zusammen mit dem abgeschlossenen Hohlraum durch einen Liganden resultiert höchstwahrscheinlich in einer Verdrängung von Wassermolekülen und reduziert damit die solvensexponierte Oberfläche um etwa 165  $\text{\AA}^2$ , von der 65% unpolär ist (Tabelle S1 und Abbildung S3 B).<sup>[10]</sup> Die Bindung des hydrophoben  $R^1$ -Substituenten in die Tasche stellt möglicherweise die Triebkraft für eine anfängliche Annäherung des Liganden an das Protein dar, woraufhin ein nukleophiler Angriff des Ser98 aufgrund räumlicher Nähe zum  $\beta$ -Lacton erfolgt.<sup>[11]</sup>

Um die Seitenkettenlängen am Liganden zu ermitteln, die den zur Verfügung stehenden Raum optimal ausfüllen, führten wir ein kovalentes Docking unter Verwendung einer virtuellen Bibliothek von  $\beta$ -Lactonen durch, die aus Verbindungen mit aliphatischen Ketten als  $R^1$ -Substituenten mit Kettenlängen von einem bis zwölf Kohlenstoffatomen besteht (Abbildung 2C). Die „Scoring“-Werte des Dockings stiegen mit der Länge der Substituenten bei einem Maximum von

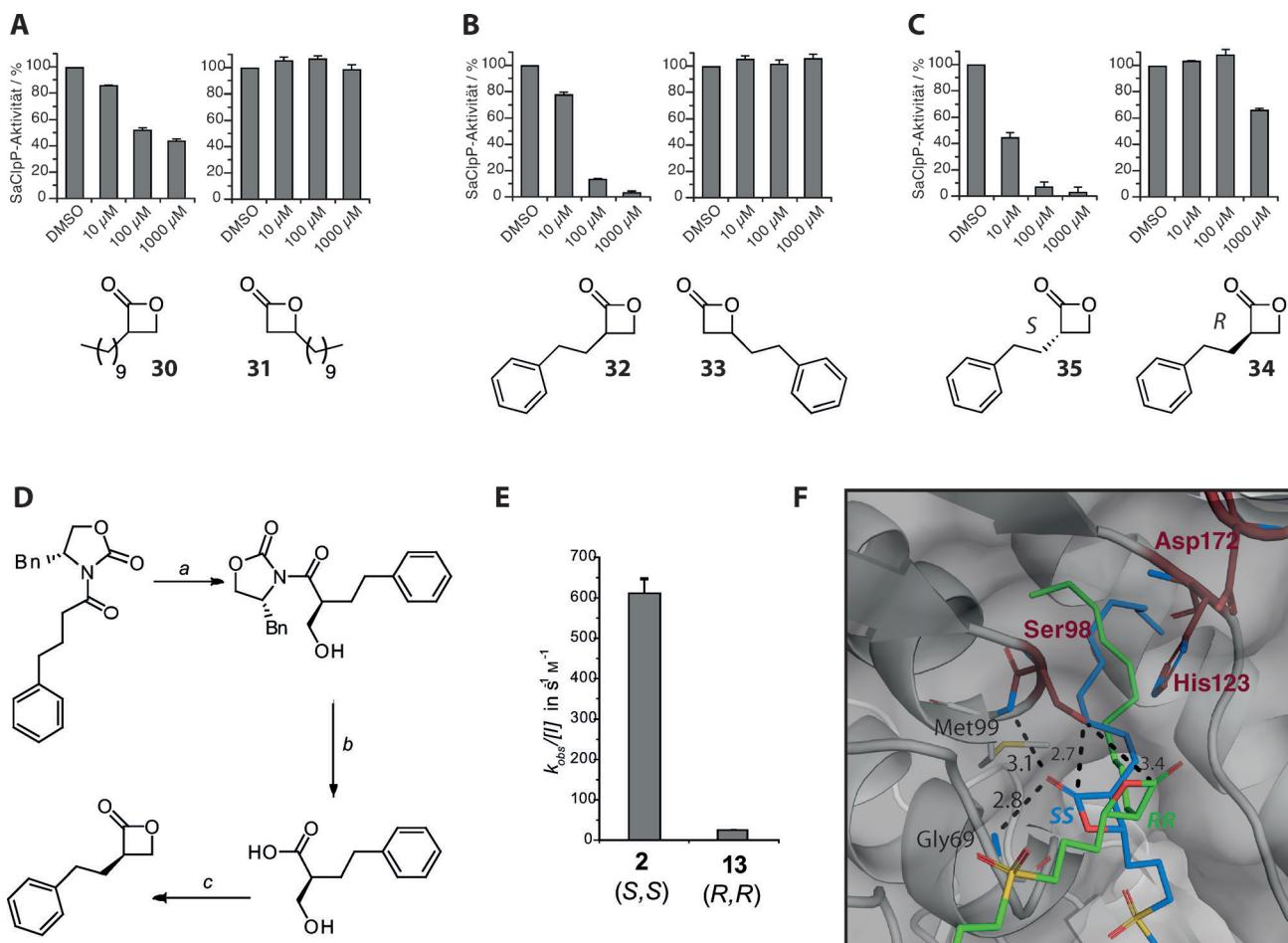


**Abbildung 2.** A) Molekulares Docking von **2** (hellblau), kovalent gebunden an das katalytische Serin 98 (rot) der SaClpP, dargestellt als Tetradekamer (linkes Bild) und als Monomer (rechtes Bild). B) Stereoansicht der Docking-Lösung, welche die Anwesenheit einer hydrophoben Tasche (schwarzes Gitter) neben dem aktiven Zentrum (rot) zeigt, die den R<sup>1</sup>-Substituenten des Liganden (*n*-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>) aufnimmt. C) Dockingwerte für virtuelle Lactone, deren aliphatische R<sup>1</sup>-Seitenketten verschiedene Längen aufweisen.  $k_{obs}/[I]$ -Werte für die racemischen Verbindungen **24–28**, gemessen an rekombinant exprimiertem SaClpP (vergleiche Abbildung S5). \*: Verbindung **29** zeigte keine Inhibition von SaClpP. D) Strukturformeln der Verbindungen **24–29**, die sich in der Länge ihrer aliphatischen R<sup>1</sup>-Seitenketten unterscheiden. E) Die L154Y-Mutante konnte entsprechend ihrer kleineren Bindungstasche durch Verbindung **26**, nicht jedoch durch Verbindung **24** markiert werden. F,G) Wildtyp-SaClpP wird durch die Sonde **24** markiert, nicht jedoch durch Sonde **28**. Die Mutanten N151A und L154M mit einer vergrößerten Bindetasche werden von beiden Sonden, **24** und **28**, markiert. (Vergleiche Abbildung S4 B–D für Ladekontrollen.)

acht Atomen an. Nur Seitenketten mit bis zu zehn Atomen konnten in der Tasche platziert werden (Abbildung 2C). Als Nächstes beabsichtigten wir, die theoretischen Ergebnisse mit einem experimentellen Inhibitionssassay zu validieren. IC<sub>50</sub>-Werte von kovalenten Inhibitoren hängen stark von der Inkubationszeit und der verwendeten Enzymkonzentration ab.<sup>[12]</sup> Daher verwendeten wir  $k_{obs}/[I]$ -Werte als quantitatives Maß der Inhibitionssstärke.<sup>[13]</sup> Wir synthetisierten Verbindungen **25, 27–29** und entwickelten einen weiteren Substratassay, in dem der Anstieg der Fluoreszenz während der Inhibition direkt beobachtet wird und von welchem wir Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{obs}$ ) ermittelten. In Übereinstimmung mit den „Scoring“-Werten führte eine Verlängerung der Seitenkette von **3** (**25**) über **4** (**26**), **6** (**27**), **8** (**28**) und **9** Kohlenstoffatomen (**24**) zu einer Steigerung der  $k_{obs}/[I]$ -Werte (Abbildung 2C, D und Abbildung S5). Dagegen zeigte Verbindung **29** mit einem Dodecyl-Substituenten weder im Inhibitionssassay noch in der Massenspektrometrie mit intakten Proteinen Anzeichen für eine Bindung mit ClpP.

Um den vorgeschlagenen Bindungsmodus weiter zu bestätigen, mutierten wir ausgesuchte Reste der mutmaßlichen Bindungstasche und suchten nach Unterschieden im Bindungsverhalten von Inhibitoren (Charakterisierungsdaten zu den getesteten Mutanten sind in Tabelle S3 aufgeführt). Zunächst vergrößerten wir die Proteintasche, um eine Bindung von **29** zu ermöglichen. Sowohl der Austausch von Asn154 im abgeschlossenen Hohlraum mit Alanin als auch eine Substitution von Leu154 durch ein lineares und flexibleres Methionin ermöglichte die Bindung von **29** (Abbildung 2E,F). Umgekehrt konnte die ClpP-Mutante, in der Leu154 durch das raumfüllendere Tyrosin ersetzt wurde, Verbindung **24** nicht binden, wohingegen Verbindung **26** mit einer kürzeren Seitenkette die ClpP-Mutante weiterhin inhibierte (Abbildung 2G). Diese Daten bestätigen die exzellente Korrelation zwischen computerchemischer Vorhersage und experimentellen Ergebnissen.

Gemäß dem vorgeschlagenen Bindungsmodus ragt die R<sup>1</sup>-Seitenkette der β-Lactone in die hydrophobe Tasche und trägt somit maßgeblich zur beobachteten Bindungsaffinität bei. Um darüber hinaus die Relevanz des Substituenten zu bestätigen, synthetisierten wir analoge β-Lactone mit lediglich einem Substituenten an entweder der R<sup>1</sup>- oder der R<sup>2</sup>-Position. In Übereinstimmung mit den Vorhersagen inhibierte das racemische Lacton **30** mit einer Decyl-Gruppe an der R<sup>1</sup>-Position SaClpP, wohingegen keine Inhibition für das racemische Lacton **31** beobachtet werden konnte, das eine Decylgruppe an R<sup>2</sup>-Position trägt (Abbildung 3A). Auch längere Inkubationszeiten bis zu 24 h und höherer Überschuss an



**Abbildung 3.** A–C) Inhibitionsdaten der  $\beta$ -Lactone **30–35** zeigen die Bevorzugung von  $R^1$ -substituierten  $\beta$ -Lactonen mit S-Stereochemie durch SaClpP. D) Synthese der enantiomerenreinen  $\beta$ -Lactone **34** und **35**. a)  $(\text{CH}_2\text{O})_x$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 50%; b)  $\text{LiOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{THF}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 86%; c) HBTU,  $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 9%. E)  $k_{obs}/[I]$ -Werte der zueinander enantiomeren Verbindungen **2** und **13** (Strukturformeln siehe Abbildung 1 E). F) Nichtkovalescentes Docking des S,S-konfigurierten  $\beta$ -Lactons **2** zeigt die Bindung in das aktive Zentrum (rot) mit optimaler Geometrie für den nukleophilen Angriff des Serins (2.7 Å). Die Carbonylgruppe der S-konfigurierten Verbindung **2** (blau) zeigt auf das Oxyanion-Loch, bestehend aus den Amidgruppen von Glu69 und Met99. Die Carbonylgruppe des Enantiomers **13** (grün) weist in die entgegengesetzte Richtung, wodurch vermutlich dessen langsamere Bindung erklärt werden kann (siehe Abbildung 3 E).

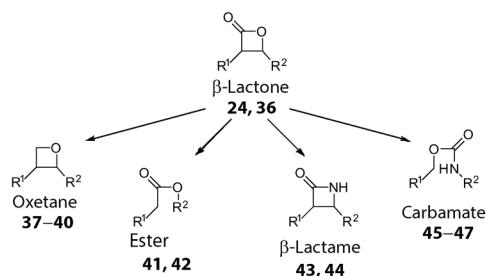
Inhibitor (bis zu 1000-fach) führten zu keiner mit Massenspektrometrie bestimmbarer Bindung von **31** (siehe Abbildung S6 A für weitere Informationen).

Um unsere Ergebnisse auf das Design von Liganden zu übertragen, die die hydrophobe Tasche ausfüllen, führten wir virtuelle Variationen des  $R^1$ -Rests durch, um geeignete Substituenten zu identifizieren. Wir fanden wiederholt, dass aromatische Ringe in der Bindungstasche platziert wurden. Daher synthetisierten wir **32** mit einer Phenylethylgruppe an der  $R^1$ -Position. In Übereinstimmung mit dem Computermodell stellte sich **32** als potenter SaClpP-Inhibitor heraus (Abbildung 3B). Wie erwartet zeigte **33** mit der Phenylethylgruppe an der  $R^2$ -Position keine Hemmung.

Auf der Suche nach der strukturellen Grundlage der beobachteten stereochemischen Präferenz der ClpP-Protease führten wir ein nichtkovalescentes Docking durch, das die Bindungssituationen vor der Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes nachstellte (Abbildung S6B). Alle Verbindungen konnten mit dem Lactonring in räumlicher Nähe zum katalytischen Ser98 gedockt werden. Danach verglichen wir die

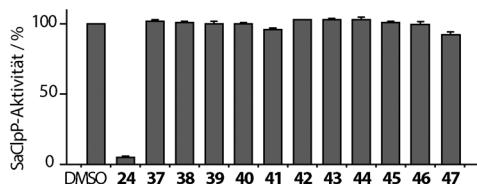
Bindungsmodi von repräsentativen, zueinander enantiomeren  $\beta$ -Lacton-Paaren (Abbildung 3F und Abbildung S7). Uns fiel auf, dass die S,S-Isomere in den meisten Fällen höhere „Scoring“-Werte aufwiesen als die entsprechenden R,R-Isomere (ergänzende Tabelle 2). Darüber hinaus war die Carbonylgruppe der S,S-konfigurierten Lactone in Richtung des Oxyanion-Lochs ausgerichtet, während die Carbonylgruppe der R,R-konfigurierten Lactone in die entgegengesetzte Richtung zeigte, um eine Platzierung des  $R^1$ -Substituenten in der hydrophoben Tasche zu ermöglichen (Abbildung 3F). Diese Ausrichtung führt vermutlich zu einer weniger günstigen Positionierung von R,R-konfigurierten Lactonen für einen nukleophilen Angriff durch Ser98 in Übereinstimmung mit den vorhergesagten Docking-Posen. Die höhere Reaktivität der S,S-Lactone, abgebildet in den ungefähr 25-fach höheren  $k_{obs}/[I]$ -Werten (Abbildung 3E), ist höchstwahrscheinlich eine Konsequenz der günstigeren Stereochemie, um das Oxyanionen-Loch zu adressieren. Um zu untersuchen, ob dies auch für einfachsubstituierte Lactone der Fall ist, synthetisierten wir enantiomerenreine Varianten von **32**

A

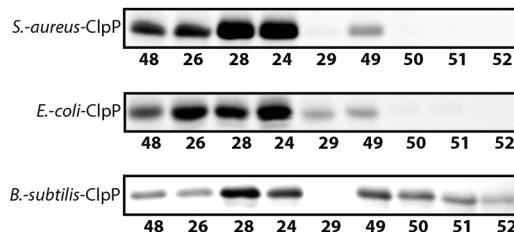


Kern	Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Stereo
β-Lacton	<b>24</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C≡CH	<i>trans</i>
	<b>36</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Ph	<i>trans</i>
Oxetan	<b>37</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Ph	<i>cis</i>
	<b>38</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Ph	<i>trans</i>
	<b>39</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C≡CH	<i>cis</i>
	<b>40</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> C≡CH	<i>trans</i>
Ester	<b>41</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	Me	-
	<b>42</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH <sub>2</sub>	<sup>t</sup> But	-
β-Lactam	<b>43</b>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Ph	-
	<b>44</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Ph	H	-
Carbamat	<b>45</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> C≡CH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH <sub>2</sub>	-
	<b>46</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> C≡CH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	-
	<b>47</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> C≡CH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Ph	-

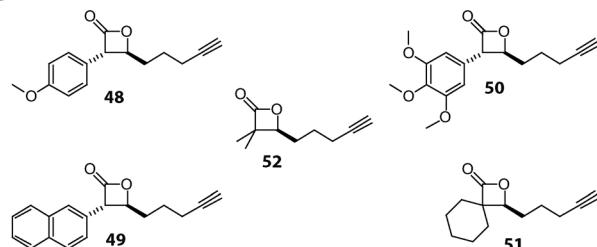
B



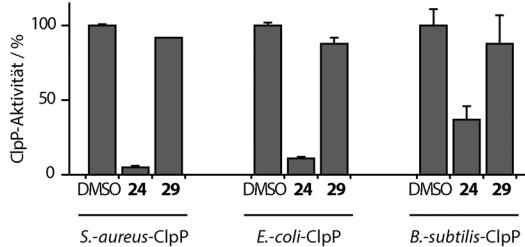
C



D



E



**Abbildung 4.** β-Lactone zeigen als einzige Strukturen Inhibition der SaClpP. A) In dieser Studie untersuchte chemische Gruppen. B) Restaktivität von SaClpP (1 μM) nach Inkubation mit den Verbindungen **37–47** (100 μM) für 15 min bei 32 °C. C) Rekombinante ClpP-Varianten verschiedener Organismen wurden mit den genannten Lactonen (50 μM) für 1 h inkubiert, gefolgt von der Addition eines Rhodaminfarbstoffs über eine Klick-Reaktion. (Siehe Abbildung S4 E für Ladekontrollen.) D) Strukturformeln der Lactone **48–52**. E) Verbindung **24** inhibiert die Peptidaseaktivität von SaClpP, EcClpP und BsClpP, während **29** zu keiner Reduktion der Aktivität führt, was auf strukturell ähnliche Bindetaschen in allen drei Organismen hinweist.

über eine durch ein chirales Auxiliar unterstützte Aldol-Reaktion (Abbildung 3D). Wie durch die Modellierung vorhergesagt, hemmte die *R*-konfigurierte Verbindung **34** ClpP nicht, während die *S*-konfigurierte Verbindung **35** zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition (Abbildung 3C) und einer kovalenten Modifikation der aktiven Zentren in allen 14 Untereinheiten führte. Entsprechend zeigte die enantiomerenreine *S*-konfigurierte Verbindung **35** in allen Fällen eine etwa doppelt so hohe Inhibition wie die racemische Verbindung **32**.

Bis jetzt stellen β-Lactone das einzige nichtpeptidische Inhibitorgerüst dar, das Spezifität für ClpP aufweist. Dies wirft die Frage auf, ob andere chemische Gruppen bei vergleichbarer Inhibitionsstärke verwendet werden können. Daher wendeten wir unser gewonnenes Wissen über die Liganden **24** und **36**, deren Reste in die hydrophobe Tasche binden, an und kombinierten deren Substituenten mit anderen chemischen Gruppen. Wir synthetisierten die Derivate **37–40**, in welchen das elektrophile β-Lacton durch einen nicht reaktiven, geometrisch jedoch eng verwandten Oxetanring

ersetzt wurde (Abbildung 4A,B). Es konnte keine Hemmung der SaClpP durch racemische Gemische sowohl von *trans*- als auch *cis*-konfigurierten Oxetanen bei Konzentrationen bis 1 mM beobachtet werden. Da β-Lactone cyclische Ester sind, synthetisierten wir die nichtcyclischen Ester **41** und **42**, für die jedoch im Peptidase-Assay keine Hemmung nachgewiesen werden konnte. Obwohl in der Literatur Carbamate als starke Inhibitoren von einigen Serin-Hydrolasen beschrieben wurden, konnte auch für die Carbamate **45–47** keine Inhibition gemessen werden. Interessanterweise führte selbst der Austausch des β-Lactons gegen ein β-Lactam, das am nächsten verwandte Strukturanalogen, zu inaktiven Verbindungen (**43** und **44**). Diese Ergebnisse heben die besondere Reaktivität und Geometrie von β-Lactonen für die Mechanismus-basierte Inhibition von ClpP hervor.

Ferner wollten wir in Erfahrung bringen, inwiefern auch andere Mitglieder der ClpP-Proteinfamilie inhibiert werden können. Wir klonierten, exprimierten und reinigten die ClpP-Varianten von *Escherichia coli* (EcClpP) und *Bacillus subtilis* (BsClpP), die 64 % und 79 % Sequenzidentität und 76 % und

85% Sequenzähnlichkeit mit SaClpP aufweisen. Die Bindungstaschen weisen in beiden Enzymen eine ähnliche Geometrie wie SaClpP auf und sind überwiegend hydrophob.<sup>[3b,g]</sup> Bei der Markierung mit einer Reihe von verschiedenartigen  $\beta$ -Lactonen<sup>[2]</sup> (**24–29, 48–52**) erhielten wir ähnliche Muster für die ClpP-Enzyme der drei Organismen (Abbildungen 4C,D), wobei BsClpP auch sterisch anspruchsvollere R<sup>1</sup>-Substituenten erlaubt. Entsprechend führte die Behandlung von EcClpP und BsClpP mit Verbindung **24** zu einer Reduktion der Enzymaktivität im fluorogenen Substratassay, wohingegen die Dodecyl-Verbindung **29** keine Reduktion der Aktivität bewirkte.

Die Existenz der hydrophoben Bindetasche könnte nicht nur Einfluss auf das Design von potennten Inhibitoren und damit antivirulenten Wirkstoffen haben, sondern könnte auch zu unserem Verständnis der natürlichen Substratspezifität von ClpP beitragen.

Eingegangen am 15. Juni 2012,  
veränderte Fassung am 29. Oktober 2012  
Online veröffentlicht am 30. Januar 2013

**Stichwörter:** ClpP · Enzyminhibitoren · Lactone · Molekulares Docking · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

- [1] R. T. Sauer, T. A. Baker, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 587–612.  
[2] a) T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4677–4680; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4600–4603; b) T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14400–14401; c) T. Böttcher, S. A. Sieber, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 663–666.  
[3] a) Y. Katayama-Fujimura, S. Gottesman, M. R. Maurizi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4477–4485; b) J. Wang, J. A. Hartling, J. M. Flanagan, *Cell* **1997**, *91*, 447–456; c) S. A. Joshi, G. L. Hersch, T. A. Baker, R. T. Sauer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 404–411; d) D. Frees, K. Sorensen, H. Ingmer, *Infect Immun.* **2005**, *73*, 8100–8108; e) S. G. Kang, M. N. Dimitrova, J. Ortega, A.

Ginsburg, M. R. Maurizi, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35424–35432; f) M. S. Kimber, A. Y. H. Yu, M. Borg, E. Leung, H. S. Chan, W. A. Houry, *Structure* **2010**, *18*, 798–808; g) B.-G. Lee, E. Y. Park, K.-E. Lee, H. Jeon, K. H. Sung, H. Paulsen, H. Rübsamen-Schaeff, H. Brötz-Oesterhelt, H. K. Song, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 471–478; h) S. R. Geiger, T. Böttcher, S. A. Sieber, P. Cramer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5867–5871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5749–5752.

- [4] M. Gersch, A. List, M. Groll, S. A. Sieber, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9484–9494.  
[5] a) C. Hedberg, F. J. Dekker, M. Rusch, S. Renner, S. Wetzel, N. Vartak, C. Gerding-Reimers, R. S. Bon, P. I. H. Bastiaens, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10006–10011; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9832–9837; b) M. Rusch, T. J. Zimmerman, M. Burger, F. J. Dekker, K. Gormer, G. Triola, A. Brockmeyer, P. Janning, T. Böttcher, S. A. Sieber, I. R. Vetter, C. Hedberg, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10012–10016; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9838–9842.  
[6] a) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301; b) A. W. Puri, M. Bogyo, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 603–616; c) W. P. Heal, E. W. Tate, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 115–135; d) N. Li, H. S. Overkleft, B. I. Florea, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 227–233.  
[7] a) R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, New York, **1984**; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; c) V. V. Rostovtsev, J. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.  
[8] a) P. Y. Yang, K. Liu, M. H. Ngai, M. J. Lear, M. R. Wenk, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 656–666; b) M. Gersch, J. Kreuzer, S. A. Sieber, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 659–682.  
[9] A. Szyk, M. R. Maurizi, *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 165–174.  
[10] R. Franczkiewicz, W. Braun, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 319–326.  
[11] N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521–533.  
[12] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307–317.  
[13] J. Oleksyszyn, J. C. Powers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 143–149.