

Omuralid und Vibrallacton: Unterschiede im Proteasom- β -Lacton- γ -Lactamgerüst verändern die Zielformelpräferenz**

Anja List, Evelyn Zeiler, Nerea Gallastegui, Marion Rusch, Christian Hedberg, Stephan A. Sieber* und Michael Groll*

Abstract: Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Naturstoffe Omuralid und Vibrallacton zeigen sich unerwartete Unterschiede in den Präferenzen ihrer jeweiligen Zielenzyme. Während Omuralid das Chymotrypsin-ähnliche aktive Zentrum des Proteasoms mit $IC_{50} = 47$ nM inhibiert, hat Vibrallacton auch bei Konzentrationen von bis zu 1 mM keinen Effekt auf diese Protease. Aktivitätsbasiertes Protein-Profilierung in HeLa-Zellen identifizierte APT1 und APT2 als zelluläre Angriffsziele von Vibrallacton.

Die Schlüsselkomponente des Ubiquitin-vermittelten, proteolytischen Abbaus ist das 20S-Proteasom (Kernpartikel, KP), welches sowohl die biologische Homöostase als auch viele weitere entscheidende, zelluläre Prozesse über die Degradation intrazellulärer Proteine reguliert.^[1] Das eukaryotische KP ist zylinderförmig und besteht aus vier aufeinander gestapelten ringförmigen Heptameren, die sich entweder nur aus α - oder nur aus β -Untereinheiten zusammensetzen und eine $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie aufweisen.^[2] Die β 1-, β 2- und β 5-Untereinheiten enthalten je ein katalytisch aktives Zentrum mit einem N-terminalen Threoninrest (Thr1). Diese befinden

sich im Inneren der fassähnlichen Struktur des Proteasoms. Die Spaltung der Peptidbindung erfolgt in allen katalytischen Untereinheiten nach demselben Mechanismus,^[3] wobei die Diversität jedes Substratbindekanals die Spezifität bestimmt und die Seitenketten des Liganden (P-Seite) hinsichtlich dessen Aminosäuresequenz selektiv ausgerichtet werden.^[2a]

Dieser hydrolytisch aktive Komplex erregte große öffentliche Aufmerksamkeit durch die FDA-Genehmigung (U.S. Food and Drug Administration) des Dipeptids Velcade (Bortezomib),^[4] ein Boronsäurederivat und „Blockbuster“-Medikament, das zur Inhibition der KP-Aktivität bei der Therapie des Multiplen Myeloms genutzt wird. Die höchst reaktive Boronsäuregruppe führt jedoch nach längerer Behandlung zu Vergiftungserscheinungen und damit zu schwerwiegenden Nebeneffekten.^[5] Daher sind akademische und pharmazeutische Forschungsgruppen weiterhin auf der Suche nach verbesserten Inhibitoren des KP. Als Ergebnis hiervon konnten drei Proteasominhibitoren der zweiten Generation, das Epoxyketon ONX 0914 (PR-957), das β -Lacton- γ -Lactam Marizomib (Salinosporamid A, NPI-0052, **2**; Schema 1a), sowie die Boronsäure Delanzomib (CEP-18770; Abbildung S1)^[6] in klinische Studien eintreten, während das von der FDA zugelassene Epoxyketon Kyprolis (PR-171, Carfilzomib; Abbildung S1) bereits als neues Krebsmedikament auf dem Markt ist.^[7]

[*] Dr. A. List,^[†] Dr. N. Gallastegui, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science Munich
Department Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

Dr. E. Zeiler^[†]
Department of Earth & Planetary Sciences, Harvard University
20 Oxford Street, Cambridge, MA 02138 (USA)

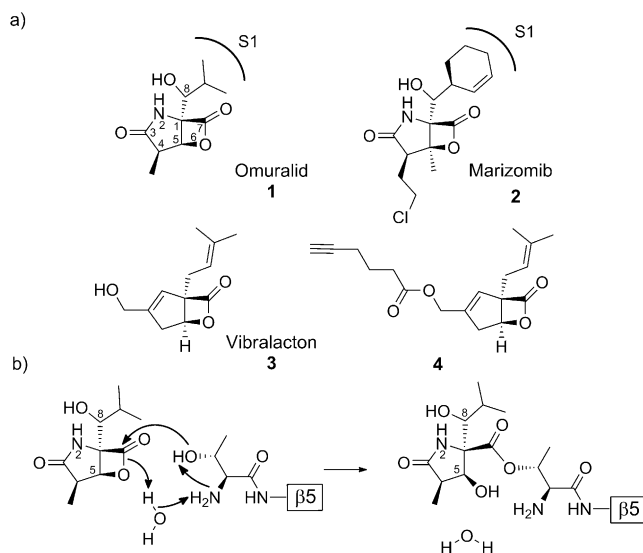
M. Rusch, Dr. C. Hedberg
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

Prof. Dr. S. A. Sieber
Center for Integrated Protein Science Munich
Department Chemie, Lehrstuhl für Organische Chemie II
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, Garching, 85747 (Deutschland)
E-Mail: stephan.sieber@tum.de

[†] A.L. und E.Z. haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken R. Feicht für die Reinigung von Hefe-CP im großen Maßstab und der Belegschaft des PXI am Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source, Villigen (Schweiz), für Hilfe bei der Datensammlung. Wir danken Dr. Ingrid Vetter, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, für APT1 und APT2. M.G. und S.A.S. wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des SFB 1035 unterstützt. S.A.S. bedankt sich bei der DFG (SFB 749, FOR1406) und beim ERC (Starting Grant, Projektnummer 259024).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308567> zu finden.



Schema 1. Strukturen von β -Lactonen und deren proteasomaler Inhibitionsmechanismus. a) Strukturformeln. b) Bindungsmechanismus der β -Lactone an das proteasomale aktive Zentrum.

Bislang wurden zahlreiche Pathogene identifiziert, die ihren Wirt durch selektive und spezifische Inhibition des KP inaktivieren.^[8] Omuralid (Clasto-Lactacystin- β -Lacton, **1**; Schema 1a) war der erste identifizierte Naturstoff der überwiegend an die proteasomale β 5-Untereinheit bindet und die chymotryptische Aktivität (chymotrypsin-like, ChTL)^[9] inhibiert (Schema 1b). Die Verbindung wurde ursprünglich aus *Streptomyces* sp. OM-6519^[10] isoliert, strukturell und funktionell analysiert und als spezifischer Proteasominhibitor klassifiziert.^[11] Nach der Entdeckung von **1**, wurde **2** in dem Meeresbakterium *Salinospora tropica*^[12] identifiziert, welches auch eine hohe Bindungsaffinität zum ChTL-aktiven Zentrum aufweist.^[13] Strukturuntersuchungen von **1** und **2** im Komplex mit dem 20S-Hefeproteasom enthüllten wichtige Einblicke in den Bindungsmechanismus dieser Gruppe von Proteasomliganden.^[2a,13] Beide Moleküle binden kovalent an das Thr1O γ des aktiven Zentrums, wobei ihr β -Lactonring geöffnet wird und eine neue Esterbindung entsteht (Schema 1b).^[2a,13] Durch die Spaltung des β -Lactonrings von **1** und **2** wird die Hydroxygruppe 5-OH gebildet, die das nukleophile Wassermolekül aus dem aktiven Zentrum verdrängt. Der γ -Lactamring von **1** und **2** verhindert die freie Rotation der C-OH-Bindung um die C1/C5-Achse, was letztendlich die Liganden vor sofortiger Hydrolyse und Abspaltung durch Verletzung der Bürgi-Dunitz-Trajektorie schützt.^[14] Omuralid blockiert die Proteasomaktivität langfristig aber reversibel,^[15] was dadurch erklärt werden kann, dass ein Durchbrechen der 5-OH-Barriere energetisch aufwendig ist. Dagegen inhibiert Marizomib das KP irreversibel, weil seine einzigartige 4-Chlorethyl-Seitenkette unter Einbinden des 5-O einen Tetrahydrofuranring bildet (Abbildung S5).^[16] Diese besondere Eigenschaft des Naturstoffes verhindert jede Möglichkeit der β -Lacton-Rückgewinnung, sobald **2** erst an das Proteasom gebunden ist.

Vibralacton (**3**) (Schema 1a) ist ein natürliches Lacton, das von dem Pilz *Boreostereum vibrans*^[17] produziert wird. Obwohl **3** eine ähnliche chemische Struktur wie **1** hat, zeigten In-vitro-Aktivitätstests, die ein fluorogenes Tetrapeptid als Substrat nutzen, dass **3** keines der aktiven Zentren des Proteasoms inhibiert, auch nicht bei Konzentrationen bis zu 1 mM (Abbildung S2). Trotzdem wurden aufgrund der Ähnlichkeit der chemischen Strukturen und des Vorhandenseins des β -Lactonrings in beiden Naturstoffen Kristallisationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden Kristalle des 20S-Hefeproteasoms 72 Stunden mit 50 mM Vibralacton versetzt und anschließend die Struktur des Komplexes mit einer Auflösung von 2.7 Å gelöst ($R_{\text{frei}}=23.1\%$, Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Die $2F_0-F_C$ -Elektronendichte stellt **3** lediglich im ChTL-aktiven Zentrum dar (Abbildung 1a), wo es eine kovalente Bindung mit dem N-terminalen β 5-Thr1 eingeht. Die Struktur des Komplexes KP:**3** zeigt, dass der gesamte Ligandenaufbau genauso wichtig für eine starke Bindungsaffinität zum Enzym ist, wie die reaktive Lactongruppe. Den β -Lactonen fehlt das Peptidrückgrat, weswegen die Stabilisierung der Liganden durch starke Bindungspräferenzen zur S1-Tasche und durch zusätzliche spezifische Wasserstoffbrücken mit dem aktiven Zentrum verstärkt werden muss (Abbildung 1b). Der Vergleich der Kristallkomplexstrukturen von KP:**1**^[2a] (Abbildung S3) und KP:**3**

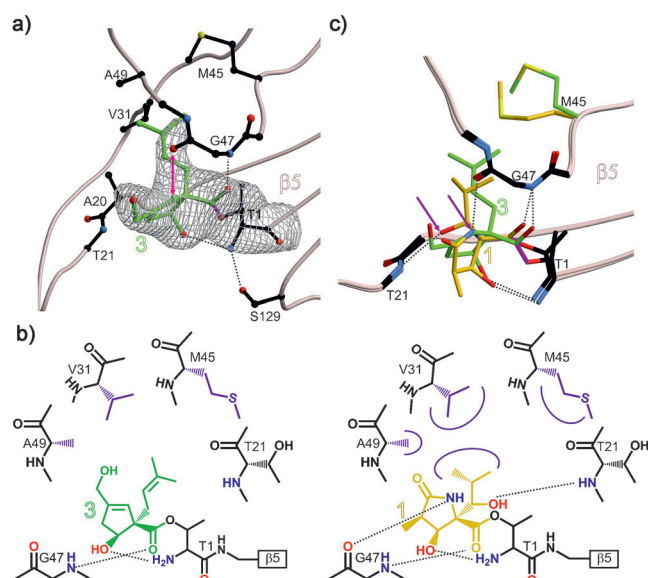


Abbildung 1. Bindungsweise und Wechselwirkungen von Omuralid und Vibralacton am Proteasom. a) Kristallstruktur des proteasomalen ChTL-aktiven Zentrums im Komplex mit **3**. Das Rückgrat der proteasomalen β 5-Untereinheit ist als Bändermodell in Altrosa dargestellt, der Ligand in Grün. Die $2F_0-F_C$ -Elektronendichte (graues Netz) ist mit 1σ konturiert und für die Bindung zwischen dem aktiven Thr1O γ und **3** gezeigt; Thr1 und **3** wurden bei der Phasenberechnung nicht mit einbezogen, um jeglichen Modelleinfluss zu vermeiden. Die Proteinreste, welche die S1-Spezifitätstasche bilden, sind schwarz markiert und nach Löwe et al. nummeriert.^[3] Alle Wasserstoffbrücken zwischen **3** und den Atomen Gly47O, Thr1N und Ser129O der β 5-Hauptkette sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Die Stereodarstellung dieser Abbildung, sowie die $2F_0-F_C$ -„omit“-Dichte von KP:**1**^[2a] befinden sich in Abbildung S3. b) Schematischer Überblick über das Proteasom im Komplex mit **3** (grün, links) und **1** (gelb, rechts). Die S1-Spezifitätstasche des ChTL-Substratbindekanals und die entsprechenden Aminosäuren sind schwarz abgebildet. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und der S1-Spezifitätstasche sind in Lila dargestellt, Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. c) Strukturüberlagerung für die an das Proteasom gebundenen Liganden **1** und **3**. Die sterisch anspruchsvolle P1-Gruppe von **3** vergrößert die Spezifitätstasche, was zur strukturellen Umlagerung von Met45 und somit zur Ligandendestabilisierung führt. Die pinkfarbenen Pfeile weisen auf die Hauptunterschiede in den Strukturen von **1** und **3** hin, die für die unterschiedlichen Inhibitionsprofile der beiden verantwortlich ist. Eine Stereodarstellung befindet sich in Abbildung S4.

zeigt zum ersten Mal, dass auch das γ -Lactamring-System, genauso wie die 8-OH-Gruppe in Omuralid eine wesentliche Rolle für die starke Bindungspräferenz von **1** gegenüber dem KP spielt, da sie in **3** fehlen (Abbildung 1c): a) Das 2-NH von **1** bildet eine starke Wasserstoffbrücke zu Gly47O (3.0 Å), womit das antiparallele β -Faltblatt von Peptid-Ligand-Bindungen nachgeahmt wird (Abbildung S4). Bei **3** ist das γ -Lactam durch ein Cyclopent-2-en ersetzt. Obwohl die Doppelbindung in diesem Fünfringsystem dessen Flexibilität reduziert und zusammen mit der 3-Hydroxymethyl-Gruppe die Amidgruppe in **1** imitiert, nimmt die Stabilität aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrücke von **3** zu Gly47O ab. b) Im Unterschied zu **1** ist bei **3** der P1-Hydroxyisobutyl-Rest durch Prenyl ersetzt. Dies führt zu einer Verschiebung von Met45, welches die S1-Spezifitätstasche dominiert, aus seiner Ori-

nalposition um 2.5 Å in Richtung Ile35 (Abbildung 1c). Während diese strukturelle Umlagerung bereits bei dem Komplex KP:2^[13] beobachtet wurde, konnte dort der Entalpieverlust über mehrere hydrophobe Wechselwirkungen des Cyclohexenylrings mit Resten der S1-Tasche kompensiert werden (Abbildung S4). Dagegen verhindert die geringe Flexibilität der Doppelbindung in der P1-Seite von **3** alle Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der vergrößerten S1-Spezifitätstasche. Außerdem fehlt in **3** das 8-OH, das in **1** und **2** eine Wasserstoffbrücke mit Thr21N (3.0 Å) bildet, sodass der Energieverlust, der durch die strukturelle Umlagerung während der Vibrallacton-Bindung entsteht, nicht kompensiert werden kann (Abbildung 1c). Aus diesen strukturellen Ergebnissen wird gefolgert, dass das elektrophile β -Lacton noch weitere intensive Unterstützung eines genau passenden P1-Ankerrestes benötigt, um die minimalen Anforderungen eines KP-Inhibitors zu erfüllen.

Unser Ziel war es, das zelluläre Zielenzym von **3** durch aktivitätsbasiertes Protein-Profilieren zu identifizieren.^[18] Dafür wurde Vibrallacton mit einem Alkynylrest derivatisiert (**4**; Schema 1a)^[19] und mit HeLa-Zellen eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und das Lysat mit Rhodaminazid behandelt, um eine Klick-Reaktion anwenden zu können. Das Proteom wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und die markierten Proteine durch Fluoreszenz visualisiert. Die Behandlung der markierten Proteine mit Rhodaminbiotinazid, gefolgt von Avidin-Anreicherung, SDS-PAGE-Auftrennung und massenspektrometrischer Analyse der isolierten, fluoreszierenden Gelbanden identifizierte die entsprechenden Zielproteine (siehe die Hintergrundinformationen für Details).^[20] Diese Methode offenbarte vier Zielmoleküle, die kovalent an **4** binden: Carboxypeptidase SCPEP1, ABHD10 (ABhydrolase Domain containing Protein 10) und besonders die Acylprotein-Thioesterasen 1 und 2 (APT1 und APT2; Abbildung 2a, Tabelle S2). Die einstündige Inkubation der Zellen mit **3**, bevor die Sonde **4** hinzugefügt wurde, ergab keine fluoreszierenden Banden, was zeigt, dass der nichtmodifizierte und der modifizierte Naturstoff dieselben Bindungspräferenzen teilen. Interessanterweise ergab das gleiche Kompensationsexperiment, dass **1** auch an SCPEP1 bindet, während der Standard-KP-Inhibitor Epoximicin (**5**)^[21] (Abbildung S1) keine Kreuzreaktion mit **3** zeigt. Diese Ergebnisse bestätigen das einzigartige Inhibitionsprofil und die unterschiedliche Funktionalität der strukturell ähnlichen β -Lactone **1** und **3** gegenüber dem KP. MTT-Assays mit HeLa-Zellen ergaben eine LD₅₀ von 28 μM für **1**,^[22] wohingegen **3** keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen zeigte (Abbildung 2b). Diese Ergebnisse stimmen mit den kinetischen Daten überein, die bei der Inhibition der proteasomalen ChTL-Aktivität eine IC₅₀ von 47 nM für **1** und keine Inhibition für **3** aufwiesen (Abbildung 2c). Zusätzlich erbrachte der Enzymtest mit rekombinantem Acylprotein-Thioesterasen eine hohe Bindungspräferenz von Vibrallacton an APT1 und APT2 (IC₅₀ = 4.3 μM bzw. 1.7 μM). Omuralid hat hingegen keinen Einfluss auf diese Enzyme (Abbildung 2e). Hitzedenaturierungsexperimente verhinderten die Markierung beider APTs und zeigen somit, dass der Naturstoff nur an die nativen Enzyme bindet (Abbildung 2d).

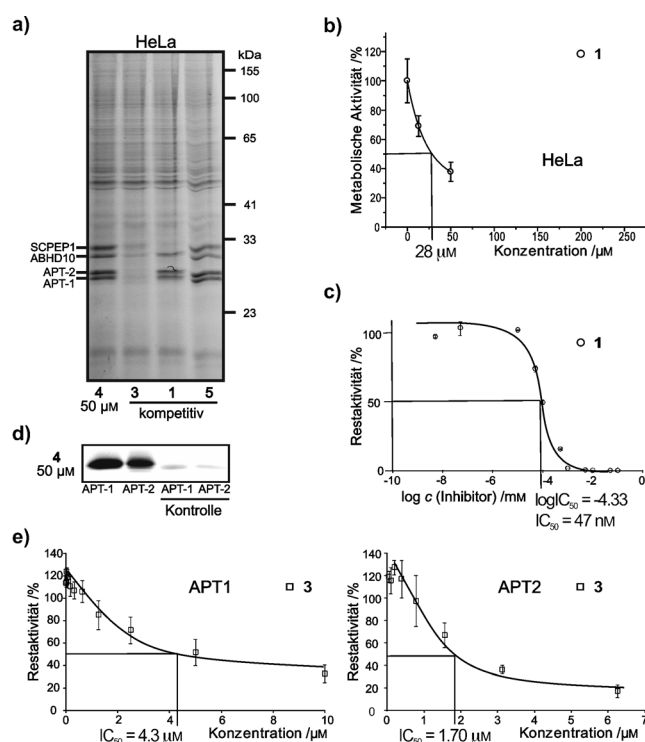


Abbildung 2. In-vivo- und In-vitro-Charakterisierung von Omuralid und Vibrallacton. a) Aktivitätsbasiertes Protein-Profilieren mit **4** (50 μM) in HeLa-Zellen. SCPEP1, ABHD10, APT1 und APT2 wurden über MS-Analyse identifiziert. Die Bestimmung der kompetitiven Zielmoleküle der Naturstoffe erfolgte in HeLa-Zellen durch Inkubation von **3**, **1** und **5** (50 μM) für eine Stunde, bevor **4** (50 μM) zugegeben wurde. (b) Zytotoxische MTT-Assays in HeLa-Zellen mit Omuralid. Vibrallacton hat keinen Einfluss auf diese Zellen (Abbildung S6). c) IC₅₀-Bestimmung von **1** gegen die ChTL-Aktivität des Hefeproteasoms mithilfe des chromogenen Substrats Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. Bei Verwendung von bis zu 1 mM von **3** wird die KP-Aktivität nicht verändert (Abbildung S6). d) Hitzedenaturierung von rekombinantem APT1 und APT2 beweist, dass **3** nur an das native Enzym bindet. e) Inhibitionskurven von Vibrallacton gegen APT1 und APT2. Bei Verwendung von bis zu 500 μM Omuralid wird die APT-Aktivität nicht beeinträchtigt (Abbildung S6). Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt; Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

Bemerkenswert ist, dass **1** lediglich von Bakterien exprimiert wird, wohingegen **3** ein Metabolit von Pilzen ist. Dies kann aufgrund der Überlebensstrategien der Organismen entstanden sein. Streptomyceten besitzen kein Proteasom, währenddessen die KP-Aktivität in allen Eukaryoten lebenswichtig ist. Die Veränderung der β -Lacton- γ -Lactam-Gruppe auf molekularer Ebene war möglicherweise der Anfang für die unterschiedliche Zielmolekülpräferenz jeder dieser Naturstoffe, die dann während der Evolution entsprechend des spezifischen Wirtorganismus perfektioniert wurden.^[23] β -Lacton-Proteasominhibitoren fanden ihren Einsatz zu Beginn ausschließlich als wichtige biochemische Werkzeuge,^[24] heutzutage befinden sie sich bereits in einer Vielzahl von klinischen Studien zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten.^[6a]

Die meisten Naturstoffe, deren Zielmolekül das Proteasom ist, stellen das klassische Prinzip der KP-Bindung infrage.^[25] Daher müssen mehrere Techniken kombiniert werden,

um alle Leitstruktur motive herauszufinden, die für Bindung, Reaktivität und reversible^[2a]/irreversible^[13] KP-Inhibition benötigt werden (Abbildung S5). Dagegen ist Vibrallacton der erste identifizierte Naturstoff, der die APTs inhibiert. Diese Thioesterasen spielen eine bedeutende Rolle in der S-Depalmitoylierung von N- und H-Ras-Proteinen, welche für die Lokalisierung und Signalgebung in Zellen verantwortlich sind.^[26] Es wurde bereits gezeigt, dass das synthetische β -Lacton Palmostatin B die APT1-Thioesterase mit einer IC_{50} von 0.67 μ M inhibiert und den Acylierungszyklus der Depalmitoylierung unterbricht, wobei der epidermale Wachstumsfaktor, der die Ras-Aktivität induziert, beeinflusst wird.^[27] Zusammenfassend weist das β -Lacton-Gerüst in **1** und **3** eine kompakte, funktionalisierte Matrix auf, die vielversprechende Prinzipien und Konzepte für zukünftige, spezifische Zielmoleküle für die Wirkstoffentwicklung beinhaltet. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit haben beide Naturstoffe unterschiedliche biologische Zielmolekülpräferenzen innerhalb der Zelle.

Eingegangen am 1. Oktober 2013

Online veröffentlicht am 28. November 2013

Stichwörter: Klick-Chemie · Naturstoffe · Proteasom · Proteinkristallographie · Wirkstoffentwicklung

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 425–479.
- [2] a) M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463–471; b) M. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, *Structure* **2002**, 10, 609–618; c) E. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, 148, 727–738.
- [3] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, 268, 533–539.
- [4] P. G. Richardson, P. Sonneveld, M. W. Schuster, E. A. Stadtmayer, T. Facon, J. L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J. Blade, M. Boccadoro, J. D. Cavenagh, A. L. Boral, D. L. Esseltine, P. Y. Wen, A. A. Amato, K. C. Anderson, J. S. Miguel, *Br. J. Haematol.* **2009**, 144, 895–903.
- [5] G. Cavaletti, A. J. Jakubowiak, *Leuk. Lymphoma* **2010**, 51, 1178–1187.
- [6] a) E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8838–8850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8708–8720; b) A. Rentsch, D. Landsberg, T. Brodmann, L. Bulow, A. K. Girbig, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5560–5599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5450–5488.
- [7] K. Fostier, A. De Becker, R. Schots, *OncoTargets Ther.* **2012**, 5, 237–244.
- [8] M. L. Stein, P. Beck, M. Kaiser, R. Dudler, C. F. Becker, M. Groll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 18367–18371.
- [9] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, 268, 726–731.
- [10] S. Omura, K. Matsuzaki, T. Fujimoto, K. Kosuge, T. Furuya, S. Fujita, A. Nakagawa, *J. Antibiot.* **1991**, 44, 117–118.
- [11] a) G. Fenteany, R. F. Standaert, G. A. Reichard, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3358–3362; b) E. J. Corey, W. Li, T. Nagamitsu, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1784–1787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1676–1679; c) E. J. Corey, W.-D. Z. Li, T. Nagamitsu, G. Fenteany, *Tetrahedron* **1999**, 55, 3305–3316.
- [12] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 369–371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 355–357.
- [13] M. Groll, R. Huber, B. C. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5136–5141.
- [14] a) M. Groll, B. C. Potts, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 2850–2878; b) T. A. Gulder, B. S. Moore, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 9534–9556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 9346–9367.
- [15] I. M. Shah, K. R. Lees, C. P. Pien, P. J. Elliott, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, 54, 269–276.
- [16] V. R. Macherla, S. S. Mitchell, R. R. Manam, K. A. Reed, T. H. Chao, B. Nicholson, G. Deyanat-Yazdi, B. Mai, P. R. Jensen, W. F. Fenical, S. T. Neuteboom, K. S. Lam, M. A. Palladino, B. C. Potts, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3684–3687.
- [17] D. Z. Liu, F. Wang, T. G. Liao, J. G. Tang, W. Steglich, H. J. Zhu, J. K. Liu, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5749–5752.
- [18] a) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3279–3301; b) M. Fonovic, M. Bogoy, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, 5, 721–730; c) T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2740–2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2680–2698.
- [19] E. Zeiler, N. Braun, T. Böttcher, A. Kastenmüller, S. Weinkauff, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 11193–11197; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11001–11004.
- [20] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064; c) D. S. Johnson, E. Weerapana, B. F. Cravatt, *Future Med. Chem.* **2010**, 2, 949–964.
- [21] K. B. Kim, J. Myung, N. Sin, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3335–3340.
- [22] 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.
- [23] M. A. Gräwert, M. Groll, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1364–1378.
- [24] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 739–758.
- [25] P. Beck, C. Dubiella, M. Groll, *Biol. Chem.* **2012**, 393, 1101–1120.
- [26] M. Rusch, T. J. Zimmermann, 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.
- [27] F. J. Dekker, O. Rocks, N. Vartak, S. Menninger, C. Hedberg, R. Balamurugan, S. Wetzel, S. Renner, M. Gerauer, B. Scholermann, M. Rusch, J. W. Kramer, D. Rauh, G. W. Coates, L. Brunsveld, P. I. Bastiaens, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 449–456.