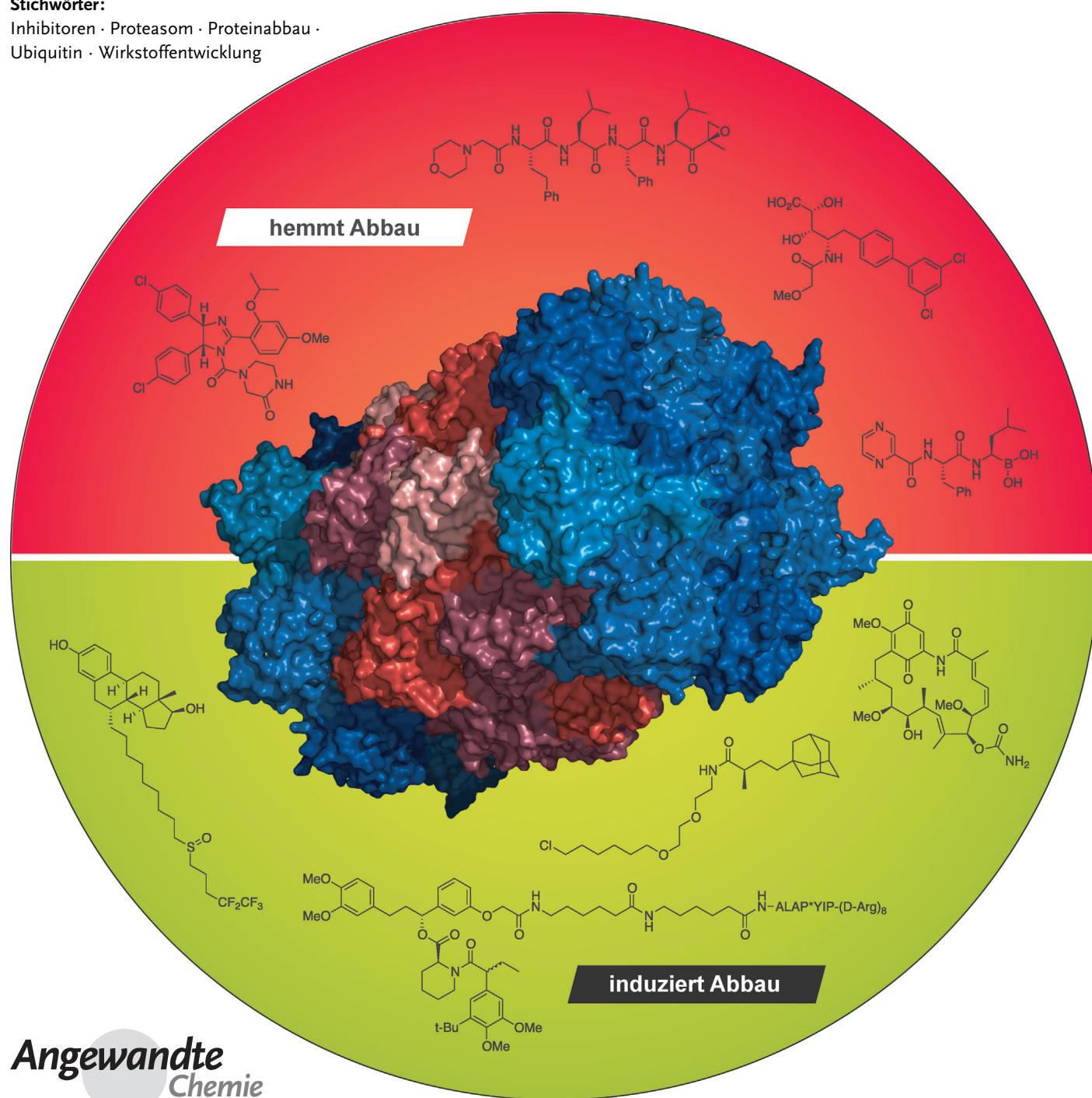


Steuerung der intrazellulären Proteinmenge durch niedermolekulare Modulatoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Dennis L. Buckley und Craig M. Crews*

Stichwörter:

Inhibitoren · Proteasom · Proteinabbau ·
Ubiquitin · Wirkstoffentwicklung



Im Bereich der chemischen Biologie werden biologische Sonden- und Wirkstoffmoleküle klassischerweise genutzt, um die Aktivität von Proteinen (wie Enzymen und Rezeptoren) zu modulieren, die sich verhältnismäßig leicht durch niedermolekulare Verbindungen beeinflussen lassen. Der verbleibende Rest, der die Mehrheit des Proteoms stellt, galt lange Zeit als für Wirkstoffe unzugänglich („undruggable“). Mithilfe niedermolekularer Modulatoren des Ubiquitin-Proteasom-systems (UPS) ist es möglich, statt der Proteinaktivität die Proteinmenge zu modulieren, was die Anzahl der zugänglichen Zielmoleküle erhöht. Während ein Angriff auf das Proteasom selbst zu einer globalen Erhöhung der Proteinmenge führen kann, lässt sich durch das Ansteuern anderer Komponenten des UPS (z. B. der E3-Ubiquitinligasen) in gezielter Weise eine Erhöhung von Proteinmengen erreichen. Als Alternative dazu beginnen sich verschiedene Strategien zur Induktion des Proteinabbaus mittels niedermolekularer „Sonden“ abzuzeichnen. Durch die Fähigkeit, den Abbau bestimmter Proteine zu induzieren und/oder zu inhibieren, besitzen niedermolekulare Modulatoren des UPS das Potenzial, den für Wirkstoffe zugänglichen Anteil des Proteoms über klassische Zielstrukturen wie Enzyme und Rezeptoren hinaus in signifikanter Weise zu erweitern.

1. Einführung

Mit den heute verfügbaren Methoden der Molekularbiologie und Genetik ist es möglich, praktisch jedes beliebige Gen in Zellkulturen oder Versuchstieren auszuschalten oder überzuprimieren. Andererseits würde eine pharmakologische Steuerung von Genen eine zeitliche Kontrolle ermöglichen und wäre reversibel, was für die Entwicklung therapeutischer Substanzen und für biologische Studien wünschenswert wäre.^[1] Ungleicherweise sind die gegenwärtig verfügbaren niedermolekularen Sonden und Wirkstoffe bezüglich ihrer möglichen Zielstrukturen deutlich limitiert im Vergleich zu den aktuellen genetischen Methoden.^[2] Bisher waren pharmakologische Moleküle darauf beschränkt, auf Enzyme und Rezeptoren zu wirken, die wohldefinierte Bindungstaschen besitzen, in die sich kleine Moleküle fest einfügen können. Zahlreiche Proteine, einschließlich solcher, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen als Gerüstbausteine wirken, wurden daher als „unzugänglich“ für Wirkstoffe angesehen.^[3] Schließlich sei erwähnt, dass niedermolekulare Verbindungen mit aktivierender Wirkung auf Proteine zwar bekannt sind (z. B. Rezeptoragonisten), diese aber auf einen noch kleineren Ausschnitt des Proteoms einwirken als Inhibitoren.

Eine Alternative zur Inhibition und Aktivierung von Proteinen durch niedermolekulare Substanzen, die den Effekten molekularbiologischer Techniken näherkommen, wäre die gezielte Beeinflussung der Proteinmenge. Auf der post-translationalen Ebene lässt sich ein solches Vorgehen durch Modulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) realisieren. Eine Steuerung der Proteinmenge durch niedermolekulare Substanzen auf der Ebene der Transkription stellt

Aus dem Inhalt

1. Einführung	2345
2. Stabilisierung von Proteinen durch niedermolekulare Verbindungen: Inhibitoren des Proteinabbaus	2347
3. Induktoren des Proteinabbaus	2352
4. Zusammenfassung und Ausblick	2359

ebenfalls ein aufregendes Forschungsgebiet dar, das aber nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sein soll. Niedermolekulare Inhibitoren der Ubiquitylierungskaskade oder des Proteasoms bieten die Möglichkeit, Proteine, auf die das UPS abzielt, in spezifischer Weise zu stabilisieren. Inhibitoren von Desubiquitininasen und Chaperonen (Faltungshelferproteinen), die Proteine vor dem proteasomalen Abbau bewahren, bieten die Möglichkeit, die Mengen bestimmter Proteine abzusenken. Darüber hinaus befinden sich mehrere Strategien in der Entwicklung, die auf eine „Kaperung“ des UPS abzielen, um den Abbau von Proteinen zu induzieren, die nicht bereits Ziele des UPS sind.

1.1. Übersicht über das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System arbeitet nach einem komplexen, koordinierten Prozess, der die kovalente Anknüpfung des aus 76 Aminosäuren bestehenden Proteins Ubiquitin an abzubauende Zielproteine (Substrate) beinhaltet. Diese Markierung mit Ubiquitin führt anschließend zur „Erkennung“ und zum Abbau durch das 26S-Proteasom.^[4] Der Prozess beginnt mit dem E1-Ubiquitin-Aktivierungs-enzym (UAE oder Uba1), das zunächst (unter ATP-Verbrauch) den C-Terminus des Ubiquitins adenyliert und dabei eine reaktive Thioesterbindung mit einem an der Protein-

[*] Dr. D. L. Buckley, Prof. C. M. Crews

Departments of Chemistry; Molecular, Cellular & Developmental Biology; Pharmacology, Yale University
New Haven, CT 06511 (USA)
E-Mail: craig.crews@yale.edu

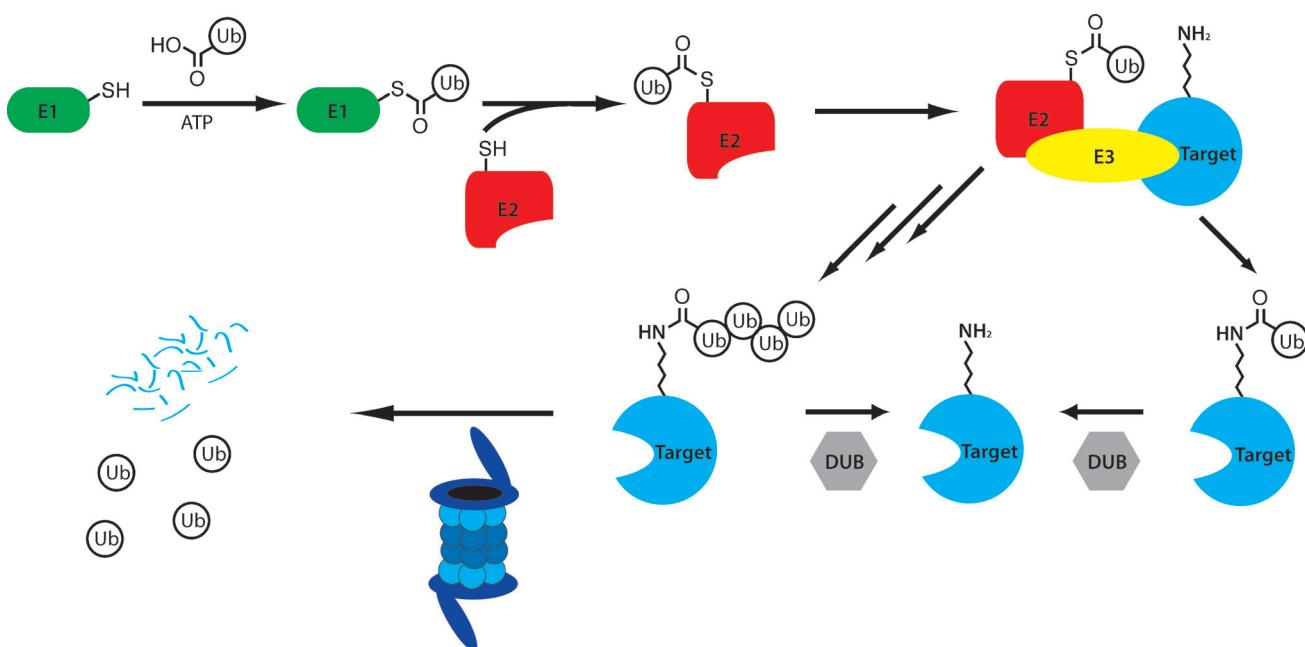


Abbildung 1. Zusammenfassung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Ubiquitin wird durch das Ubiquitinaktivierungsenzym E1 aktiviert und dann auf ein E2-Ubiquitinkonjugationsenzym übertragen. Das E2 überträgt das Ubiquitin auf das Zielprotein, unterstützt durch eine E3-Ubiquitinligase, die das Zielprotein erkennt. Der Vorgang kann sich wiederholen und so zu Polyubiquitinketten führen, die das Regulatorpartikel des 26S-Proteasoms binden. Das Zielprotein wird daraufhin abgebaut, und die Ubiquitinheiten werden wieder freigesetzt.^[4a, 5]

oberfläche befindlichen Cystein bildet. E1 transferiert dann das so aktivierte Ubiquitin auf ein E2-Ubiquitinkonjugationsenzym, wobei sich ein neuer Thioester bildet. Eine von über 600 bekannten E3-Ligasen fungiert dann als Adapter (eine Ausnahme stellt die HECT-Familie von E3-Ligasen dar, bei denen intermedial noch ein dritter Thioester gebildet wird), der den E2-Ubiquitinkomplex in die Nähe des zum Abbau bestimmten Zielproteins bringt und dadurch die Übertragung des Ubiquitins auf ein an der Oberfläche gelegenes Lysin unter Bildung einer Isopeptidbindung erleichtert (Abbildung 1). Die Anlagerung des Ubiquitins ist durch die Wirkung verschiedener Desubiquitylierungsenzyme (DUBs) reversibel.^[4a, 6]

Der Vorgang kann sich wiederholen, indem zusätzliche Einheiten Ubiquitin an den N-Terminus oder einen der sieben Lysinreste des Ubiquitins geknüpft werden. Die Bildung einer Kette aus wenigstens vier Ubiquitinheiten, die über Lys⁴⁸ verbunden sind, wird aus hinreichend erachtet, um das abzubauende Zielprotein dem proteolytischen Abbau

durch das 26S-Proteasoms zuzuführen.^[5] Der proteolytische Abbau umfasst die Entfernung der Ubiquitinheiten (die wiederverwertet werden) und die Zerlegung des Zielproteins in kurze Fragmentpeptide (Abbildung 1).^[4a] Allerdings sind auch andere Verknüpfungsarten der Ubiquitinketten möglich, die verschiedene biologische Auswirkungen jenseits des proteasomvermittelten Proteinabbaus haben können. Dazu gehört die Bildung von Lys⁶³-Ketten, die, wie gezeigt werden konnte, an der Regulation von Endozytosevorgängen beteiligt sind. Die Monoubiquitylierung von Proteinen kann zu diversen biologischen Effekten führen, z. B. einer induzierten Konformationsänderung im Zielprotein. Ferner wurden zahlreiche ubiquitinähnliche Proteine (UBLs, ubiquitin-like proteins) wie SUMO und NEDD8 identifiziert, die mittels eines analogen Systems, das sich jedoch eigener, abweichender Enzyme bedient, mit anderen Proteinen ligieren können. Diese UBLs können ebenfalls eine Vielzahl von Wirkungen haben, die oftmals auf einer induzierten Konformationsänderung der Zielproteine beruhen.^[6]



Dennis Buckley studierte an der State University of New York in Geneseo (Abschluss 2008) und promovierte bei Craig Crews an der Yale University im Fach Chemie. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Liganden für die E3-Ligase VHL sowie deren Einsatz als biochemische Sonden.



Craig Crews studierte Chemie an der University of Virginia und promovierte in Harvard bei R. L. Erikson. Nach einem Postdoktorat bei S. L. Schreiber erhielt er 1995 einen Ruf nach Yale. Seine Forschungen gelten der Kontrolle intrazellulärer Proteinmengen durch niedermolekulare Substanzen und führten unter anderem zu dem Proteasom-inhibitor Carfilzomib/Kyprolis basierend auf der Leitverbindung YU101.

2. Stabilisierung von Proteinen durch niedermolekulare Verbindungen: Inhibitoren des Proteinabbaus

Infolge der vielfältigen Wirkungen der Ubiquitynlierung auf diverse biologische Prozesse (einschließlich Zellzyklus, Apoptose, Onkogenese, Qualitätskontrolle von Proteine und Angiogenese),^[7] bietet der proteasomabhlängige Abbau zahlreiche attraktive Angriffspunkte für die Entwicklung therapeutischer Eingriffe bei zahlreichen Krankheitsbildern. Jede Enzymklasse, von E1 über die ungefähr 40 E2-Enzyme bis hin zu den über 600 E3-Ligasen und den verschiedenen Untereinheiten des konstitutiven wie des immunologischen Proteasoms, hat als Angriffspunkt von Wirkstoffen nach Maßgabe ihrer biologischen Funktion, ihrer Spezifität und ihrer pharmakologischen Zugänglichkeit sowohl Vor- wie Nachteile.^[6] Andere zelluläre Prozesse, z. B. die Autophagie, haben ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf den Proteinabbau, diese sollen jedoch nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sein und wurden an anderer Stelle zusammengefasst und diskutiert.^[8]

2.1. Proteasom-Inhibitoren

Gegenwärtig gibt es nur zwei FDA-zugelassene Wirkstoffe, die auf das UPS einwirken: Bortezomib/Velcade und Carfilzomib/Kyprolis, die beide das Proteasom direkt hemmen.^[6b,9] Zahlreiche Klassen von Proteasominhibitoren sind beschrieben worden,^[7,9,10] darunter finden sich Peptidaldehyde, Peptidylboronate, Epoxyketone, Vinylsulfone,^[11] β -Lactone,^[12] Hydroxyharnstoffe,^[13] α -Ketoaldehyde^[14] und andere mehr. Viele enthalten ein Elektrophil, das den entscheidenden nukleophilen Rest Thr^1 der katalytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 5$ des Proteasoms angreift.^[15] Oft sind diese Elektrophile an eine lineare oder zyklische Peptidkette, die ein Substratmolekül imitiert, angefügt. Auch nichtkovalente Inhibitoren wie TMC-95A^[16] und die nicht-kompetitive Imidazolinklasse wurden vorgestellt.^[17]

Die erste Klasse von Proteasominhibitoren, die identifiziert werden konnte, waren Peptidaldehyde,^[18] unter denen MG132 (oder Z-LLL; von der Firma Myogenics entwickelt) das bestuntersuchte ist (Abbildung 2).^[19] Diese Verbindungen sind potente ($K_i = 4 \text{ nm}$)^[19] kovalente Inhibitoren der chymotrypsinartigen Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit. Probleme wie der Mangel an Selektivität gegenüber anderen Proteasen (wie Calpainen und Cathepsinen), eine rasche Oxidation und das hohe Maß an Reversibilität des mit dem Thr¹ gebildeten Halbketals verhinderten allerdings den therapeutischen Einsatz dieser Verbindungen. Dennoch hat die Kombination aus Wirkstärke und leichter Verfügbarkeit (bei vergleichsweise geringen Kosten) dazu geführt, dass MG132 zu einem der meistverwendeten Proteasominhibitoren für biologische Studien geworden ist.^[7] Neben synthetischen Peptidaldehyden haben sich auch Naturstoffe wie das Fellutamid B als Hemmstoffe des Proteasoms erwiesen.^[20]

Die Arbeiten über Peptidaldehyde haben unmittelbar zur Entdeckung der Peptidylboronate geführt; man fand, dass die Umwandlung der Aldehydfunktion von MG132 in ein Bor-

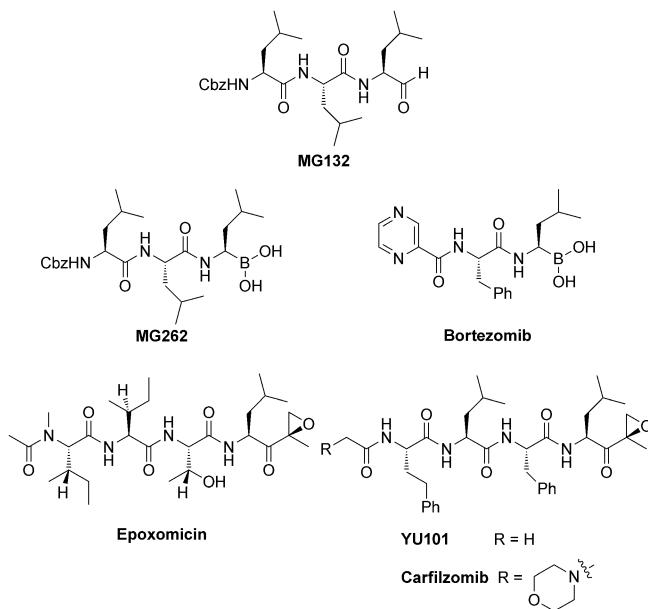
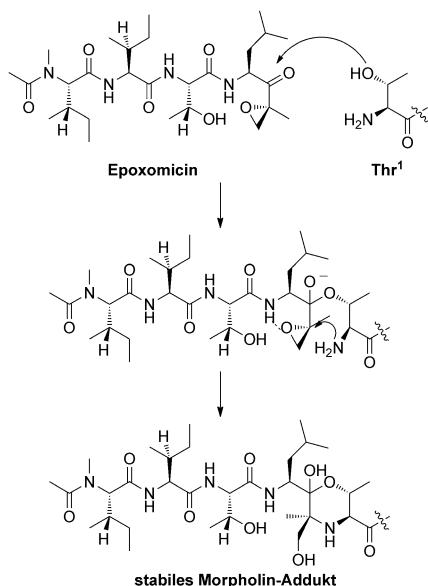


Abbildung 2. Eine Zusammenstellung von Proteasominhibitoren, einschließlich des verbreitet eingesetzten MG132 sowie Bortezomib/Velcade und Carfilzomib/Kyprolis, zwei von der US-amerikanischen FDA für die Behandlung des multiplen Myeloms zugelassenen Wirkstoffen.

säurederivat (MG262 oder Z-LLL-Boronat) die Wirkstärke massiv ansteigen ließ ($K_i = 18 \text{ pm}$).^[7] Diese verbesserte Wirkung ermöglichte die Entwicklung kleinerer Dipeptidylborosäuren wie dem Bortezomib der Firmen Myogenics/Pro-Script. Diese Wirkstoffklasse hatte den zusätzlichen Nutzeffekt einer im Vergleich zu den Peptidaldehyden erhöhten Spezifität, da der Borsäureanteil eine weitaus geringere Reaktivität gegenüber Cysteinproteasen wie den Cathepsinen und den Calpainen aufweist.^[21] Bortezomib bildet mit Thr¹ reversibel ein tetraedrisches Borat, wie röntgenkristallographisch gezeigt werden konnte.^[22] Nachdem die Firma Millennium Pharmaceuticals (heute im Besitz von Takeda) die Rechte erworben hatte, wurde 1997 die klinische Erprobung von Bortezomib begonnen. 2003 erteilte die FDA eine Zulassung für die Behandlung des multiplen Myeloms. Unter dem Handelsnamen Velcade wird es intravenös oder subkutan verabreicht und befindet sich gegenwärtig in der Erprobung zur Behandlung anderer Krebsformen wie dem Non-Hodgkin-Lymphom.^[6b, 21, 23]

Eine weitere Klasse von Proteasominhibitoren sind die Epoxyketone. Die ersten beschriebenen Epoxyketone waren die Naturstoffe Eponemycin^[24] und Epoxomicin (Abbildung 2),^[25] die in Anbetracht ihrer Aktivität gegen Melanomzelllinien in den frühen 90er Jahren bei Bristol-Myers Squibb isoliert wurden. Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen blieb lange ungeklärt, bis unserer Arbeitsgruppe die Totalsynthese von Eponemycin^[26] und Epoxomicin^[27] sowie ihrer biotinylierten Affinitätsreagentien gelang, mit denen gezeigt wurde, dass beide Verbindungen potente Inhibitoren des Proteasoms sind.^[28] Wir wiesen außerdem nach, dass die Epoxyketone mit dem Thr¹ des Proteasoms reagieren und zunächst ein Halbketal bilden, gefolgt von einem Angriff der terminalen Aminofunktion des Epoxids.

unter Bildung eines stabilen Morpholinrings.^[29] Dieser zweistufige nukleophile Angriff auf das Epoxyketon führt nicht nur zu einer irreversiblen (im Gegensatz zu den langsam reversiblen Peptidylboronaten wie Bortezomib) Hemmung des Proteasoms, sondern bewirkt auch eine hohe Spezifität aufgrund des unter Proteasen einmaligen katalytisch aktiven N-terminalen Threonylrestes (Schema 1).



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus der Inaktivierung des Proteasoms durch Epoxomicin. Auf die anfängliche Halbketalbildung folgt eine Exoxidöffnung durch die terminale Aminofunktion unter Bildung eines stabilen Morpholinaddukts, das mittels Röntgenkristallographie nachgewiesen werden konnte.^[29]

Nachdem das Proteasom als Angriffsziel für das Epoxomicin identifiziert werden konnte, versuchten wir als nächstes, die Selektivität der Epoxyketone für die chymotrypsinartige Aktivität des Proteasoms zu optimieren (gegenüber der beiden anderen primären Wirkungen, der trypsinartigen und der caspaseartigen Aktivität). Ein verbesserter selektiver Inhibitor war wünschenswert, um die inhibitorischen Effekte der einzelnen katalytischen Untereinheiten spezifischer zu ermitteln. Darüber hinaus besaßen die meisten Proteasominhibitoren (darunter auch Bortezomib und Epoxomicin) bereits eine signifikante Selektivität für die chymotrypsinartige Aktivität der β 5-Untereinheit, was darauf hindeutete, dass die therapeutischen Effekte dieser Hemmstoffe primär auf die Inhibition dieser Aktivität zurückzuführen sind. Das Ergebnis dieser Optimierungen war die Verbindung YU101,^[30] die eine verbesserte Selektivität für die chymotrypsinartige gegenüber der trypsinartigen Aktivität sowie eine fast 8000fach höhere Selektivität gegenüber der caspaseartigen Aktivität aufwies (Abbildung 2). Wir waren dann in der Lage, den Quotienten $K_{obs}/[I]$ für die chymotrypsinartige Aktivität mit der Hemmung der Zellvermehrung zu korrelieren.^[31]

Eine Lizenz zur Verwertung dieser Resultate ging an die Firma Proteolix Inc., die die Verbindung durch Anfügung

eines Morpholinrestes modifizierte, um die Löslichkeit zu verbessern. Die daraus resultierende Verbindung, das Carfilzomib,^[32] wurde dann an Patienten mit multiplen Myelom, die resistent gegen Bortezomib sowie gegen Thalidomid oder Lenalidomid waren, klinisch erprobt. Bei Patienten mit rektärem multiplen Myelom hatte (intravenös verabreichtes) Carfilzomib eine Gesamtwirkungsrate von 23.7% bei einer mittleren Dauer der Wirkung von 7.8 Monaten.^[33] Auf der Grundlage dieser Phase-II-Studie sowie anderer Daten, die ein allgemein vergleichbares Sicherheitsprofil (wie Bortezomib) und signifikant verbesserte Werte für periphere Neuropathien als Nebenwirkung nachwiesen, wurde Carfilzomib 2012 von der FDA zugelassen. Die Substanz wird gegenwärtig von der Firma Onyx Pharmaceuticals (die 2009 Proteolix übernommen hat) unter dem Namen Kyprolis vertrieben.^[34]

Über die beiden von der FDA zugelassenen Wirkstoffe hinaus gibt es ein starkes Interesse an der Entwicklung verbesserter Proteasominhibitoren für den klinischen Einsatz. Ein Wege, den die aktuelle Forschung beschreitet, zielt auf die Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Proteasominhibitoren. Aktuell befinden sich mehrere oral verabreichbare Proteasominhibitoren in der klinischen Erprobung, darunter Ixazomibcitrat (MLN9708) von der Firma Millennium sowie Oprozomib (ONX 912) von der Firma Onyx.^[35] Ein weiteres aktives Forschungsgebiet ist die Entwicklung von Inhibitoren, die selektiv für das Immunoproteasom sind, das in Lymphozyten exprimiert wird. Von der Inhibierung des Immunoproteasoms erhofft man sich Behandlungsansätze für Autoimmun- und neurodegenerative Erkrankungen. Inhibitoren wie ONX 914 besitzen eine Selektivität für das Immunoproteasom gegenüber dem konstitutiven Proteasom. Kristallographische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die gewünschte Selektivität auf eine größere P1-Bindungstasche des Immunoproteasoms zurückzuführen sein könnte.^[36]

Ein möglicher Nachteil bei der Verwendung von Proteasominhibitoren ist, dass es durch die Hemmung des Proteinabbaus zur Bildung und zum Anstau von Proteinaggregaten in den Zellen kommen könnte. Eine Aggregation und Ablagerung von Proteinen wird ursächlich mit neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Allerdings überwinden Bortezomib und Carfilzomib nicht ohne weiteres die Blut-Hirn-Schranke, daher sollte ihre Wirkung auf das zentrale Nervensystem begrenzt sein,^[32b,37] obwohl periphere Neuropathie, wie bereits oben dargelegt wurde, eine ernste Nebenwirkung einer Behandlung mit Bortezomib ist.

2.2. Inhibitoren des E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzyms und verwandter E1-Proteine

Das E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzym (UAE) vollführt seine Aufgabe in zwei separaten Schritten. Zuerst adenyliert es den C-Terminus des Ubiquitins, danach bildet es eine kovalente Thioesterbindung mit dem Cysteinylrest des aktiven Zentrums. Eine Inhibition auf der Ebene des E1 würde die Ubiquitylierung verhindern und so zu einer globalen Störung des UPS führen, was wohl ähnliche Effekte wie die Inhibition des Proteasoms hätte (im Gegensatz zur Inhibition

von E2, E3 oder der DUB-Enzyme, die spezifischere Auswirkungen haben können). Es bestand ein erhebliches Interesse an der Entwicklung von E1-Inhibitoren; das Thema wurde in jüngerer Zeit zusammenfassend behandelt.^[38]

Der erste zellgängige Inhibitor war das Pyrazon PYR41 (Abbildung 3), der in der Zelle das UAE durch kovalente Bindung hemmt. Dies verhindert die Ubiquitylierung und

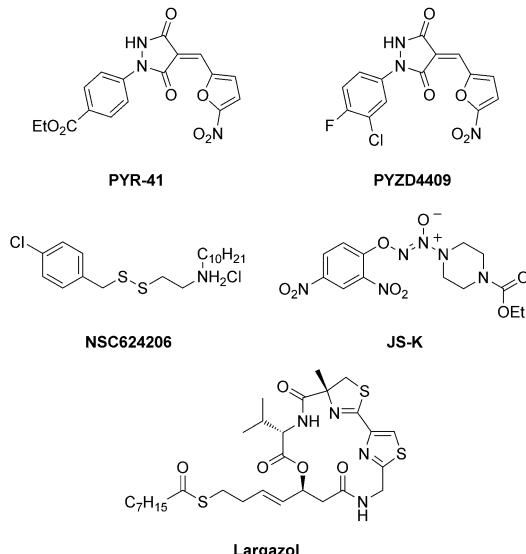
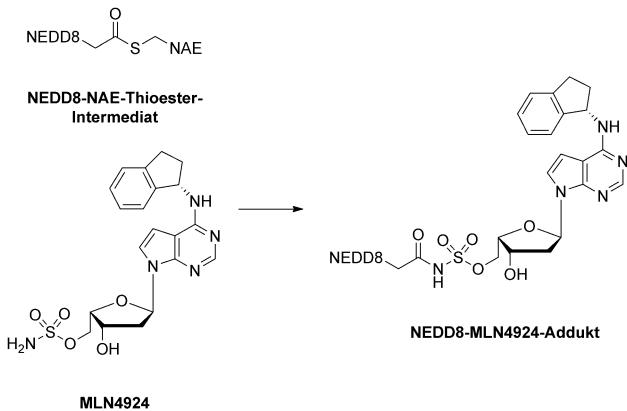


Abbildung 3. Niedermolekulare Inhibitoren des E1-Ubiquitin-Aktivierungsenzyms.

den proteasomalen Abbau von Proteinen wie p53.^[39] Ein ähnlicher Inhibitor, das PYZD4409, bewirkt ebenfalls den Tod maligner Zelle und hatte bei leukämischen Mäusen Aktivität.^[40] Neben diesen Pyrazon-UAE-Inhibitoren wurden noch andere Hemmstoffe vorgestellt: der Stickstoffmonoxid-Prowirkstoff JS-K^[41] und das Disulfid NSC624206,^[42] die beide durch Modifizierung des katalytischen Cysteins wirken. Der Naturstoff Largazol, der wegen seiner Wirkung auf Histondesacetylasen bekannt ist, hemmt auch das UAE, indem er die Adenylierung des Ubiquitins (nicht jedoch die Thioesterbildung) inhibiert.^[43] Obwohl bereits zahlreiche UAE-Inhibitoren entwickelt worden sind, müssen wahrscheinlich neue Inhibitorklassen mit verbesserter Spezifität und wirkstoffartigen Eigenschaften gefunden und entwickelt werden, bevor ein therapeutischer Einsatz denkbar ist.^[38]

Neben dem Ubiquitin-Aktivierungsenzym (UAE) gibt es noch sieben weitere E1-Proteine, die ubiquitinähnliche Proteine (UBLs) aktivieren. Die Firma Millennium Pharmaceuticals hat einen niedermolekularen Inhibitor für das NEDD8-Aktivierungsenzym (NAE) namens MLN4924 entwickelt, der seine Wirkung über einen interessanten Mechanismus entfaltet, der als „substratunterstützte Inhibition“ bezeichnet wird. MLN4924 ist ein Adenin-Mimetikum, das in Gegenwart des NAE mit dem NEDD8 durch nucleophilen Angriff der Sulfamatgruppe des intermediären Thioesters eine kovalente Bindung bildet (Schema 2). Das Addukt NEDD8-MLN4924 ist dann in der Lage, in Form eines nichthydrolysierbaren



Schema 2. MLN4924 kann mit dem aktivierten Intermediat NEDD8-NAE reagieren, wobei eine nichthydrolysierbare kovalente Bindung mit NEDD8 gebildet wird. Das MLN4924-NEDD8-Addukt wirkt dann als Mimetikum des adenylierten NEDD8-Substrats, das NAE kompetitiv inhibiert.^[44]

Mimetikums des adenylierten NEDD8-Intermediats als potenter Inhibitor des NAE aufzutreten.^[44] Da die NEDD8-Liegeung wichtig für die Aktivität der Cullin-RING-Ligasen (CRLs), einer Familie von E3-Ligasen, ist, hat die Inhibition des NAE therapeutisches Potential.^[6a,44b] Vor diesem Hintergrund ist MLN4924 als mögliches Medikament für die Behandlung hämatologischer wie nichthämatologischer Malignien in Phase-I- und Phase-I/II-Erprobungen gegangen.^[45]

2.3. Inhibitoren des E2-Ubiquitin-Konjugationsenzyms

Die etwa 40 E2-Proteine sind dafür zuständig, Ubiquitin oder ein UBL-Protein vom E1 zu übernehmen und es in Verbindung mit der zuständigen E3-Ligase auf das Zielprotein zu übertragen. Ungeachtet der Existenz eines katalytisch wirksamen Cysteinrestes liegt die Entwicklung von E2-Inhibitoren hinter den E1-Inhibitoren zurück, sodass bislang von nur zwei E2-Inhibitoren berichtet wurde. Ceccarelli et al. haben den ersten Inhibitor für ein E2-Enzym beschrieben. Dieser wurde im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings auf Inhibitoren der Ubiquitylierung von p27^{Kip1} gefunden. p27^{Kip1} ist von Bedeutung für das Fortschreiten des Zellzyklus und stellt ein mögliches Angriffsziel bei der Krebsbekämpfung dar. In einem zellfreien System wurde mit sämtlichen Komponenten die Ubiquitylierungsmaschinerie der Zelle rekonstituiert: biotinyliertes Ubiquitin, das E1-Enzym Uba1, das E2-Protein hCdc34, der E3-Komplex SCF^{Skp2} (sowie Cks1) und schließlich das phosphorylierte Substrat p27^{Kip1}. CC0651 (Abbildung 4) erwies sich als Inhibitor der p27^{Kip1}-Ubiquitylierung. Es wurde gefunden, dass die Aktivität von CC0651 auf eine allosterische Hemmung von hCdc34 zurückzuführen ist, was durch Röntgenkristallographie bestätigt wurde. CC0651 hemmt die Zellproliferation und führt zur Akkumulation von p27^{Kip1}.^[46]

Jüngst wurde über die Inhibition eines bestimmten E2-Proteins namens Rad6 (das essentiell für die postreplikative DNA-Reparatur ist) berichtet. Die Verbindung TZ9 wurde

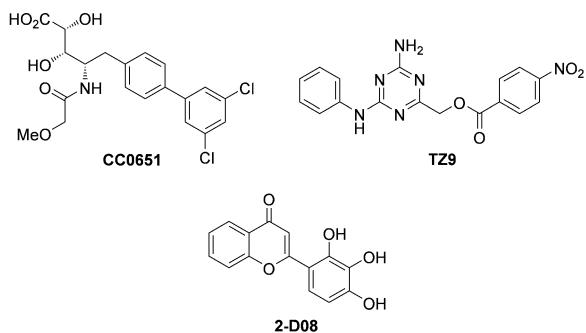


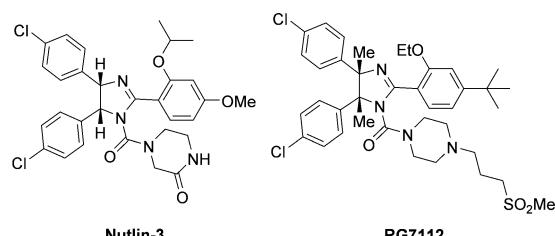
Abbildung 4. Niedermolekulare E2-Ligase-Inhibitoren. CC0651 inhibiert hCdc34,^[46a] TZ9 inhibiert Rad6,^[47] 2-D08 inhibiert das SUMO-E2 Ubc-9.^[48]

mithilfe von virtuellem Screening entwickelt und so entworfen, dass sie an das katalytische Zentrum von Rad6 binden soll. TZ9 vermochte in vitro die Ubiquitylierung von Histonen zu verhindern und inhibierte die Zellproliferation. Im Unterschied zu CC0651, das als allosterischer Effektor wirkt, wird für TZ9 vorausgesagt, dass es die Thioesterbildung blockiert, was es zum ersten kompetitiven E2-Ligase-Inhibitor machen würde.^[47] Das SUMO-E2 Ubc-9 war ebenfalls Gegenstand von Inhibitionsstudien. Schneekloth und Mitarbeiter haben jüngst das Flavonoid 2-D08 identifiziert, das die Übertragung von SUMO von einem Modellsubstrat auf Ubc-9 sowie die SUMOylierung der Topoisomerase-1 in einem Zelltestsystem inhibiert.^[48]

2.4. Niedermolekulare Inhibitoren der E3-Ligasen

E3-Ligasen katalysieren die Addition von Ubiquitin oder eines UBL-Proteins an Zielproteine. Man kennt über 600 E3-Ligasen,^[6b] die in vier Familien unterteilt werden: E3 mit HECT-Domänen, U-box-E3, monomere RING-E3 und multimere RING-E3).^[6a] Der überwiegende Anteil der Substratspezifität des UPS entstammt der Selektivität der E3-Ligasen, was sie zu attraktiven Zielen für die Entwicklung von Therapeutika macht. Unglücklicherweise fehlt den meisten E3-Proteinen jedwede enzymatische Aktivität. Sie entfalten ihre Wirkung vielmehr, indem sie die mit Ubiquitin beladenen E2-Proteine in räumliche Nähe der Zielproteine bringen (eine Ausnahme sind die HECT-E3-Proteine, die mit dem Ubiquitin vor der Übertragung auf das Substrat eine Thioesterbindung bilden). Die Hemmung von E3-Ligasen zielt daher im Allgemeinen auf Protein-Protein-Wechselwirkungen, deren Modulation durch niedermolekulare Verbindungen als schwierig gilt.^[3]

Die erste E3-Ligase, die erfolgreich inhibiert werden konnte, war MDM2, die das Tumorsuppressorprotein p53 ubiquityliert. Die Firma Roche gab die Entdeckung der Nutline bekannt, einer Gruppe von *cis*-Imidazolin-Inhibitoren, die die Interaktion von MDM2 mit p53 stören und so das p53 in den Zellen stabilisieren. Tumorentransplantate auf Nacktmäuse wurden dadurch in ihrem Wachstum gehemmt.^[49] Inzwischen befindet sich ein oral verabreichtbares Nutlin-Derivat namens RG7112 (Abbildung 5)^[50] in der



Nutlin-3 RG7112

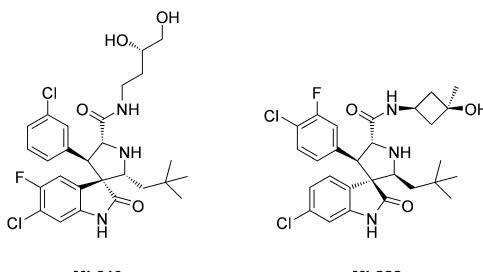
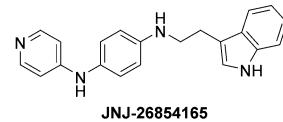


Abbildung 5. Nutlin, der erste MDM2-Inhibitor, sowie weitere ausgewählte MDM2-Inhibitoren.

Phase I der klinischen Erprobung zur Behandlung solider wie hämatologischer Tumoren.^[51] Ein weiterer MDM2-Inhibitor, das Tryptamin JNJ-26854165, das ebenfalls peroral appliziert wird, befindet sich gleichfalls in Phase I der klinischen Erprobung, scheint seine Wirkung aber durch eine Blockade der Wechselwirkung des p53-MDM2-Komplexes mit dem Proteasom zu entfalten.^[51,52] Eine ganze Anzahl weiterer Klassen von MDM2-Inhibitoren wurde entwickelt,^[53] darunter die Spiro-Oxindole, die sich im Rahmen eines strukturgestützten Wirkstoffdesigns anboten. Zu dieser Gruppe gehören MI-219^[55] und MI-888.^[56] Obwohl p53 ein bedeutender Tumorsuppressor ist, werden Ansätze zur Stabilisierung des Proteins in der Zelle aufgrund des großen Prozentsatzes von Krebsfällen mit mutiertem p53 wenig Wirkung haben.^[57]

Der Inhibitor der IAP-Familie von E3-Ligasen (IAP: inhibitor of apoptosis protein) wurde ebenfalls ausführlich untersucht, üblicherweise mit weitgehend peptidischen oder peptidomimetischen Inhibitoren nach dem Vorbild des natürlichen inhibitorischen Proteins der IAPs, SMAC/DIABLO. Die IAPs regulieren die Apoptose (den induzierten Zelltod) auf verschiedenen Wegen, zu denen die Regulation der Caspase 3, 7 und 9 gehören. Eine umfangreiche Übersicht über IAP-Inhibitoren wurde kürzlich veröffentlicht.^[58] Zahlreiche solche Verbindungen befinden sich in der klinischen Erprobung (Abbildung 6).^[6b] SMAC-Mimetika binden die BIR3-Domänen von IAPs, die sich von der RING-Domäne deutlich unterscheiden. Die bahnbrechenden Arbeiten von Abbott führten zu dem optimierten Peptidligan den Substanz 11 (Abbildung 6).^[59] Die Gruppe um Shaomeng Wang an der University of Michigan optimierte diesen Strukturkern durch Ersatz des Cyclohexylglycin-Prolin-

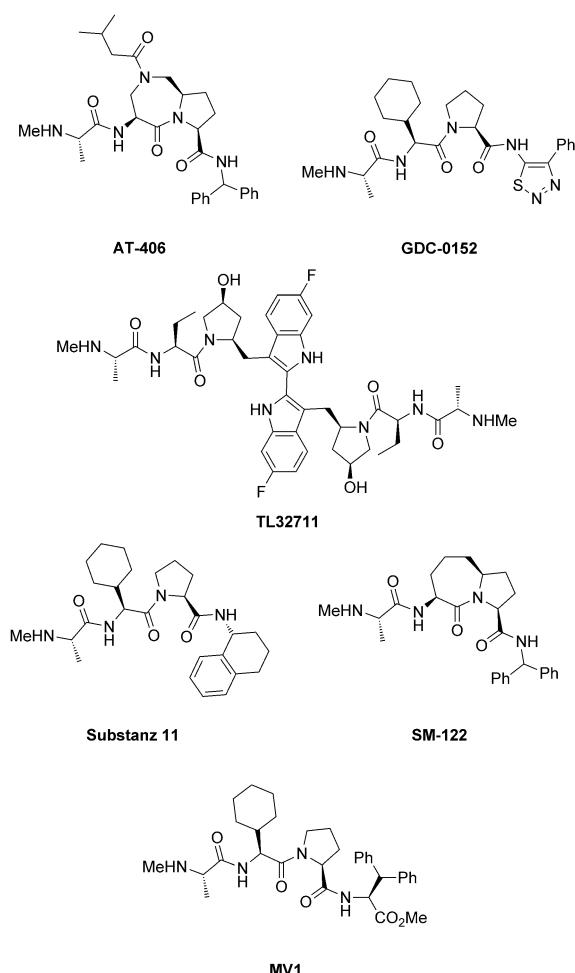


Abbildung 6. Zusammenfassung der IAP-Inhibitoren einschließlich AT-406 (von der Firma Asenta Therapeutics und der University of Michigan entwickelt),^[62] das in der klinischen Phase-I-Erprobung für die orale Verabreichung bei soliden Tumoren und Lymphomen ist; GDC-0152 der Firmen Genentech und Roche, das intravenös verabreicht wird und sich in der Phase-I-Erprobung bei metastasierenden Malignen befindet;^[63] sowie das bivalente TL32711 (intravenös verabreicht), entwickelt von der Firma Tetralogics Pharma;^[64, 58] LCL161 (Novartis), AEG35156 und AEG40826 (Aegera) sowie YM155 (Astellas Pharma) befinden sich ebenfalls in der klinischen Erprobung, sind aber hier nicht dargestellt.^[65, 58] Ausgewählte SMAC-Mimetika wie SM-122 und MV1 sind ebenfalls dargestellt, befinden sich aber noch nicht in der klinischen Erprobung.

Motivs durch eine bicyclische Struktur, wie sie sich in SM-122 findet.^[60] Ein weiterer peptidisches IAP-Antagonist ist das MV1, das von der Firma Genentech entwickelt wurde.^[61]

Die E3-Ligasen der SCF-Gruppe (**SKP1, CUL1, F-box-Protein**) bilden die Unterfamilie der oligomeren Cullin-RING-Ligasen (CRLs). Sie enthalten jeweils verschiedene F-box-Proteine, die die Substratspezifität vermitteln, und reagieren in vielen Fällen auf posttranskriptionale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, an den Zielproteinen (Abbildung 7).^[64] Zahlreiche Mitglieder der SCF-Gruppe wurden mit niedermolekularen Inhibitoren untersucht. SCF^{Skp2} ubiquitinyliert zahlreiche Proteine der Zellzykluskontrolle, wie das p27^{Kip1}. SCF^{Skp2}-Inhibitoren wurden mittels virtuellem

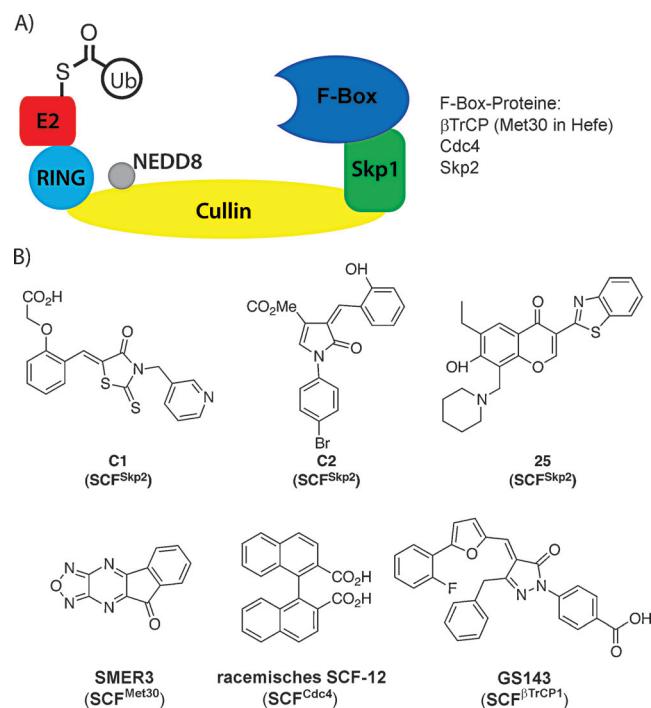


Abbildung 7. A) Darstellung des SCF-E3-Ligasekomplexes. Der Komplex enthält ein Cullin (das im aktiven Zustand NEDDyliert ist), welches eine RING-Domäne sowie den Adapter Skp1 bindet. Skp1 bindet außerdem verschiedene F-box-Proteine (wie β TrCP, Cdc4 und Skp2), die als Substratinteraktionsmotive fungieren, also die zu ubiquitinylierenden Zielproteine binden. B) Inhibitoren von SCF-E3-Ligasen. Die jeweils inhibitierten E3-Proteine sind in Klammern angegeben.

Screening der Grenzfläche des SCF^{Skp2}-p27-Molekülpaares gesucht. Sowohl das Rhodanin C1 als auch das Pyrrolinon C2 inhibieren *in vitro* die Ubiquitinierung von p27. Dies führt zur Akkumulation von p27 in den Zellen, was eine Arretierung der Zellen am G1/S-Kontrollpunkt induziert.^[65] Kürzlich wurde berichtet, dass eine Klasse von Chromonen SCF^{Skp2} inhibiert, indem sie die Bindung von Skp2 an den restlichen SCF-Komplex verhindern. Die Stammverbindung, Substanz 25, hatte in Versuchstieren Antitumorwirkung.^[66] SMER3 wurde im Rahmen eines chemisch-genetischen Screenings nach Wirkverstärkern des Rapamycins entdeckt. Es inhibiert die Ubiquitinierung von Met4 durch SCF^{Met30} mittels einer Blockade der Wechselwirkung von Met30 mit dem Kern des SCF-Komplexes.^[67] Racemisches SCF12 inhibiert Berichten zufolge die Interaktion von SCF^{Cdc4} mit seinem Zielprotein, phosphoryliertem Sic1. Kristallographische Untersuchungen haben jedoch erwiesen, dass SCF12 an die WD40-Propellerdomäne bindet, die 25 Å vom Substratbindungsplatz entfernt liegt, und das SCF^{Cdc4} also allosterisch hemmt.^[67b, 68] GS143 (Abbildung 7) wurde als mutmaßlicher SCF ^{β TrCP1}-Inhibitor vorgestellt. GS143 stabilisiert in Zellen das Protein I κ B α . Nachdem andere für die Stabilisierung denkbare Mechanismen ausgeschlossen werden konnten, stellten die Autoren die Hypothese auf, dass GS143 die SCF ^{β TrCP1}-I κ B α -Wechselwirkung unterbricht. Es liegen jedoch bislang keine Belege für eine direkte Bindung von GS143 an SCF ^{β TrCP1} oder I κ B α vor.^[69]

Wir haben kürzlich über den gezielten Entwurf niedermolekularer Verbindungen berichtet, die kompetitiv in die primäre HIF-Bindungstelle von VHLs, den substratbindenden Untereinheiten von CRLs, binden. Mit Blick auf den entscheidenden Hydroxyprolinrest des HIF entwickelten wir die Verbindung VL111.^[70] Mithilfe röntgenographischer Kristallstrukturen von VL111 und weiteren VHL-gebundenen Derivaten^[71] gelang die Optimierung des VHL-Liganden, und VL116 und VL229 wurden erhalten (Abbildung 8).^[72]

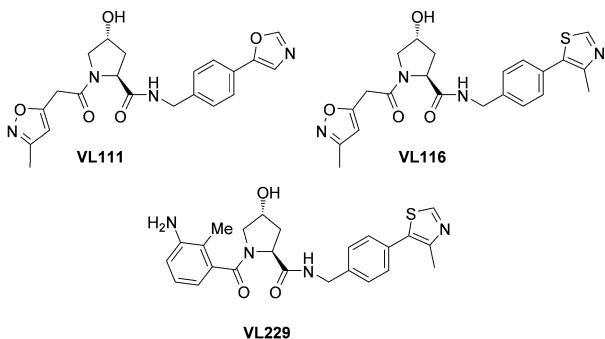


Abbildung 8. Strukturen von Hydroxyprolin-Derivaten, die befähigt sind, die Wechselwirkung von VHL mit einem von HIF abgeleiteten Peptid in vitro zu inhibieren.

Obwohl diese Verbindungen in vitro in der Lage waren, die Wechselwirkung von VHL mit fluoreszierenden, von HIF abgeleiteten Peptiden zu inhibieren, gelang es uns nicht, in lebenden Zellen eine ligandeninduzierte Stabilisierung von HIF nachzuweisen.

Thalidomid war ursprünglich als Sedativum entwickelt worden, bevor es als starkes Teratogen, das bei Embryonen Missbildungen wie Phocomelie (Gliedmaßenmissbildungen) und Amelie (Fehlen von Gliedmaßen) verursacht, traurige Berühmtheit erlangte. Obwohl es als Sedativum nicht mehr im Einsatz ist, wird die Substanz auch heute noch zur Behandlung schwerwiegender Krankheiten wie der Lepra und multiplem Myelom verwendet, auch wenn starke Nebenwirkungen zu verzeichnen sind. Kürzlich wurde berichtet, dass Thalidomid die E3-Ligase Cereblon (CRBN; ein Bestandteil einer für die Gliedmaßenbildung wichtigen CRL) bindet und inaktiviert. Diese Befunde bieten eine Erklärung für die embryologischen Nebenwirkungen des Thalidomids und eröffnen möglicherweise einen Ansatz für die Entwicklung von Thalidomid-Derivaten, die nicht gegen CRBN gerichtet sind.^[6b,73]

2.5. Direkte Stabilisierung destabilisierter Proteine durch niedermolekulare Verbindungen und Shield-1

Die direkte Bindung von Liganden vermag über eine Reihe von Mechanismen die Stabilität eines Proteins zu erhöhen. Bindung eines Liganden führt gemeinhin zur Erhöhung der thermischen Stabilität eines Proteins, sodass man die differentielle Rasterfluorimetrie für ein Hochdurchsatz-Screening heranziehen kann.^[75] Eine Ligandenbindung kann

außerdem das betreffende Protein für den Angriff durch Proteasen vorbereiten; dies ist die Grundlage für DARTS, einer Methode zur Auffindung zellulärer Angriffsziele niedermolekularer Verbindungen.^[76] Die markanteste Stabilisierung innerhalb von Zellen resultiert jedoch aus dem Einsatz ligandenreaktiver Degrons.^[77]

Aufbauend auf früheren Arbeiten mit Rapamycin-Derivaten zur Stabilisierung von mutiertem Frb*,^[78] mutierten Wandless und Mitarbeiter ein FKBP12-YFP-Fusionsprotein mittels fehleranfälliger Polymerasekettenreaktion (PCR) und analysierten anschließend die Fluoreszenz in Gegenwart und in Abwesenheit des FKBP12-Liganden, um nach destabilisierten FKBP12-Mutantenformen zu suchen, die sich durch Hinzufügung des Liganden „retten“ ließen. Die L106P-Mutation wurde dann mithilfe des verwandten Liganden Shld1 weiter untersucht (Abbildung 9). Dabei ergab sich, dass

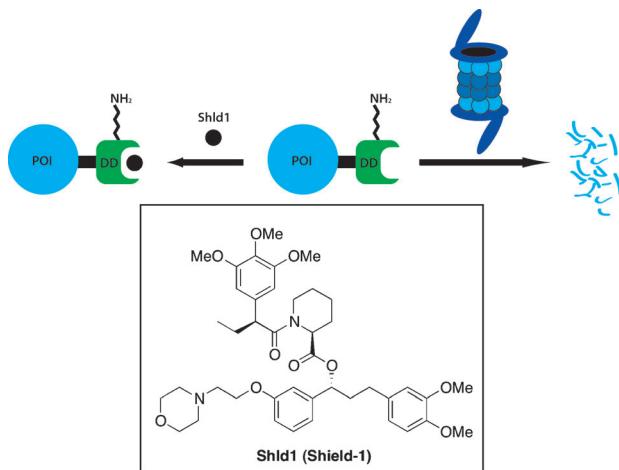


Abbildung 9. Shld1 wird eingesetzt, um mutierte FKBP-Proteine (und FKBP-Fusionsproteine) zu stabilisieren.^[74]

L106P in Zellkulturen^[74] und in Mäusen^[79] zahlreiche Fusionsproteine vor dem Abbau bewahrt. Diese Methode wurde dann so modifiziert, dass die Spaltung des Degrons möglich wurde, um in Gegenwart des stabilisierenden Liganden das native Protein zu erhalten.^[80] Ein alternativer Einsatz von Shld1 hat den gegenteiligen Effekt und stabilisiert Proteine, die mit mutiertem FKBP und einem kryptischen Degron fusioniert sind. Dazu verknüpft man das FKBP mit einer Degronsequenz sowie einer prolinreichen Sequenz, die so ausgelegt ist, dass sie in das aktive Zentrum von FKBP bindet. Ohne Shld1 ist das Degron maskiert, durch Zusatz von Shld1 wird es exponiert und bedingt so den Abbau des Fusionsproteins.^[81] Diese Systeme kamen verbreitet zum Einsatz und ermöglichen die Steuerung von dendritischen Proteinen^[82] und Transkriptionsfaktoren^[83] mit hoher zeitlicher Auflösung.

3. Induktoren des Proteinabbaus

Die Induktion des Proteinabbaus ist ebenfalls ein möglicher Weg bei der Entwicklung neuer Therapeutika. Während

sich Enzyminhibitoren und -antagonisten gegen begrenzte Gruppen von Proteinen richten (eben auf Enzyme bzw. Rezeptoren), lässt sich theoretisch jedes Protein dem Abbau zuführen. Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Gerüstproteine, die über Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) bzw. Protein-Nucleinsäure-Interaktionen ihre Wirkungen entfalten, sind lange Zeit als für pharmazeutische Wirkstoffe unzugänglich („undruggable“) erachtet worden.^[3] Substanzen wie PROTACs, die den Proteinabbau induzieren, erfordern lediglich einen Liganden, der befähigt ist, diese Zielmoleküle zu binden, und keinen, der die über große Bereiche der Moleküloberflächen erfolgenden Wechselwirkungen unterbindet. Daneben gilt, dass der Abbau des Proteins gleichzeitig auch den Verlust anderer biologischer Funktionen (z. B. als ein Gerüstbaustein) bewirkt, während Inhibitoren und Antagonisten lediglich eine bestimmte Funktion ihres Zielmoleküls stören.^[2] Jenseits des therapeutischen Einsatzgebietes ist die Verwendung niedermolekularer Sonden, die einen Proteinabbau induzieren, in vielen Fällen molekulargenetischen Ansätzen wie der RNA-Interferenz (RNAi) infolge besserer zeitlicher Steuerungsmöglichkeit und Reversibilität vorzuziehen.^[1b]

Der induzierte Abbau kann auch in solchen Fällen nützlich sein, in denen sich eine Resistenz gegen ein Therapeutikum entwickelt. Ein Resistenzmechanismus wie die erhöhte Expression eines Proteins ließe sich durch Induktion des Proteinabbaus überwinden. Im Fall des Androgenrezeptors (AR) kann eine Resistenz gegen Antagonisten wie Flutamid eintreten, die nicht die Bindung des Antagonisten verhindert, sondern durch mutative Änderung des Rezeptors den Antagonisten in einen Agonisten verwandelt.^[84] Niedermolekulare „Abbauer“ vermeiden dies, da das Zielprotein abgebaut wird und Mutationen, die mittels Resistenzbildung die Aktivität des Wirkstoffs aufheben, wirkungslos machen.

3.1. PROTACs: heterodifunktionelle Moleküle, die spezifische E3-Ligasen zu ihren Zielproteinen beordern

PROTACs (proteolysis targeting chimeras) sind heterodifunktionelle Moleküle,^[85] die einen Liganden für eine E3-Ligase und einen weiteren für das abzubauende Protein enthalten. Das betreffende Molekül vermag dann sowohl die E3-Ligase als auch das Ziel des Abbaus zu binden; es wird mithin die Bildung eines ternären Komplexes induziert. Diese „Kaperung“ der E3-Ligase kann dann zur Polyubiquitylierung des Zielproteins führen, der der Abbau durch das Proteasom folgt (Abbildung 10).^[1]

Die erste beschriebene PROTAC (PROTAC-1) enthielt ein von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ abgeleitetes Phosphopeptid, das die E3-Ligase $\text{SCF}^{\beta\text{TrCP}}$ sowie einen von Ovalicin abgeleiteten Molekülteil, der eine kovalente Bindung mit MetAP-2 eingeht, bindet (Abbildung 11). PROTAC-1 kann MetAP-2 spezifisch kovalent binden und es zu $\text{SCF}^{\beta\text{TrCP}}$ beordern, was *in vitro* zu dessen Ubiquitylierung führt. Leider ist PROTAC-1 nicht membrangängig.^[86] Ähnliche PROTACs, die sich gegen den AR und den ER richten, wurden unter Verwendung des gleichen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Phosphopeptids synthetisiert. Auch für diese

Verbindungen erwies sich die Plasmamembran der Zellen als nicht permeabel.^[87]

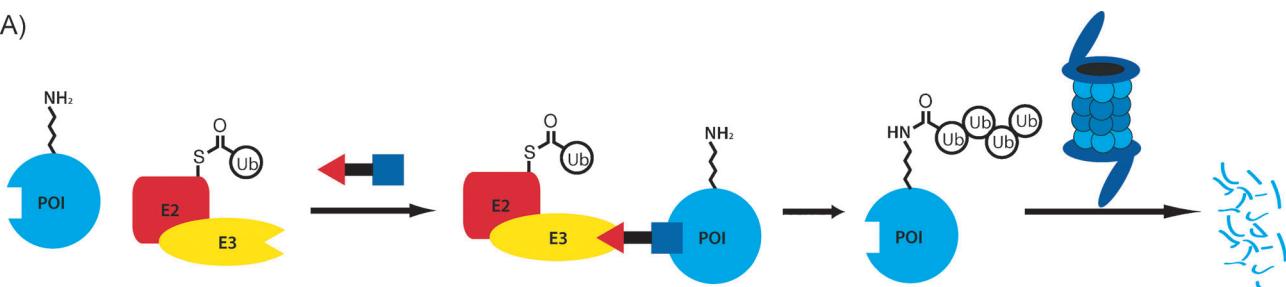
Die ersten zellgängigen PROTACs (PROTAC-4 und PROTAC-5) wurden durch Einbeziehung eines von HIF abgeleiteten Peptids mit der Sequenz ALAPYIP hergestellt. Sie binden VHL (nach *In-situ*-Hydroxylierung durch PHD-Enzyme), den substraterkennenden Anteil einer CRL-E3-Ligase. Zusätzlich wurde eine Poly-d-Arginylkette angefügt, um Zellgängigkeit zu erreichen (Abbildung 11). Dieses Konstrukt wurde mit einem Liganden für FKBP12 (F36V)^[88] verknüpft; es resultierte PROTAC-4, das in der Lage war, in Zellen in effizienter Weise (bei 25 μM) den Abbau von GFP-FKBP12 (F36V) herbeizuführen. PROTAC-5 enthält eine DHT-Anteil und wurde eingesetzt, um in Zellen den Abbau eines Androgenrezeptor/GFP-Fusionproteins (bei 25 μM) zu bewirken.^[89] Dasselbe HIF-Peptid oder verwandte Sequenzen sind bei zahlreichen PROTACs zum Einsatz gekommen, um den Östrogenrezeptor^[90] und den Arylkohlenwasserstoffrezeptor (AhR, Ah-Rezeptor)^[91] zu erreichen. Dabei kam es in den Zellen oftmals zum Abbau, ohne dass eine Poly-d-Arginylkette vonnöten war.

In der jüngeren Vergangenheit haben wir zwei peptidische PROTACs vorgestellt, deren Aktivität von der Reaktion der Zelle auf einen externen Stimulus abhängt. Als Reaktion auf die Stimulierung des Wachstumsfaktorrezeptors (GFR; growth factors receptor) dimerisieren in der Zelle GFR-abhängige Rezeptor-Tyrosinkinasen und phosphorylieren wechselseitig bestimmte Tyr-Reste (Transautophosphorylierung). Diese Phosphorylierung beordert Effektoren/Substrate mit PTP- und SH2-Domänen. Wir entwarfen $\text{TrkA}^{\text{PP}}_{\text{FRS2}\alpha}$ durch Kombination der peptidischen Phosphorylierungssequenz des NGF-Rezeptors TrkA (NGF: nerve growth factor) mit dem VHL-bindenden Fragment früherer PROTACs und der Octa-d-Arg-Sequenz, um Zellgängigkeit zu erreichen. Die Behandlung NGF-stimulierter PC12-Zellen mit 60 μM $\text{TrkA}^{\text{PP}}_{\text{FRS2}\alpha}$ führte zu einer ca. 90 %igen Abnahme der Menge des Effektors/Substrats FRS2 α . In Zellen, die nicht mit NGF oder mit der Negativkontrolle $\text{TrkA}^{\text{NP}}_{\text{FRS2}\alpha}$ behandelt worden waren, wurde kein Abbau beobachtet.^[92]

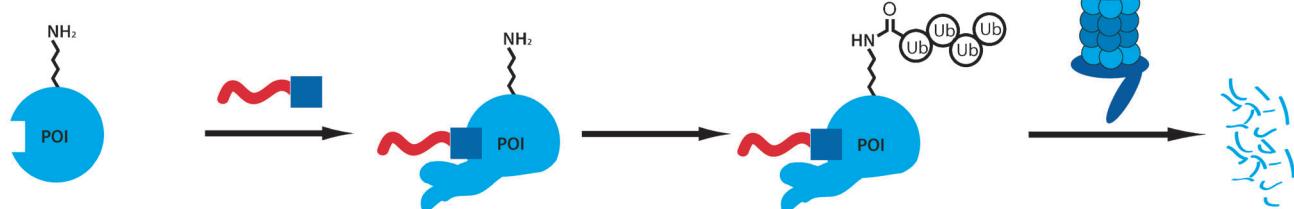
Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein zweites PhosphoPROTAC, $\text{ErbB2}^{\text{PP}}_{\text{PI3K}}$, entworfen. Einbezogen wurde eine Peptidsequenz des Proteins ErbB3, die auf die Einwirkung von Neuregulin hin durch ErbB2 phosphoryliert wird. Dies führt zur Bindung des Enzyms PI3K. $\text{ErbB2}^{\text{PP}}_{\text{PI3K}}$ bewirkt einen neuregulinabhängigen Abbau von PI3K und eine verminderte Aktivierung des stromabwärts von dieser Kinase gelegenen Effektors Akt. Dies hat eine dosisabhängige Toxizität von $\text{ErbB2}^{\text{PP}}_{\text{PI3K}}$ auf MCF-7-Zellen zur Folge, während gleichzeitig der Kontrollansatz mit dem Konstrukt $\text{ErbB2}^{\text{NP}}_{\text{PI3K}}$ eine vernachlässigbare Toxizität hatte. Bei Mäusen mit Xenotransplantaten führte eine täglich erfolgende Behandlung mit 10 mg kg^{-1} (i.p.) $\text{ErbB2}^{\text{PP}}_{\text{PI3K}}$ zu einer 40 %igen Reduktion der Tumogröße im Vergleich zum $\text{ErbB2}^{\text{NP}}_{\text{PI3K}}$ -Kontrollansatz. Dies war die erste Demonstration der Wirksamkeit eines PROTACs in Versuchsmäusen.^[92]

Obwohl peptidische PROTACs ihre Wirksamkeit in der Maus unter Beweis gestellt haben, besteht der starke Wunsch, auch nichtpeptidische PROTACs für E3-Ligasen wie MDM2^[93] und cIAP1 unter Verwendung niedermolekularer

A)



B)



C)

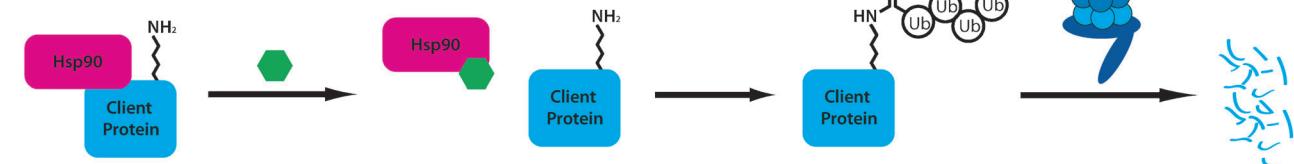


Abbildung 10. Zu den Strategien für den induzierten Proteinabbau gehören die direkte Rekrutierung einer E3-Ligase mit A) PROTACs, B) die induzierte Proteinfehlfaltung (oder die Nachahmung der Fehlfaltung) mit hydrophoben Tags (oder der ligandenvermittelte Abbau) sowie C) die Hemmung von Faltungshelferproteinen (Chaperonen) wie Hsp90.

Liganden zu entwickeln (Abbildung 11).^[94] Derartige PROTACs wären theoretisch „wirkstoffähnlicher“ haben Potenzial für therapeutische Anwendungen. Wir hatten bereits früher herausgefunden, dass die Verwendung eines nutlinartigen Molekülteils die Kaperung der E3-Ligase MDM2 ermöglicht, wodurch der Abbau des Androgenrezeptors (AR)^[93] möglich wird, allerdings in viel weniger effektiver Weise als bei unseren vorausgegangenen Arbeiten über peptidische VHL-Liganden.^[89]

Hashimoto und Mitarbeiter setzten Bestatinester ein, die den zellulären Inhibitor des Apoptoseproteins 1 (cIAP1) anwiesen, den Abbau zellulärer Retinsäurebindungsproteine (CRABPs; cellular retinoic acid-binding proteins)^[94] sowie von Zellkernrezeptoren wie dem AR, dem Östrogenrezeptor und dem Retinsäurerrezeptor zu bewirken.^[95] Diese als SNIPERs bezeichnete Subklasse der PROTACs erwies sich als recht erfolgreich, zeigte aber zahlreiche Nebeneffekte, die auf die mangelnde Spezifität des Bestatins (das als Aminopeptidaseinhibitor entwickelt worden war, bevor seine Bindung an cIAP1 entdeckt wurde) zurückzuführen sind.^[96] Diese Verbindungen führen, wie das Bestatin selbst (sowie weitere

IAP-Inhibitoren)^[62] ebenfalls zur Destabilisierung und zum Abbau von cIAP1. Darüber hinaus stellen sich, da man sich hier auf hydrolytisch instabile Ester- und Oximbindungen^[97] stützt, Fragen der Stabilität der Verbindungen. Außerdem leiden PROTACs (peptidische wie niedermolekulare) und SNIPERs unter geringer Wirkstärke, was vielfach Konzentrationen von bis zu 25 μM notwendig macht, um einen ausreichenden Proteinabbau zu erreichen. Es besteht somit ein Bedarf an verbesserten Molekülteilen zur Wechselwirkung mit E3-Ligasen, die zur Entwicklung wirkungsstärkerer und „wirkstoffähnlicherer“ PROTACs führen könnten.

3.2. Hydrophobes Tagging und ligandenvermittelter Abbau

Neben den PROTACs, die den Abbau eines Zielproteins durch einen unmittelbaren E3-Ligase-Liganden bewirken, existiert eine Reihe von Beispielen für den ligandenvermittelten Abbau mittels Verbindungen, die nicht die Fähigkeit besitzen, E3-Ligasen direkt zu binden. Ein derartiges Beispiel wurde in unserem Labor entdeckt, nachdem wir beobachtet

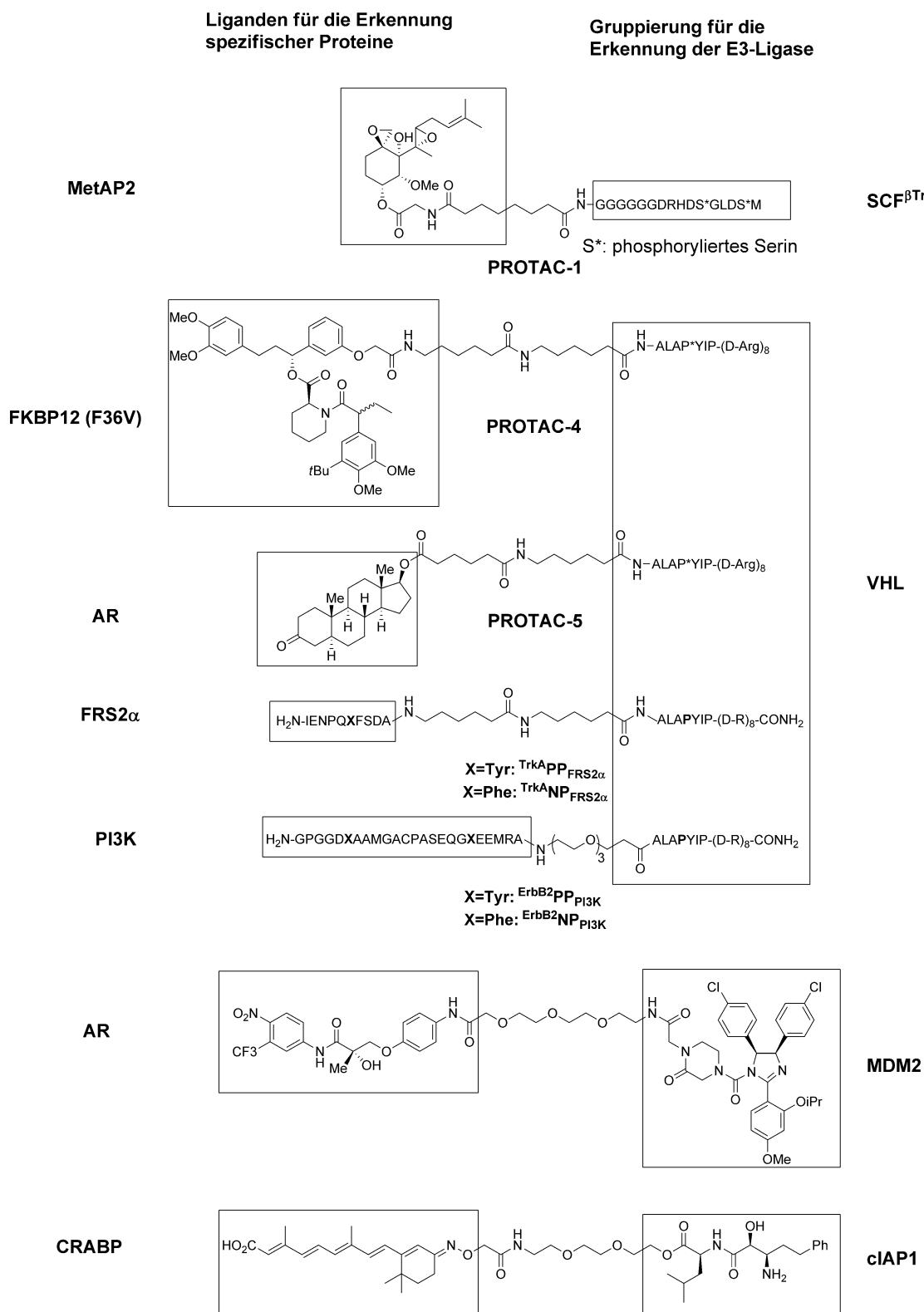


Abbildung 11. PROTACs sind heterodifunktionelle Moleküle, die einen E3-Ligaseliganden (rechts im Bild) mit einem POI-Liganden (POI = protein of interest; links im Bild) kombinieren. Das PROTAC-Molekül beordert die E3-Ligase zum POI, was Ubiquitinierung und Abbau nach sich zieht. Peptidliganden wurden eingesetzt, um die E3-Ligasen SCF^{βTrCP} und VHL anzusteuern; niedermolekulare Liganden wurden eingesetzt, um die Proteine MDM2 und cIAP1 anzusteuern.

hatten, dass der Einsatz von mit Hexylchlorid versehenen Liganden für HaloTag2-Fusionsproteine^[98] zu deren Abbau führt. Wir optimierten daraufhin die Chloralkanliganden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, den Abbau des HaloTag2-Fusionsproteins auszulösen, wobei sich ergab, dass die Erhöhung der Hydrophobie den Abbau verstärkte, was zu der Bezeichnung „hydrophobes Tagging“ führte. Dabei erwies sich Adamantaneacetamid HyT13 als für die Induktion dieses Abbaus erfolgreichster Ligand, der bei verschiedenen mit HaloTag2 fusionierten Proteinen (GFP, Luciferase, Hras1^{G12V}, Ror2 usw.) bis zu 75 % Abbau bewirkte (Abbildung 12).^[99]

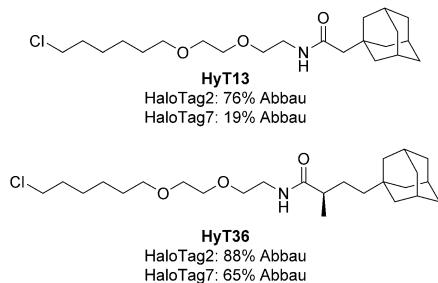


Abbildung 12. Die Strukturen von HyT13 und HyT36 sowie deren Fähigkeit, HaloTag-GFP-Fusionsproteine bei einer Konzentration von 10 μ M abzubauen.^[101]

Darüber hinaus erwies sich das HyT13 auch in vivo als effektiv bei der Auslösung des Abbaus von HaloTag2-Fusionsproteinen. Damit wurde im Zebräbärbling (*Danio rerio*) das HaloTag-Smad5 ausgeschaltet, ebenso das HaloTag-Hras1^{G12V} von Mäusen, was eine Verminderung der Tumogröße experimenteller Xenotransplantate nach sich zog.^[99] Im Verlauf eines Screenings niedermolekularer Verbindung fand sich ein Stoff namens HALTS, der HaloTag2-Fusionsproteine (in Abwesenheit von HyT13) stabilisiert, indem er in das aktive Zentrum bindet (kristallographisch bestimmt). Diese Stabilisierung, die an das oben beschriebene Shild-System erinnert, ermöglicht den durch niedermolekulare Verbindungen induzierten Abbau bei gleichzeitiger Stabilisierung des Systems.^[100]

Die Firma Promega hat das HaloTag-System weiter optimiert, um die Stabilität der Fusionsprotein zu steigern und dessen Aggregationsneigung zu vermindern. Das Ergebnis ist das HaloTag7-Protein,^[102] dessen Gen sich durch 22 Punktmutationen vom HaloTag2-Gen unterscheidet. Wir fanden, dass HyT13 den Abbau von HaloTag7-Fusionsproteinen viel weniger wirksam induziert, was bei HaloTag7-GFP in einem um 20 % verminderten Abbau resultierte. Nach umfangreicher Optimierung gelang es uns, mithilfe der verwandten Verbindung HyT36 (Abbildung 12) eine Abbaurate des HaloTag7-GFP von mehr als 50 % zu erzielen.^[101]

Ein ähnliches System, das kürzlich von Hestrom und Mitarbeitern vorgestellt wurde, basiert auf kovalenten Inhibitoren der Glutathion-S-transferase (GST), die über Boc₃Arg-Gruppen binden, sowie einem nichtkovalenten Inhibitor von eDHFR (Abbildung 13). Die Behandlung mit EA-Boc₃Arg führte zum effizienten Abbau von ca. 80 % des GST in Lysaten sowie in intakten Zellen. Das nichtkovalente

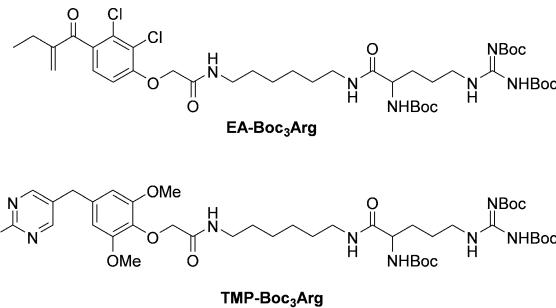


Abbildung 13. Strukturen von Boc₃Arg-haltigen „Abbauern“ der Proteine GST und eDHFR.

TMP-Boc₃Arg war weniger effektiv; es führte zu 60 % Abbau von eDHFR in Lysaten, aber zu nur 30 % Abbau in intakten Zellen.^[103]

Zusätzlich zu diesen Methoden, die dafür ausgelegt sind, sorgsam konstruierte Systeme und Fusionsproteine abzubauen, wurde ein ähnlicher ligandenvermittelter Abbau im Rahmen eines klassischen pharmazeutisch-chemischen Programms durch glücklichen Zufall gefunden. Erwähnenswert ist hier das Molekül Fulvestrant (Abbildung 14), ein durch die

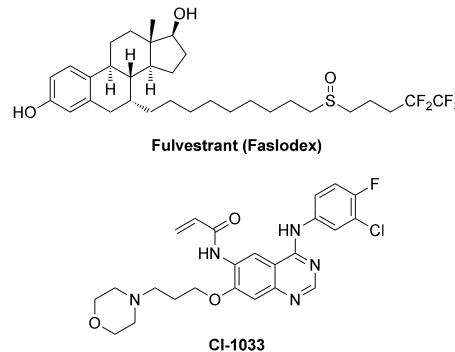


Abbildung 14. Fulvestrant und CI-1033, die als klassische Antagonisten oder Inhibitoren geplant waren, können den Abbau des Östrogenrezeptors (ER) bzw. von ErbB2 induzieren.

FDA zugelassener Östrogenrezeptor-Antagonist, der seine hemmende Wirkung durch Verhinderung der Dimerisierung des Rezeptors und seinen Übertritt in den Zellkern entfaltet.^[104] Die Fulvestrantbindung führt zu einer Konformationsänderung des Östrogenrezeptors, der daraufhin einen weniger stabilen Komplex bildet, was zu seiner Abregulierung führt.^[105] Ein weiteres Beispiel ist CI-1033, ein kovalenter Inhibitor des Proteins ErbB2, der dessen Abbau durch das Proteasom induziert.^[106] Es wurde vorgeschlagen, dass die kovalente Modifizierung der ATP-Bindungsstelle diese derart verändert, dass es zur Ubiquitylierung durch ein Chaperon-vermitteltes Zerstörungssystem (und nachfolgend zum Abbau) kommt.^[106]

Obwohl diesen Beispielen für ligandenvermittelten Abbau das klare Abbausignal der PROTACs fehlt (z.B. Li-

ganden zur direkten Rekrutierung von E3-Ligasen), weisen sie ähnliche Merkmale wie diese auf und könnten durch einen verwandten, aber doch verschiedenen Mechanismus wirken. Ein wiederkehrendes Motiv vieler dieser „Abbauer“ ist ein hydrophober Bereich, der über ein Verbindungsglied an den Liganden angefügt ist. Der Ligand ist oftmals kovalent mit dem Zielmolekül verknüpft. Diese Liganden vermögen dann eine Konformationsänderung zu induzieren oder die Bindung anderer Mitglieder eines Multiproteinkomplexes zu stören. Diese nichtnativen Zustände des Zielproteins sind dann unter Umständen von der Maschinerie der Zelle, die fehlgefaltete Protein erkennt, detektierbar, was schließlich zur Ubiquitylierung und zum Abbau führt. Da sich dieser Mechanismus jedoch stark auf der Fähigkeit des Zielmoleküls stützt, einen nichtnativen Zustand einzunehmen, könnten Versuche, diesen Ansatz auf andere Zielmoleküle auszudehnen, erfolglos sein.

3.3. Verwandte Systeme, die eine genetische Manipulation erfordern

Obwohl die obigen Systeme in vielen Fällen auf genetisch modifizierte Proteine abzielen, wurde für alle nachgewiesen, dass sie auch mit endogenen Proteinen funktionieren. Verschiedene Methoden erwiesen sich als erfolgreich beim gezielten Abbau von Proteinen, erfordern jedoch gezielte genetische Manipulationen, um zu funktionieren. Ein Beispiel ist die Fusion der Proteasomenuntereinheit Rpn10p mit Fpr1p in Hefezellen.^[107] Die Zugabe von Rapamycin führte zur chemisch induzierten Dimerisierung mit Tor1p-Fusionproteinen, wodurch deren Abbau bedingt wurde. Der Erfolg dieser Arbeiten belegt, dass die unmittelbare Lokalisation am Proteasom ausreicht, um manche Proteine auch ohne Polyubiquitylierung dem Abbau zuzuführen. Eine dazu verwandte Methode, die ohne niedermolekulare Verbindungen auskommt, aber trotzdem ein hohes Maß an Analogie zum Konzept der PROTACs erkennen lässt, ist die Entwicklung chimärer E3-Ligasen.^[108] Zhou et al. waren in der Lage, ein chimäres F-box-Protein auf der Grundlage von Cdc4p und βTrCP zu erzeugen, das die N-terminale Domäne eines Virusproteins namens E7, welches das Retinoblastomprotein (pRB) bindet, enthielt. Die Expression dieser Komplexe in Hefe- und Säugetierzellen führte zum Verschwinden von pRB.^[109] Dieses System wurde ebenfalls dazu genutzt, eine βTrCP-E-Cadherinchimäre zu generieren, die ein mutiertes β-Catenin, das dem normalen Abbau über den APC-Weg gegenüber resistent war, bindet und dem Abbau zuführt.^[110]

3.4. Geldanamycin-derivate und weitere Hsp90-Inhibitoren

Geldanamycin (Abbildung 15), ein Ansamycin-Antibiotikum, ist ein Naturstoff, der anhand seiner wachstumshemmenden Wirkung auf Zellen, die mit der Tyrosinkinase v-src transformiert waren, identifiziert wurde. Obwohl man anfangs davon ausging, dass eine direkte Inhibition von src erfolgt, wurde 1994 nachgewiesen, dass die Wirkung des Geldanamycins auf seine Inhibition von Hsp90 (Hitze-

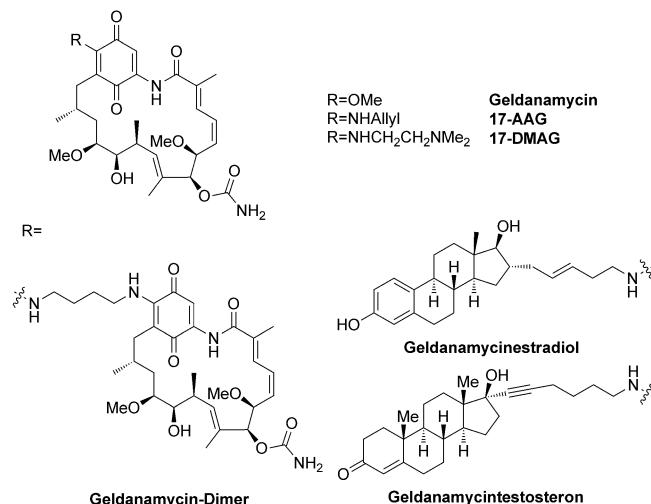


Abbildung 15. Geldanamycin samt Analoga.

schockprotein, 90 kDa) zurückgeht. Hsp90 ist ein Chaperon, das bei der Rückfaltung beschädigter Proteine assistiert. Die Hemmung von Hsp90 führt zum Abbau von src.^[112] Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Behandlung mit Geldanamycin zum Abbau zahlreicher weiterer Hsp90-Substrate wie dem Androgenrezeptor, dem Östrogenrezeptor sowie von Kinasen wie Raf^[113] und HER führt. Da viele dieser Proteine onkogene Wirkung haben können, wurden Hsp90-Inhibitoren als mögliche Chemotherapeutika erforscht. Die Entwicklung entsprechender Hemmstoffe ist ausgiebig referiert worden^[114] und soll deshalb an dieser Stelle nur kurz angerissen werden.

Da das Geldanamycin selbst für eine klinische Untersuchung zu toxisch ist, wurde eine Reihe von Derivaten mit variabler Substitution am Chinonanteil wie 17-AAG und 17-DMAG auf ihre Wirksamkeit bei Prostata- und Brustkrebs durch induzierten Abbau des AR und von HER2 hin untersucht. 17-AAG ging durch die Erprobungsphasen I und II, bevor die Versuche eingestellt wurden.^[114c] Da die Toxizität und die metabolische Instabilität des Geldanamycins zum großen Teil auf den Chinonanteil des Moleküls zurückgeführt werden konnte, ging man daran, vollsynthetische Hsp90-Inhibitoren zu entwickeln. Ein frühes Beispiel dafür ist das Purinderivat PU3,^[115] aus dem der klinische Kandidat PU-H71 hervorging.^[116] Weitere Beispiele synthetischer Hsp90-Inhibitoren in der klinischen Erprobung sind das Isoxazol-derivat NVP-AUY922^[117] und der Wirkstoffvorläufer SNX-5422 (PF-04929113) (Abbildung 16).^[118]

Da dem Geldanamycin und anderen Hsp90-Inhibitoren die Fähigkeit fehlt, selektiv den Abbau bestimmter Proteine herbeizuführen, wurden Anstrengungen unternommen, um Geldanamycinhybride mit einer verbesserten Spezifität bei der Ausschaltung von Proteinen zu entwickeln. Die Erzeugung eines Geldanamycin-Östradiol-Hybridmoleküls führte zu einer unveränderten Ausschaltung des Östrogenrezeptors bei gleichzeitiger Verminderung der Ausschaltung von Her2, Raf-1 und IGF1R.^[119] In vergleichbarer Weise führte ein Geldanamycin-Testosteron-Hybrid zu einer anhaltenden Hemmung des Wachstums AR-abhängiger Zellen, aber zu

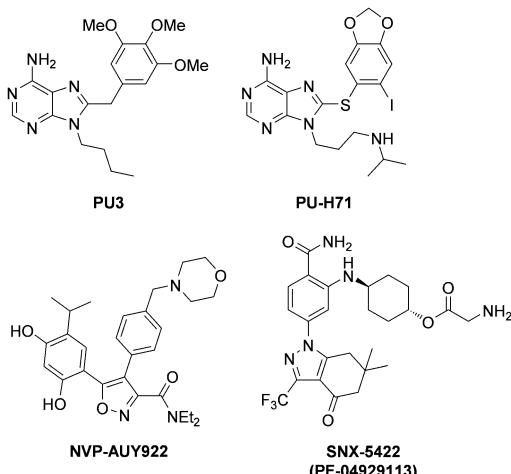


Abbildung 16. Ausgewählte synthetische Hsp90-Inhibitoren: PU3,^[115] PU-H71,^[116] NVP-AUY922^[117] und SNX-5422.^[118]

einer signifikant weniger ausgeprägten Hemmung von AR-unabhängigen Zellsorten.^[120] Da HER-Kinasen besonders empfindlich auf ein Hsp90-Inhibition reagieren und zu ihrer Aktivierung dimerisieren müssen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Geldanamycin-Dimer eine gesteigerte Selektivität für den HER2-Abbau besitzen sollte. Tatsächlich besitzt ein Dimer mit einem C4-Verbindungsstück zwischen den Monomeren eine erhöhte Selektivität für den Abbau von HER2 gegenüber dem von Raf und IGF.^[121]

3.5. Niedermolekulare Desubiquitinase-Inhibitoren

Ubiquitin und UBL-Proteine werden mit ihren Proteinsubstraten (oder unter Kettenbildung mit ihresgleichen) durch stabile Peptid- oder Isopeptidbindungen verknüpft. Die Bildung dieser Bindungen ist jedoch durch jede der ungefähr 80 bekannten Desubiquitininasen (DUBs) des Menschen revertierbar (Abbildung 17). Die DUBs werden in 5 Familien eingeteilt: JAMMs, die Zink-Metalloproteasen sind, sowie ubiquitinspezifische Proteasen (USPs), UCHs, OTUs und Josephine, die sämtlich Cysteinproteasen sind. Die Funktionen dieser Enzyme sind verschieden: die Maturierung von Ubiquitin und UBLs, die Entfernung von Ubiquitinketten, um einen Abbau zu verhindern und um nicht dem Abbau dienende Signale von UBLs zu revertieren, sowie die Rückgewinnung von Ubiquitinmolekülen während des Proteinabbaus durch das Proteasom. Die Spezifität der DUBs variiert und kann die Erkennung bestimmter Zielproteine oder bestimmter Typen der Verknüpfung mit dem Ubiquitin umfassen. Infolge ihrer weitreichenden Wirkungen innerhalb des UPS sowie aufgrund ihrer Wirkstoffen zugänglichen enzymatischen Aktivität könnten viele DUBs attraktive therapeutische Angriffsziele sein.^[122]

USP7 (Ubiquitin-spezifische Protease 7) ist eine Desubiquitinase mit Wirkung auf zahlreiche Substrate, darunter die E3-Ligase MDM2. Da USP7 das Protein MDM2 stabilisiert und so das antionkogen wirkende p53

abreguliert, stellt USP7 ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Krebstherapeutika dar. Der erste niedermolekulare Inhibitor, der für USP7 beschrieben wurde, war HBX 41,108;^[123] in der Folge stellte sich jedoch heraus, dass es sich um einen unspezifischen DUB-Inhibitor handelt.^[124] HBX 19,818 erwies sich dagegen als spezifischer Inhibitor des Proteins USP7 (ohne Wirkung auf eine Reihe anderer USPs und DUBs), der kovalent das katalytisch aktive Cys²²³ modifiziert.^[124] Weiterhin haben die Verbindungen P005091 und P0050429 duale Wirkung auf USP7 und USP47 im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich mit Hemmwirkung auf Zellen.^[125]

Verschiedene weitere DUB-Inhibitoren wurden vorgestellt. LS1 wurde beim Screening einer Verbindlungsbibliothek als Inhibitor von UCH-L3 entdeckt, wobei ein FRET-Assay auf Konjugate aus fluoreszenzmarkiertem Ubiquitin und Modellsubstraten mit Fluoreszenzloschern angewendet wurde.^[126] PR-619 hemmt eine breite Auswahl an DUBs und zeigt gute Selektivität gegenüber anderen Klassen von Cysteinproteasen.^[127] LDN91946 soll UCH-L1 hemmen, das möglicherweise an der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit beteiligt ist.^[128]

Während die Inhibition von DUB-Enzymen im Allgemein zu einem vermehrten Abbau ihrer Substrate führt, ist das nicht in jedem Fall so. Das 26S-Proteasom besitzt Desubiquitinaseaktivität, die in der 19S-Regulatoruntereinheit lokalisiert ist. Diese Desubiquitininasen entfernen die Polyubiquitinketten von den abzubauenden Proteinen. Die Entfernung der Ubiquitinmoleküle ist notwendig, damit das Proteasom die Proteine zerlegen kann. Die Hemmung der DUB-Aktivität des 19S-Regulatorpartikels sollte daher eine ähnliche Wirkung haben wie die weiter oben beschriebenen Proteasominhibitoren. Die niedermolekulare Verbindung b-AP15 inhibiert die mit dem 19S-Partikel assoziierten DUBs UCHL5 (Ubiquitin-C-terminushydrolase 5) und USP14, was

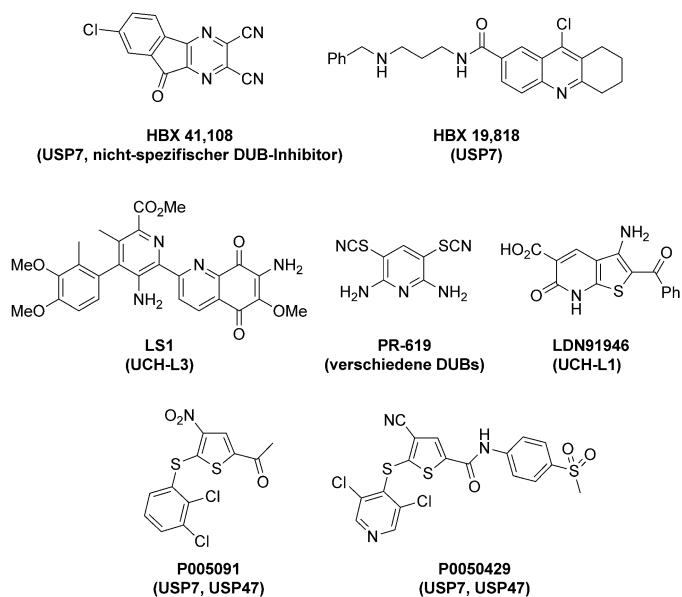


Abbildung 17. DUB-Inhibitoren. Das jeweils gehemmte DUB ist in Klammern angegeben.

zur Akkumulation von Polyubiquitin führt. An Mäusen konnte dann gezeigt werden, dass b-AP15 das Wachstum von Tumoren *in vivo* hemmt, was die mit dem 19S-Partikel assoziierten DUBs als Ziele einer Krebsbehandlung bestätigte (Abbildung 18).^[129] Die selektive Hemmung der Addition

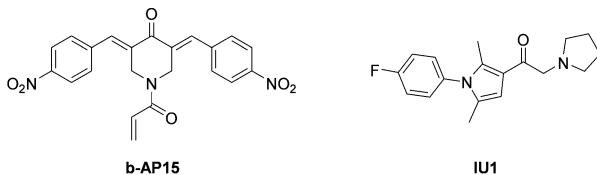


Abbildung 18. Inhibitoren von DUBs, die mit dem 19S-Regulatorpartikel assoziiert sind. IU1 inhibiert USP14, b-AP15 inhibiert USP14 und UCHL5.

von USP14 mit IU1 soll die entgegengesetzte Wirkung haben und zu einer Steigerung der Aktivität der Proteasomen führen.^[130] Diese Resultate deuten auf gegenläufige Wirkungen von USP14 und UCHL5 oder auf eine mögliche Redundanz hin, bei der UCHL5 die Hemmung von USP14 auszugleichen vermag.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In den 10 Jahren seit der Zulassung von Bortezomib/Velcade, dem ersten gegen das Proteasom gerichteten Wirkstoff, sind auf dem Gebiet der niedermolekularen Inhibitoren des UPS große Fortschritte erzielt worden. Diese Resultate haben jedoch nur langsam Eingang in die klinische Verwendung erlangt. Im Jahr 2012 wurde mit Carfilzomib/Kyprolis der zweite Proteasominhibitor für die Behandlung von rezidiven und refraktorischen multiplen Myelomen zugelassen.^[34] Gegenwärtig befinden sich Proteasominhibitoren der nächsten Generation in der Entwicklung. Eine der Anstrengungen richtet sich auf die Herstellung eines oral verabreichbaren Wirkstoffs, eine andere auf Substanzen, die gezielt auf das Immunproteasom wirken.^[35b]

Die Entwicklung von Inhibitoren, deren Angriffsziele im UPS nicht das Proteasom sind, ist im letzten Jahrzehnt ebenfalls gut vorangekommen, obgleich noch kein Produkt auf den Markt gebracht wurde. Wirkstoffe gegen E3-Ligasen können vermutlich die Spezifität der Kontrolle über die Stabilität von Proteinen gegenüber Proteasominhibitoren erhöhen, sind aber aufgrund des Fehlens definierter katalytischer Aminosäurereste dieser Proteine schwieriger zu finden. Im Jahr 2004 wurden die ersten E3-Ligaseinhibitoren gegen MDM2^[49] und gegen XIAP^[50] bekannt. Seitdem ist die Entwicklung von Inhibitoren für MDM2 und verwandte IAPs bis zur klinischen Erprobung fortgeschritten, sodass sie weiterhin als Ziele bei verschiedenen Krebsformen gelten. In den letzten 5 Jahren ist von Inhibitoren zahlreicher weiterer E3-Ligasen berichtet worden, darunter verschiedene SCF-Komplexe. Ungeachtet der Tatsache, dass aktuell keine Wirkstoffe gegen E3-Ligasen für den klinischen Einsatz zugelassen sind, sind die in der letzten Dekade erreichten Erfolge geeignet,

die einst verbreitete Vorstellung,^[57] dass die E3-Ligasen sich niedermolekularen Wirkstoffmolekülen widersetzen, ad acta zu legen.

Ein anderer verfolgter Ansatz, der spezifischer ist als die direkte Hemmung des Proteasoms, ist die Inhibition des E1-Proteins des Ubl-Proteins NEDD8 (NAE). Da die NEDDylation der Culline wichtig für die Aktivität der CRL-Klasse der E3-Ligasen ist, vermögen NAE-Inhibitoren wie MLN4924 (der sich gegenwärtig in den Phasen I und II der klinischen Erprobung befindet) eine ganze Klasse von E3-Ligasen auf einmal zu regulieren.^[44b,c]

Induktoren des Proteinabbaus bleiben auf dem Gebiet der Therapeutikaentwicklung eine attraktive Möglichkeit, da sie auf alle Funktionen eines Proteins abzielen (z.B. einer strukturgebenden als Gerüstprotein) – im Gegensatz zu Inhibitoren, die sich nur gegen eine enzymatische Aktivität richten.^[2] Hsp90-Inhibitoren sind in der Lage, den Abbau eines breiten Spektrums von für das Krebsgeschehen relevanten Proteinen zu induzieren. Aufgrund der großen Zahl von Hsp90-Inhibitoren, die sich in der klinischen Erprobung befinden, stellen auch sie eine vielversprechende Klasse möglicher Therapeutika dar.^[114d]

Weitere Forschungen sind notwendig, um allgemeine Methoden für den induzierten, gezielten Proteinabbau zu entwickeln. Obwohl Fulvestrant in der Lage ist, den Abbau des Östrogenrezeptors zu induzieren, ist es gegenwärtig noch unklar, ein wie großer Anteil seiner Wirkung auf eine Rolle als Antagonist des Östrogenrezeptors und ein wie großer auf die Rolle als Induktor des Proteinabbaus zurückzuführen ist.^[104a] Obschon weitere Berichte über ligandenvermittelten Proteinabbau vorliegen,^[99] ist es auch hier noch unklar, welche Proteine gute Ziele für diese Methodik darstellen und welche Funktionalitäten erforderlich sind, um den Prozess anzustossen. Systeme wie PROTACs helfen dabei, dieses Problem durch den Einsatz difunktioneller Moleküle zu lösen, die spezifische E3-Ligasen zu einem gegebenen Zielprotein beordern, doch leiden sie unter einem Mangel an „Druglikeness“ und sind bezüglich des Zielproteins noch von einem potennten Liganden abhängig.^[86,89,94]

Abkürzungen

AR	Androgenrezeptor
Boc ₃ Arg	ein Arginylrest, der drei Boc-Schutzgruppen trägt
CRABP	cellular retinoic acid binding protein (zell-eigenes Retinsäure-Bindeprotein)
CRL	Cullin-RING-Ligasen; eine Klasse von E3-Ligasen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen
DARTS	drug affinity responsive target stability (auf der Affinität zu einem Wirkstoff beruhende Stabilität eines Zielmoleküls)
DHT	Dihydrotestosteron
DUB	Desubiquitinase
eDHFR	Dihydrofolatreduktase aus <i>E. coli</i>
ER	Östrogenrezeptor
FKBP	FK506-Bindeprotein

Frb	FKBP12-Rapamycin-Bindepotein
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HECT	homologous to the E6-AP carboxyl terminus; eine Klasse von E3-Ligasen
HIF	hypoxieinduzierbarer Faktor; ein Transkriptionsfaktor, der durch VHL ubiquityliert wird
IAP	Inhibitor des Apoptoseproteins; eine Familie von E3-Ligasen
MDM2	mouse double minute 2 homolog; eine E3-Ligase
NAE	NEDD8-aktivierendes Enzym
NEDD8	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8 (in Nervenvorläuferzellen exprimierte, entwicklungsbedingt abreguliertes Protein Nr. 8); ein UBL-Protein
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PROTAC	proteolysis targeting chimera (auf Proteolyse abzielende Chimäre); heterodifunktionelle Moleküle, die E3-Ligasen kapern, um den Abbau von Proteinen zu bewirken
RING	really interesting new gene (richtig interessantes neues Gen); eine Domäne, die sich bei vielen E3-Ligasen findet
SCF	Skp, Cullin, F-box-Proteine; eine Unterfamilie der CRL-E3-Ligasen, deren Mitglieder sich mit verschiedenen F-box-Proteinen als spezifischen Adaptoren für ihre jeweiligen Substrate assoziieren
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases; ein Protein, das die IAP-E3-Ligaseaktivität hemmt
SNIPER	specific and nongenetic IAPs-dependent protein eraser (spezifischer und nichtgenetischer, IAP-abhängiger Proteinauslöscher); eine Untergruppe der PROTACs, die IAP-E3-Ligasen kapern
SUMO	small ubiquitin-like modifier (kleiner ubiquitinartiger Modifikator); ein UBL
TMP	Trimethoprim; ein Antibiotikum, das DHFR bindet
UAE	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
Ub	Ubiquitin
UBL	ubiquitinähnliche Proteine
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VHL	Von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor; die das Substrat erkennende Untereinheit einer E3-Ligase
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein

Wir danken Dr. John Hines für hilfreiche Beiträge zum Manuskript sowie Eric Buckley für den Entwurf des Frontispiz. Das Frontispiz zeigt die Kristallstruktur des Proteasoms im Komplex mit Fellutamid B (PDB 3D29).^[20a]

Ein eingegangen am 3. September 2013
Online veröffentlicht am 22. Januar 2014
Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- [1] a) K. Raina, C. M. Crews, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11057–11060; b) J. S. Schneekloth, Jr., C. M. Crews, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 40–46.
- [2] C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 551–555.
- [3] a) M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 301–317; b) J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009.
- [4] a) A. Hershko, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6082–6094; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5932–5943; b) A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 761–807.
- [5] Y. Kravtsova-Ivantsiv, T. Sommer, A. Ciechanover, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 202–209; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 192–198.
- [6] a) L. Bedford, J. Lowe, L. R. Dick, R. J. Mayer, J. E. Brownell, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 29–46; b) P. Cohen, M. Tcherpakov, *Cell* **2010**, *143*, 686–693.
- [7] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 739–758.
- [8] M. Zhou, R. Wang, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 694–707.
- [9] K.-B. Kim, C. M. Crews, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2600–2605.
- [10] A. Rentsch, D. Landsberg, T. Brodmann, L. Bülow, A.-K. Girbig, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5560–5599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5450–5488.
- [11] a) M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6629–6634; b) M. Bogyo, S. Shin, J. S. McMaster, H. L. Ploegh, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 307–320; c) P. P. Geurink, W. A. van der Linden, A. C. Mirabella, N. Gallastegui, G. de Bruin, A. E. M. Blom, M. J. Voges, E. D. Mock, B. I. Florea, G. A. van der Marel, C. Driessens, M. van der Stelt, M. Groll, H. S. Overkleef, A. F. Kisselev, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1262–1275.
- [12] a) E. J. Corey, W. D. Li, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1–10; b) L. R. Dick, A. A. Cruikshank, L. Grenier, F. D. Melandri, S. L. Nunes, R. L. Stein, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7273–7276; c) 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; d) G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 726–731; e) T. A. M. Gulder, B. S. Moore, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9534–9556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9346–9367.
- [13] N. Gallastegui, P. Beck, M. Arciniega, R. Huber, S. Hillebrand, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 251–254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247–249.
- [14] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P.-M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 563–566; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542–544.
- [15] a) J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533–539; b) A. J. Marques, R. Palaniswamy, A. C. Matias, P. C. Ramos, R. J. Dohmen, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1509–1536.
- [16] M. Groll, Y. Koguchi, R. Huber, J. Kohno, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 543–548.
- [17] T. A. Lansdell, M. A. Hurchla, J. Xiang, S. Hovde, K. N. Weilbaecher, R. W. Henry, J. J. Tepe, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 578–587.
- [18] A. Vinitsky, C. Michaud, J. C. Powers, M. Orlowski, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9421–9428.
- [19] V. J. Palombella, O. J. Rando, A. L. Goldberg, T. Maniatis, *Cell* **1994**, *78*, 773–785.
- [20] a) J. Hines, M. Groll, M. Fahnestock, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 501–512; b) J. S. Schneekloth, Jr., J. L. Sanders, J. Hines, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3855–3858.
- [21] a) J. Adams, *Oncologist* **2002**, *7*, 9–16; b) J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M.

- Klunder, Y.-T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 333.
- [22] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure* **2006**, 14, 451–456.
- [23] J. Adams, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 493–500.
- [24] K. Sugawara, M. Hatori, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Kamei, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 8–18.
- [25] M. Hanada, K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1746–1752.
- [26] N. Sin, L. Meng, H. Auth, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1209–1217.
- [27] N. Sin, K.-B. Kim, M. Elofsson, L. Meng, H. Auth, B. H. Kwok, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2283–2288.
- [28] a) K.-B. Kim, J. Myung, N. Sin, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3335–3340; b) L. Meng, B. H. Kwok, N. Sin, C. M. Crews, *Cancer Res.* **1999**, 59, 2798–2801; c) L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10403–10408.
- [29] M. Groll, K.-B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1237–1238.
- [30] K. B. Kim, C. M. Crews, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 600.
- [31] M. Elofsson, U. Splittergerber, J. Myung, R. Mohan, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 811–822.
- [32] a) H.-J. Zhou, M. A. Aujay, M. K. Bennett, M. Dajee, S. D. Demo, Y. Fang, M. N. Ho, J. Jiang, C. J. Kirk, G. J. Laidig, E. R. Lewis, Y. Lu, T. Muchamuel, F. Parlati, E. R. Ring, K. D. Shenk, J. Shields, P. J. Shwonek, T. Stanton, C. M. Sun, C. Sylvain, T. M. Woo, J. Yang, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3028–3038; b) S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati, K. D. Shenk, M. S. Smyth, C. M. Sun, M. K. Vallone, T. M. Woo, C. J. Molinaux, M. K. Bennett, *Cancer Res.* **2007**, 67, 6383–6391; c) D. Kuhn, Q. Chen, P. Voorhees, J. Strader, K. D. Shenk, C. M. Sun, S. D. Demo, M. K. Bennett, F. W. B. van Leeuwen, A. Chanan-Khan, *Blood* **2007**, 110, 3281.
- [33] D. S. Siegel, T. Martin, M. Wang, R. Vij, A. J. Jakubowiak, S. Lonial, S. Trudel, V. Kukreti, N. Bahlis, M. Alsina, A. Chanan-Khan, F. Budi, F. J. Reu, G. Somlo, J. Zonder, K. Song, A. K. Stewart, E. Stadtmauer, L. Kunkel, S. Wear, A. F. Wong, R. Z. Orlowski, S. Jagannath, *Blood* **2012**, 120, 2817–2825.
- [34] J. L. Thompson, *Ann. Pharmacother.* **2013**, 47, 56–62.
- [35] a) <http://www.clinicaltrials.gov/>; b) E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8838–8850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8708–8720.
- [36] E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groetttrup, M. Groll, *Cell* **2012**, 148, 727–738.
- [37] A. Gilardini, P. Marmiroli, G. Cavaletti, *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 3025–3035.
- [38] S. R. da Silva, S.-L. Paiva, J. L. Lukkarila, P. T. Gunning, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2165–2177.
- [39] Y. Yang, J. Kitagaki, R.-M. Dai, Y. C. Tsai, K. L. Lorick, R. L. Ludwig, S. A. Pierre, J. P. Jensen, I. V. Davydov, P. Oberoi, C.-C. H. Li, J. H. Kenten, J. A. Beutler, K. H. Vousden, A. M. Weissman, *Cancer Res.* **2007**, 67, 9472–9481.
- [40] G. W. Xu, M. Ali, T. E. Wood, D. Wong, N. Maclean, X. Wang, M. Gronda, M. Skrtic, X. Li, R. Hurren, X. Mao, M. Venkatesan, R. B. Zavareh, T. Ketela, J. C. Reed, D. Rose, J. Moffat, R. A. Batey, S. Dhe-Paganon, A. D. Schimmer, *Blood* **2010**, 115, 2251–2259.
- [41] J. Kitagaki, Y. Yang, J. E. Saavedra, N. H. Colburn, L. K. Keefer, A. O. Perantoni, *Oncogene* **2009**, 28, 619–624.
- [42] D. Ungeranova, S. J. Parker, C. G. Nasveschuk, D. A. Chapnick, A. J. Phillips, R. D. Kuchta, X. Liu, *J. Biomol. Screening* **2012**, 17, 421–434.
- [43] D. Ungeranova, S. J. Parker, C. G. Nasveschuk, W. Wang, B. Quade, G. Zhang, R. D. Kuchta, A. J. Phillips, X. Liu, *PLoS One* **2012**, 7, e29208.
- [44] a) J. E. Brownell, M. D. Sintchak, J. M. Gavin, H. Liao, F. J. Bruzzese, N. J. Bump, T. A. Soucy, M. A. Milhollen, X. Yang, A. L. Burkhardt, J. Ma, H.-K. Loke, T. Lingaraj, D. Wu, K. B. Hamman, J. J. Spelman, C. A. Cullis, S. P. Langston, S. Vyskocil, T. B. Sells, W. D. Mallender, I. Visiers, P. Li, C. F. Claiborne, M. Rolfe, J. B. Bolen, L. R. Dick, *Mol. Cell* **2010**, 37, 102–111; b) T. A. Soucy, P. G. Smith, M. A. Milhollen, A. J. Berger, J. M. Gavin, S. Adhikari, J. E. Brownell, K. E. Burke, D. P. Cardin, S. Critchley, C. A. Cullis, A. Doucette, J. J. Garnsey, J. L. Gaulin, R. E. Gershman, A. R. Lublinsky, A. McDonald, H. Mizutani, U. Narayanan, E. J. Olhava, S. Peluso, M. Rezaei, M. D. Sintchak, T. Talreja, M. P. Thomas, T. Traore, S. Vyskocil, G. S. Weatherhead, J. Yu, J. Zhang, L. R. Dick, C. F. Claiborne, M. Rolfe, J. B. Bolen, S. P. Langston, *Nature* **2009**, 458, 732–736; c) T. A. Soucy, P. G. Smith, M. Rolfe, *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 3912–3916.
- [45] J. I. Toth, L. Yang, R. Dahl, M. D. Petroski, *Cell Reports* **2012**, 1, 309–316.
- [46] a) D. F. Ceccarelli, X. Tang, B. Pelletier, S. Orlicky, W. Xie, V. Plantevin, D. Nucleai, Y.-C. Chou, A. Ogunjimi, A. Al-Hakim, X. Varelas, J. Koszela, G. A. Wasney, M. Vedadi, S. Dhe-Paganon, S. Cox, S. Xu, A. Lopez-Girona, F. Mercurio, J. Wrana, D. Durocher, S. Meloche, D. R. Webb, M. Tyers, F. Sicheri, *Cell* **2011**, 145, 1075–1087; b) J. W. Harper, R. W. King, *Cell* **2011**, 145, 1007–1009.
- [47] M. A. Sanders, G. Brahem, P. Nangia-Makker, V. Balan, M. Morelli, H. Kothayer, A. D. Westwell, M. P. Shekhar, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, 12, 373–383.
- [48] Y. S. Kim, K. Nagy, S. Keyser, J. S. Schneekloth, *Chem. Biol.* **2013**, 20, 604–613.
- [49] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fouhoui, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844–848.
- [50] F. Gonzalez-Lopez de Turiso, D. Sun, Y. Rew, M. D. Bartberger, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, D. Chow, T. L. Correll, X. Huang, L. D. Julian, F. Kayser, M.-C. Lo, A. M. Long, D. McMinn, J. D. Oliner, T. Osgood, J. P. Powers, A. Y. Saiki, S. Schneider, P. Shaffer, S.-H. Xiao, P. Yakowec, X. Yan, Q. Ye, D. Yu, X. Zhao, J. Zhou, J. C. Medina, S. H. Olson, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 4053–4070.
- [51] Y. Yuan, Y.-M. Liao, C.-T. Hsueh, H. R. Mirshahidi, *J. Hematol. Oncol.* **2011**, 4, 16.
- [52] K. Kojima, J. K. Burks, J. Arts, M. Andreeff, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, 9, 2545–2557.
- [53] a) L. T. Vassilev, *Trends Mol. Med.* **2007**, 13, 23–31; b) Y. Yang, J. Kitagaki, H. Wang, D.-X. Hou, A. O. Perantoni, *Cancer Sci.* **2009**, 100, 24–28.
- [54] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, S. Qiu, Y. Ding, W. Gao, J. Stuckey, K. Krajewski, P. P. Roller, Y. Tomita, D. A. Parrish, J. R. Deschamps, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10130–10131.
- [55] A. S. Azmi, P. A. Philip, F. W. J. Beck, Z. Wang, S. Banerjee, S. Wang, D. Yang, F. H. Sarkar, R. M. Mohammad, *Oncogene* **2011**, 30, 117–126.
- [56] Y. Zhao, L. Liu, W. Sun, J. Lu, D. McEachern, X. Li, S. Yu, D. Bernard, P. Ochsenbein, V. Ferey, J.-C. Carry, J. R. Deschamps, D. Sun, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 7223–7234.
- [57] K. Garber, *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, 97, 166–167.
- [58] S. Fulda, D. Vucic, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 109–124.
- [59] T. K. Oost, C. Sun, R. C. Armstrong, A.-S. Al-Assaad, S. F. Betz, T. L. Deckwerth, H. Ding, S. W. Elmore, R. P. Meadows, E. T. Olejniczak, A. Oleksijew, T. Oltersdorf, S. H. Rosenberg, A. R. Shoemaker, K. J. Tomaselli, H. Zou, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4417–4426.

- [60] a) J. Lu, L. Bai, H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, D. McEachern, S. Qiu, R. S. Miller, H. Yi, S. Shangary, Y. Sun, J. L. Meagher, J. A. Stuckey, S. Wang, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9384–9393; b) H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, J. Lu, J. L. Meagher, C.-Y. Yang, S. Qiu, Y. Tomita, Y. Ueda, S. Jiang, K. Krajewski, P. P. Roller, J. A. Stuckey, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15279–15294; c) H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, C.-Y. Yang, D. Qian, J. Lu, S. Qiu, L. Bai, Y. Peng, Q. Cai, S. Wang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1264–1277; d) H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, C.-Y. Yang, L. Xu, M. Liu, Y. Tomita, H. Pan, Y. Yoshioka, K. Krajewski, P. P. Roller, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16686–16687.
- [61] E. Varfolomeev, J. W. Blankenship, S. M. Wayson, A. V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J. N. Dynek, L. O. Elliott, H. J. A. Wallweber, J. A. Flygare, W. J. Fairbrother, K. Deshayes, V. M. Dixit, D. Vucic, *Cell* **2007**, *131*, 669–681.
- [62] Q. Cai, H. Sun, Y. Peng, J. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, D. McEachern, L. Liu, S. Qiu, C.-Y. Yang, R. Miller, H. Yi, T. Zhang, D. Sun, S. Kang, M. Guo, L. Leopold, D. Yang, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2714–2726.
- [63] S. Fulda, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4099–4100.
- [64] a) M. D. Petroski, R. J. Deshaies, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 9–20; b) T. Cardozo, M. Pagano, *BMC Biochem.* **2007**, *8*, S9; c) T. J. Cardozo, M. Pagano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 739–751.
- [65] a) E. Rico-Bautista, D. A. Wolf, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1497–1498; b) L. Wu, A. V. Grigoryan, Y. Li, B. Hao, M. Pagano, T. J. Cardozo, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1515–1524.
- [66] C.-H. Chan, J. K. Morrow, C.-F. Li, Y. Gao, G. Jin, A. Moten, L. J. Stagg, J. E. Ladbury, Z. Cai, D. Xu, C. J. Logothetis, M.-C. Hung, S. Zhang, H.-K. Lin, *Cell* **2013**, *154*, 556–568.
- [67] a) M. Aghajan, N. Jonai, K. Flick, F. Fu, M. Luo, X. Cai, I. Ouni, N. Pierce, X. Tang, B. Lomenick, R. Damoiseaux, R. Hao, P. M. Del Moral, R. Verma, Y. Li, C. Li, K. N. Houk, M. E. Jung, N. Zheng, L. Huang, R. J. Deshaies, P. Kaiser, J. Huang, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 738–742; b) J. R. Lydeard, J. W. Harper, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 682–684.
- [68] S. Orlicky, X. Tang, V. Neduvu, N. Elowe, E. D. Brown, F. Sischeri, M. Tyers, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 733–737.
- [69] H. Nakajima, H. Fujiwara, Y. Furuichi, K. Tanaka, N. Shimbara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 1007–1013.
- [70] D. L. Buckley, I. Van Molle, P. C. Gareiss, H. S. Tae, J. Michel, D. J. Noblin, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4465–4468.
- [71] I. Van Molle, A. Thomann, D. L. Buckley, E. C. So, S. Lang, C. M. Crews, A. Ciulli, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1300–1312.
- [72] a) D. L. Buckley, J. L. Gustafson, I. Van Molle, A. G. Roth, H. S. Tae, P. C. Gareiss, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11630–11634; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11463–11467.
- [73] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, *Science* **2010**, *327*, 1345–1350.
- [74] L. A. Banaszynski, L.-C. Chen, L. A. Maynard-Smith, A. G. L. Ooi, T. J. Wandless, *Cell* **2006**, *126*, 995–1004.
- [75] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221.
- [76] B. Lomenick, R. Hao, N. Jonai, R. M. Chin, M. Aghajan, S. Warburton, J. Wang, R. P. Wu, F. Gomez, J. A. Loo, J. A. Wohlschlegel, T. M. Vondriska, J. Pelletier, H. R. Herschman, J. Clardy, C. F. Clarke, J. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21984–21989.
- [77] L. A. Banaszynski, T. J. Wandless, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 11–21.
- [78] a) J. H. Bayle, J. S. Grimley, K. Stankunas, J. E. Gestwicki, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 99–107; b) K. Stankunas, J. H. Bayle, J. E. Gestwicki, Y.-M. Lin, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1615–1624.
- [79] L. A. Banaszynski, M. A. Sellmyer, C. H. Contag, T. J. Wandless, S. H. Thorne, *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1123–1127.
- [80] a) H. D. Lau, J. Yaegashi, B. W. Zaro, M. R. Pratt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8636–8639; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8458–8461; b) M. R. Pratt, E. C. Schwartz, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11209–11214.
- [81] K. M. Bonger, L.-C. Chen, C. W. Liu, T. J. Wandless, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 531–537.
- [82] S. Al-Bassam, M. Xu, T. J. Wandless, D. B. Arnold, *Cell Reports* **2012**, *2*, 89–100.
- [83] M. D. Shoulders, L. M. Ryno, C. B. Cooley, J. W. Kelly, R. L. Wiseman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8129–8132.
- [84] B. J. Feldman, D. Feldman, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 34–45.
- [85] T. W. Corson, N. S. Aberle, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 677–692.
- [86] K. Sakamoto, K.-B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews, R. J. Deshaies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8554–8559.
- [87] K. Sakamoto, K.-B. Kim, R. Verma, A. Ransick, B. Stein, C. M. Crews, R. J. Deshaies, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1350–1358.
- [88] W. Yang, L. W. Rozamus, S. Narula, C. T. Rollins, R. Yuan, L. J. Andrade, M. K. Ram, T. B. Phillips, M. R. van Schravendijk, D. Dalgarno, T. Clackson, D. A. Holt, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1135–1142.
- [89] J. S. Schneekloth, Jr., F. N. Fonseca, M. Koldobskiy, A. K. Mandal, R. J. Deshaies, K. Sakamoto, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3748–3754.
- [90] P. Bargagna-Mohan, S.-H. Baek, H. Lee, K.-B. Kim, R. Mohan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2724–2727.
- [91] a) H. Lee, D. Puppala, E.-Y. Choi, H. Swanson, K.-B. Kim, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2058–2062; b) D. Puppala, H. Lee, K.-B. Kim, H. I. Swanson, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 1064–1071.
- [92] J. Hines, J. D. Gough, T. W. Corson, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8942–8947.
- [93] A. R. Schneekloth, M. Puchault, H. S. Tae, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5904–5908.
- [94] Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820–5826.
- [95] Y. Itoh, R. Kitaguchi, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6768–6778.
- [96] a) S. Sato, M. Tetsuhashi, K. Sekine, H. Miyachi, M. Naito, Y. Hashimoto, H. Aoyama, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4685–4698; b) K. Sekine, K. Takubo, R. Kikuchi, M. Nishimoto, M. Kitagawa, F. Abe, K. Nishikawa, T. Tsuruo, M. Naito, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8961–8968.
- [97] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7633–7636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.
- [98] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382.
- [99] T. K. Neklesa, H. S. Tae, A. R. Schneekloth, M. J. Stulberg, T. W. Corson, T. B. Sundberg, K. Raina, S. A. Holley, C. M. Crews, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543.
- [100] T. K. Neklesa, D. J. Noblin, A. Kuzin, S. Lew, J. Seetharaman, T. B. Acton, G. Kornhaber, R. Xiao, G. T. Montelione, L. Tong, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2293–2300.
- [101] H. S. Tae, T. B. Sundberg, T. K. Neklesa, D. J. Noblin, J. L. Gustafson, A. G. Roth, K. Raina, C. M. Crews, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 538–541.
- [102] R. F. Ohana, L. P. Encell, K. Zhao, D. Simpson, M. R. Slater, M. Urh, K. V. Wood, *Protein Expression Purif.* **2009**, *68*, 110–120.
- [103] M. J. C. Long, D. R. Gollapalli, L. Hedstrom, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 629–637.

- [104] a) A. Howell, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2006**, *57*, 265–273; b) C. K. Osborne, A. Wakeling, R. I. Nicholson, *Br. J. Cancer* **2004**, *90*, S2–S6.
- [105] a) A. L. Wijayaratne, D. P. McDonnell, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35684–35692; b) B. M. Wittmann, A. Sherk, D. P. McDonnell, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9549–9560.
- [106] A. Citri, I. Alroy, S. Lavi, C. Rubin, W. Xu, N. Grammatikakis, C. Patterson, L. Neckers, D. W. Fry, Y. Yarden, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2407–2417.
- [107] D. M. Janse, B. Crosas, D. Finley, G. M. Church, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21415–21420.
- [108] P. Zhou, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 51–55.
- [109] a) J. Zhang, N. Zheng, P. Zhou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14127–14132; b) P. Zhou, R. Bogacki, L. McReynolds, P. M. Howley, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 751–756.
- [110] F. Cong, J. Zhang, W. Pao, P. Zhou, H. Varmus, *BMC Mol. Biol.* **2003**, *4*, 10.
- [111] C. Schneider, L. Sepp-Lorenzino, E. Nimmesgern, O. Ouerfelli, S. Danishefsky, N. Rosen, F. U. Hartl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14536–14541.
- [112] L. Whitesell, E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers, L. M. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8324–8328.
- [113] L. F. Stancato, A. M. Silverstein, J. K. Owens-Grillo, Y. Chow, R. Jove, W. B. Pratt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4013–4020.
- [114] a) T. Taldone, A. Gozman, R. Maharaj, G. Chiosis, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 370–374; b) M. Sgobba, G. Rastelli, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1399–1409; c) T. Taldone, W. Sun, G. Chiosis, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2225–2235; d) M. A. Biamonte, R. Van de Water, J. W. Arndt, R. H. Scannevin, D. Perret, W.-C. Lee, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3–17; e) L. Neckers, P. Workman, *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64–76.
- [115] G. Chiosis, M. N. Timaul, B. Lucas, P. N. Munster, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 289–299.
- [116] a) E. Caldas-Lopes, L. Cerciotti, J. H. Ahn, C. C. Clement, A. I. Robles, A. Rodina, K. Moullick, T. Taldone, A. Gozman, Y. Guo, N. Wu, E. de Stanchina, J. White, S. S. Gross, Y. Ma, L. Varticovski, A. Melnick, G. Chiosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8368–8373; b) R. M. Immormino, Y. Kang, G. Chiosis, D. T. Gewirth, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4953–4960.
- [117] S. A. Eccles, A. Massey, F. I. Raynaud, S. Y. Sharp, G. Box, M. Valenti, L. Patterson, A. de Haven Brandon, S. Gowan, F. Boxall, W. Aherne, M. Rowlands, A. Hayes, V. Martins, F. Urban, K. Boxall, C. Prodromou, L. Pearl, K. James, T. P. Matthews, K.-M. Cheung, A. Kalusa, K. Jones, E. McDonald, X. Barril, P. A. Brough, J. E. Cansfield, B. Dymock, M. J. Drysdale, H. Finch, R. Howes, R. E. Hubbard, A. Surgenor, P. Webb, M. Wood, L. Wright, P. Workman, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2850–2860.
- [118] P. Fadden, K. H. Huang, J. M. Veal, P. M. Steed, A. F. Barabasz, B. Foley, M. Hu, J. M. Partridge, J. Rice, A. Scott, L. G. Dubois, T. A. Freed, M. A. R. Silinski, T. E. Barta, P. F. Hughes, A. Ommen, W. Ma, E. D. Smith, A. W. Spangenberg, J. Eaves, G. J. Hanson, L. Hinkley, M. Jenks, M. Lewis, J. Otto, G. J. Pronk, K. Verleyen, T. A. Haystead, S. E. Hall, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 686–694.
- [119] S. D. Kuduk, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, S. J. Danishefsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1233–1238.
- [120] S. D. Kuduk, C. R. Harris, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, Q. Ouerfelli, N. Rosen, S. J. Danishefsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1303–1306.
- [121] F. F. Zheng, S. D. Kuduk, G. Chiosis, P. N. Münster, L. Sepp-Lorenzino, S. J. Danishefsky, N. Rosen, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2090–2094.
- [122] D. Komander, M. J. Clague, S. Urbé, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 550–563.
- [123] F. Colland, E. Formstecher, X. Jacq, C. Reverdy, C. Planquette, S. Conrath, V. Trouplin, J. Bianchi, V. N. Aushev, J. Camonis, A. Calabrese, C. Borg-Capra, W. Sippl, V. Collura, G. Boissy, J.-C. Rain, P. Guedat, R. Delansorne, L. Daviet, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2286–2295.
- [124] C. Reverdy, S. Conrath, R. Lopez, C. Planquette, C. Atmanene, V. Collura, J. Harpon, V. Battaglia, V. Vivat, W. Sippl, F. Colland, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 467–477.
- [125] J. Weinstock, J. Wu, P. Cao, W. D. Kingsbury, J. L. McDermott, M. P. Kodrasov, D. M. McKelvey, K. G. S. Kumar, S. J. Goldenberg, M. R. Mattern, B. Nicholson, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 789–792.
- [126] S. Ohayon, L. Spasser, A. Aharoni, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3281–3289.
- [127] M. Altun, H. B. Kramer, L. I. Willems, J. L. McDermott, C. A. Leach, S. J. Goldenberg, K. G. S. Kumar, R. Konietzny, R. Fischer, E. Kogan, M. M. Mackeen, J. McGouran, S. V. Khoronenkova, J. L. Parsons, G. L. Dianov, B. Nicholson, B. M. Kessler, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1401–1412.
- [128] A. H. Mermerian, A. Case, R. L. Stein, G. D. Cuny, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3729–3732.
- [129] P. D'Arcy, S. Brnjic, M. H. Olofsson, M. Fryknäs, K. Lindsten, M. De Cesare, P. Perego, B. Sadeghi, M. Hassan, R. Larsson, S. Linder, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1636–1640.
- [130] B.-H. Lee, M. J. Lee, S. Park, D.-C. Oh, S. Elsasser, P.-C. Chen, C. Gartner, N. Dimova, J. Hanna, S. P. Gygi, S. M. Wilson, R. W. King, D. Finley, *Nature* **2010**, *467*, 179–184.