

Selektive Inhibition des Immunoproteasoms durch ligandeninduzierte Vernetzung des katalytischen Zentrums**

Christian Dubiella, Haissi Cui, Malte Gersch, Arwin J. Brouwer, Stephan A. Sieber, Achim Krüger, Rob M. J. Liskamp* und Michael Groll*

Abstract: Das Konzept der Proteasom-Inhibition zählt zu den jüngsten Errungenschaften der Blutkrebstherapie und stellt eine vielversprechende Strategie zur Regulierung von Autoimmunerkrankungen dar. Diese Arbeit beschreibt die selektive Hemmung der katalytischen $\beta 5$ -Untereinheit des Immunoproteasoms durch peptidische Sulfonylfluoride, die nur geringen zytotoxischen Effekt haben. Strukturelle und massenspektrometrische Analysen offenbarten einen neuartigen Inhibitionsmechanismus, der zu einer Umpolung und irreversiblen Vernetzung des proteasomalen aktiven Zentrums führt. Hierdurch identifizierten wir die Sulfonylfluorid-Kopfgruppe für die Weiterentwicklung von Immunoproteasom-spezifischen Verbindungen und ihren möglichen Einsatz zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

Das 20S-Proteasom-Kernpartikel („core particle“, CP) ist das Angriffsziel der klinisch angewendeten Wirkstoffe Bortezomib (Velcade) und Carfilzomib (CFZ, Kyprolis; Abbildung 1). Seine Hemmung in malignen Zellen hat sich zu einem effektiven Therapieansatz für die Behandlung von Blutkrebsarten wie des multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms entwickelt.^[1,2] Darüber hinaus macht die gegenwärtige Evaluation des antiinflammatorisch wirkenden Immunoproteasom(iCP)-Inhibitoren ONX 0914 (früher PR-957; Abbildung 1) in präklinischen Studien Hoffnung auf neuartige therapeutische Ansätze für die Modulation von Autoimmunkrankheiten, darunter rheumatoide Arthritis und multiple Sklerose.^[3,4] Eine besondere Eigenschaft von ONX

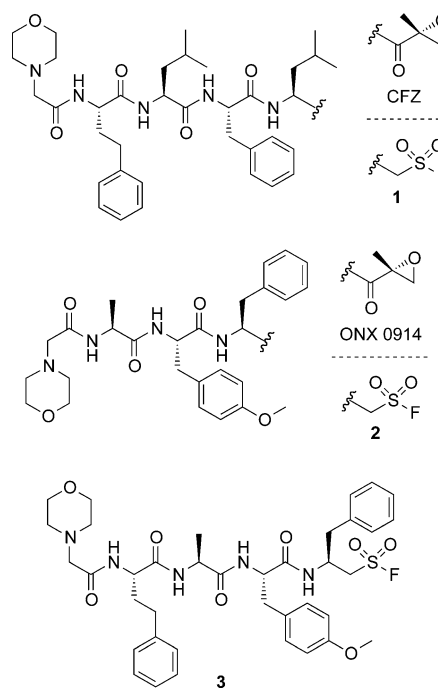


Abbildung 1. α',β' -Epoxyketone Carfilzomib (CFZ) und ONX 0914 sowie ihre peptidischen Sulfonylfluorid (PSF)-Äquivalente 1, 2 und Verbindung 3.

0914 ist die Unterdrückung von krankheitsassoziierten Immunreaktionen durch selektive Hemmung der $\beta 5$ -Untereinheit des iCP ($\beta 5i$ oder LMP7).^[3] Allerdings hängt das therapeutische Fenster von iCP-Inhibitoren wie ONX 0914 entscheidend von ihrer Selektivität für $\beta 5i$ gegenüber $\beta 5c$ ab, um zytotoxische Effekte durch unerwünschte Coinaktivierung des konstitutiven Proteasoms (cCP) zu vermeiden.^[5,6] Daher ist die Fähigkeit, zwischen den Chymotrypsin-ähnlichen (ChTL) Aktivitäten von $\beta 5i$ und $\beta 5c$ zu unterscheiden, eine Grundvoraussetzung für das iCP-Inhibitor-Design.^[7] Sowohl CFZ als auch ONX 0914 weisen ein elektrophiles α',β' -Epoxyketon-Motiv auf, das irreversibel mit den beiden Nukleophilen Thr1O^γ und Thr1N des katalytisch aktiven Threonins (Thr1) der $\beta 5$ -Untereinheit ein kovalentes Addukt bildet (siehe Schema S1 in den Hintergrundinformationen).^[8–10] Da CFZ und ONX 0914 dieselbe Kopfgruppe tragen, ist die bevorzugte Bindung von ONX 0914 an $\beta 5i$ allein auf die Wechselwirkung seines Rückgrats mit den charakteristischen Proteintaschen zurückzuführen, das die individuellen Bindungsvoraussetzungen von $\beta 5i$ im Gegensatz zu $\beta 5c$ erfüllt.^[11] Jüngste Bestrebungen, diese Besonder-

[*] C. Dubiella, Dr. M. Gersch, Prof. Dr. S. A. Sieber, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Department für Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

Prof. Dr. R. M. J. Liskamp
University of Glasgow
University Avenue, Glasgow G12 8QQ (Großbritannien)
E-Mail: robert.liskamp@glasgow.ac.uk

H. Cui, Prof. Dr. A. Krüger
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Technische Universität München, 81675 München (Deutschland)

A. J. Brouwer
Utrecht University, 3508 TB Utrecht (Niederlande)

[**] Diese Arbeit wurde gefördert durch den SFB 1035A2 und die DFG GR 1861/10-1. Wir danken Richard Feicht, Regina Baur und Anna-Lena Späth für ihre Hilfe bei Laborarbeiten sowie den Mitarbeitern der PXI des Paul Scherrer Instituts, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für die Unterstützung bei der Datenaufnahme.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406964> zu finden.

heit durch den Einsatz von nichtnatürlichen Aminosäuren zu optimieren, haben eine Vielzahl an β 5i- und β 5c-spezifischen Epoxyketonen hervorgebracht.^[5,12,13] Allerdings legen Studien über verschiedene Kopfgruppen sowie peptidische Sulfonylfluorid-Proteasom-Inhibitoren (PSF) nahe, dass auch funktionelle Gruppen einen direkten Einfluss auf die Selektivität für aktive β -Untereinheiten nehmen.^[14–16] Bemerkenswerterweise hemmen PSF-Verbindungen die CP-Aktivität im nanomolaren Bereich.^[16] Dabei stellen sie bisher die einzigen peptidischen CP-Inhibitoren dar, deren elektrophile Kopfgruppe um eine Methylen-Einheit versetzt ist, was einen außergewöhnlichen Reaktionsmechanismus erfordert. Um den molekularen Bindemodus der PSF zu erforschen, wurden die PSF-Äquivalente **1** und **2** der Wirkstoffe CFZ und ONX 0914 synthetisiert (Abbildung 1). Des Weiteren wurden Hefe-CP(γ CP):1-Strukturen von zeitabhängigen Kristallexperimenten mit Ligand-Inkubationszeiten zwischen 1–6 h vor der Datenaufnahme mit Auflösungen bis zu 2.1 Å bestimmt (Tabelle ST1).

Aufgrund identischer Kopfgruppen der PSF und des ge-läufigen Serinproteasen-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde ein analoger Inhibitionsmechanismus durch kovalente Adduktbildung an Thr1 nach nukleophilem Angriff von Thr1O γ auf das Schwefelatom erwartet. Unverhofft offenbarte jedoch die γ CP:1-Struktur nach Inkubation des Kristalls für 2 h leere Substratbindekanäle (2.1 Å Auflösung, $R_{\text{free}} = 19.7\%$, PDB-ID 4R17). Stattdessen zeigte die $F_o - F_c$ -Karte negative Elektronendichte an der Thr1-Seitenkette der Untereinheit β 5, was eine chemische Modifikation des Katalyseentrums nahe legt (Abbildung S1a). Im Vergleich dazu waren β 1 und β 2 unverändert. Um ein kurzlebiges Intermediat von **1** an β 5 zu identifizieren, wurden verschiedene CP-Typen mit **1** oder **2** inkubiert und durch zeitabhängige Intakt-Protein-Massenspektrometrie mittels LC-ESI-LTQ-FT-MS analysiert (Abbildung 2). Die Spektren von sämtlichen CP-Typen mit Inkubationszeiten bis 2 h bestätigten die Bildung eines kovalenten Addukts an der β 5-Untereinheit durch eine Massezunahme entsprechend des Liganden nach Fluoridabspaltung (siehe Abbildung 2 und Abbildung S2). Des Weiteren war eine formale Dehydratisierung (–18 Da) an der β 5-Untereinheit nachzuweisen was durch

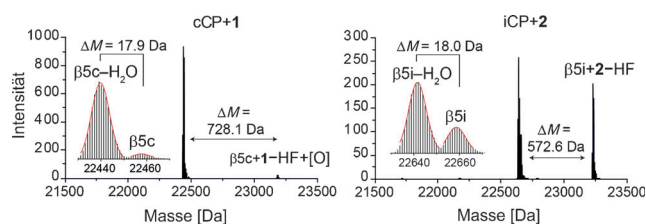


Abbildung 2. Dekonvolutierte Masseanalyse der β 5c- und β 5i-Untereinheiten nach 12-stündiger Inkubation von cCP mit **1** (links) sowie iCP mit **2** (rechts) (25 μ M). Die mit „–H $_2$ O“ gekennzeichnete Spezies repräsentiert das Aziridin oder den vernetzten Zustand (zu erwartende Massedifferenz: 18.0 Da). Der linke Bereich zeigt Vergrößerungen der Hauptspezies. Die mit „+2–HF“ gekennzeichnete Spezies repräsentiert das kovalent modifizierte Intermediat der β 5-Untereinheit vor der Dehydroxylierung (zu erwartende Massedifferenz: 572.7 Da). Siehe Abbildung S5 für Spektren der β 5-Untereinheit von unbehandeltem cCP und iCP.

mehrfache Masseanalysen mit verschiedenen Dekonvolutionsalgorithmen bestätigt wurde (siehe Abbildungen S3,S4 und Tabellen ST2-ST3).

Diese Befunde deuten entweder auf eine Additions-Eliminierungs-Reaktion hin, wie sie beispielsweise für PMSF anhand der Umwandlung des aktiven Ser195 von Thrombin in Dehydroalanin beschrieben wurde,^[17] oder auf einen Additions-Substitutions-Mechanismus, bei dem nach Sulfonylierung von Thr1O γ und intramolekularer Substitution des Thr1N ein Aziridin gebildet wird. Die PMSF-induzierte Eliminierung benötigt jedoch stark basische Bedingungen, während unsere Experimente bei pH 6.8–7.5 durchgeführt wurden, sodass die Dehydroxylierung von Thr1 vielmehr ein integraler Bestandteil des Inhibitionsmechanismus ist als ein baseninduziertes Ereignis. Damit übereinstimmend zeigt die $F_o - F_c$ -Elektronendichte deutlich das intramolekulare Substitutionsprodukt (*S,S*)-Aziridin-T1' (Abbildung 3b), was (*E*)-Dehydrobutyrin (Dhb) als mögliches Eliminierungspro-

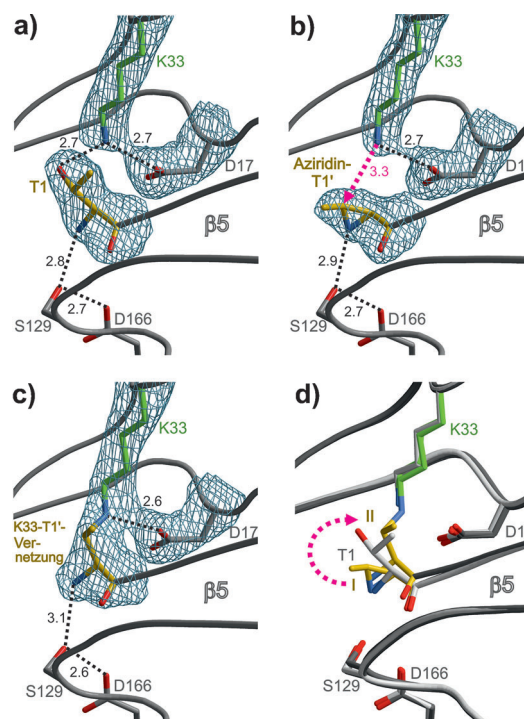


Abbildung 3. Vergleich von Röntgenstrukturanalysen des aktiven Zentrums der Untereinheit β 5 nach zeitabhängigen Inkubationsexperimenten von γ CP-Kristallen mit **1**. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (blaues Netz, konturiert bei 1 σ) zeigt Abstände in Å als schwarze gestrichelte Linien. Die Triade des aktiven Zentrums – Thr1 (T1), Asp17 (D17) und Lys33 (K33) – wurde von der Phasierung ausgeschlossen. Zusätzliche Stereoabbildungen von (a)–(d) sind in Abbildung S6 zu finden. a) Untereinheit β 5 der Apostruktur mit nichtmodifiziertem T1 (gelb).^[18] b) Aziridin-T1' (gelb)-Bildung an β 5 nach 2 h Inkubationszeit mit **1**. Die Trajektorie des nukleophilen Angriffs von K33 (grün) ist als pinker gestrichelter Pfeil dargestellt (PDB ID 4R17). c) K33-T1'-Vernetzung (gelb) an Untereinheit β 5 nach 6 h Kristallinkubation (PDB ID 4R18). d) Überlagerung von Apostruktur mit nichtmodifiziertem T1 (hellgrau), Aziridin-T1'-Intermediat (I, gelb) und der K33-T1'-Vernetzung (II, gelb). Die Strukturumlagerung von T1 nach seiner Umsetzung zu Intermediat I und Vernetzung II ist durch einen pinken gestrichelten Pfeil dargestellt.

dukt ausschließt (siehe Abbildung S1b). Zusätzlich bestätigt die invertierte Stereokonfiguration der Methylgruppe von (*S,S*)-Aziridin-Thr1' eine von Thr1N ausgelöste Cyclisierung, die eine S_N2 -artige Substitution begründet. Um die Stabilität des Aziridinrings zu untersuchen, führten wir weitere Kristallexperimente mit verlängerter Inkubationszeit bis zu 6 h bei pH 6.8 durch. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte der yCP:1-Struktur offenbarte eine Ringöffnung von Aziridin-Thr1' durch S_N2 -Substitution der Aminogruppe des Lys33 (Lys33N^E), wodurch eine intramolekulare Vernetzung in $\beta 5$ stattgefunden hat (Abbildung 3c; 2.4 Å Auflösung, $R_{\text{free}} = 19.5\%$, PDB-ID 4R18). Diese Lys33-Thr1'-Bindung beweist das Vorhandensein eines elektrophilen Thr1-Intermediates und ist überraschend, da Lys33N^E generell den pK_a -Wert von Thr1O^Y mit geringer intrinsischer Nukleophilie aufrechterhält.^[19] Aus organisch-chemischer Sicht ist die Aziridinringöffnung ebenfalls überraschend, da für den Reaktionsverlauf in der Regel eine elektronenziehende Gruppe am Aziridin-Stickstoffatom erforderlich ist.^[20]

Interessanterweise zeigt die Überlagerung der Apo- mit der yCP:1-Struktur, dass allein die Flexibilität der Aziridin-Thr1' beinhaltenden $\beta 5$ -Kette für die Überbrückung der 3.3 Å langen Distanz zwischen den Reaktionspartnern Lys33N^E und dem Elektrophil verantwortlich ist. Bemerkenswerterweise bleibt die Position sämtlicher anderen Aminosäurereste unverändert (Abbildung 3d). Folglich ist der Verlust der strukturellen Integrität durch Dehydroxylierung von Thr1 eine Grundvoraussetzung für die Vernetzung. Gestützt auf diese individuellen Momentaufnahmen der Reaktionsintermediate schlagen wir einen dreistufigen Mechanismus der PSF-Verbindungen vor, der letztlich zu einer irreversiblen Hemmung des proteasomalen aktiven Zentrums führt (Schema 1).

Unser nächstes Ziel war die Analyse, ob dieser komplexe Mechanismus zu einer verbesserten $\beta 5$ -Selektivität und somit zu einer verringerten Zytotoxizität beitragen kann. Deshalb verglichen wir sowohl die Bindeaffinität als auch die $\beta 5$ -Untereinheiten-Selektivität von **1** und **2** mit denen ihrer α',β' -Epoxyketon-Vorbilder in In-vitro- IC_{50} -Bestimmungen mit humanem iCP, cCP und yCP (Tabelle 1, Abbildung 4).

Tabelle 1: In-vitro- IC_{50} -Werte [nM] für die ChTL-Aktivität von verschiedenen gereinigten CP-Typen.

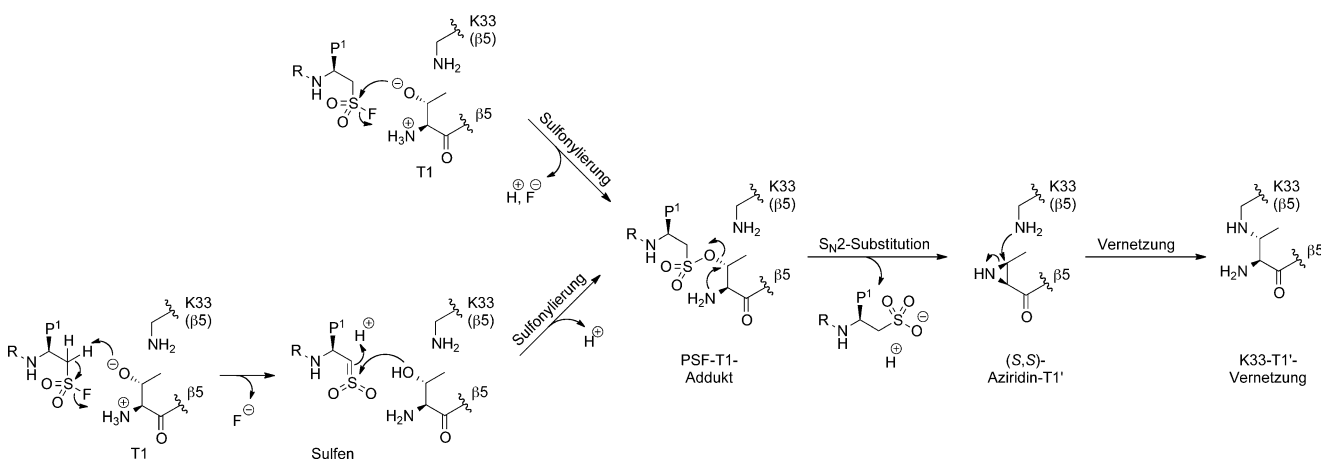
Verbindung	IC_{50} $\gamma\beta 5$	IC_{50} $\beta 5c$	IC_{50} $\beta 5i$	IC_{50} $\beta 5c/\beta 5i$ ^[a]
CFZ	3 ± 1	5 ± 1	21 ± 3	0.2
1	21 ± 2	28 ± 2	54 ± 10	0.5
ONX 0914	145 ± 15	513 ± 30	57 ± 10	9
2	15 420 ± 635	28 460 ± 1305	1134 ± 146	25
3	1775 ± 476	3927 ± 550	139 ± 34	28

[a] Ein hohes $IC_{50}\beta 5c/\beta 5i$ -Verhältnis deutet eine Selektivität für $\beta 5i$ an.

Bemerkenswerterweise erwies sich **2** (IC_{50} $\beta 5c/\beta 5i$: 25) als ungefähr dreimal selektiver für $\beta 5i$ als ONX 0914 (IC_{50} $\beta 5c/\beta 5i$: 9), trotz identischen Peptidrückgrats. Allerdings war die verbesserte $\beta 5i$ -Selektivität von **2** mit einer 20-fach verminderten Bindeaffinität verbunden (IC_{50} ($\beta 5i$): 1,134 nM) gegenüber ONX 0914 (IC_{50} ($\beta 5i$): 57 nM). Dies weist darauf hin, dass PSF-Liganden mindestens als geschützte Tetrapeptide zur ausreichenden Stabilisierung während der proteasomalen Bindung vorliegen müssen. Aus diesem Grund erweiterten wir **2** mit Homophenylalanin in P4, um die Verbindung **3** zu erhalten (Abbildung 1).

Da die S4-Spezifitätstaschen von iCP und cCP einen identischen Aufbau durch die $\beta 6$ -Untereinheit haben, zeigt **3** sowohl für $\beta 5i$ (IC_{50} ($\beta 5i$): 139 nM) als auch für $\beta 5c$ (IC_{50} ($\beta 5c$): 3.927 nM) eine um das Achtfache gesteigerte Bindeaffinität. Verglichen mit **2** wurde ebenfalls die $\beta 5i$ -Selektivität (IC_{50} $\beta 5c/\beta 5i$: 28) erhöht. Dagegen inhibierten **1** und CFZ die $\beta 5$ -Untereinheit aller analysierten CP-Typen im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich ohne Präferenz für $\beta 5i$. Dies legt nahe, dass für die PSF-Kopfgruppe das peptische Rückgrat bei der Bindung in höherem Maße Einfluss nimmt als bei der α',β' -Epoxyketon-Kopfgruppe.

Des Weiteren wurden die In-vitro-Befunde mittels In-vivo- IC_{50} -Bestimmung von **1**, **2** sowie ihrer α',β' -Epoxyketon-Gegenstücke und von **3** in Zellkulturuntersuchungen bestätigt (Tabelle 2, Abbildung 5a). Hierfür verwendeten wir einerseits die THP-1-Zelllinie, abstammend von einer akuten myeloischen Leukämie die sich durch hohe Expressionsraten



Schema 1. Vorgeschlagerener dreistufiger Inhibitionsmechanismus der PSF Verbindungen am proteasomalen, aktiven Zentrum von Untereinheit $\beta 5$. Die Sulfonylierung von Thr1O^Y ist mittels zweier verschiedener Mechanismen denkbar: durch direkten nukleophilen Angriff von Thr1O^Y auf das elektrophile Schwefelzentrum (obere linke Ecke) oder durch Eliminierung und Sulfenbildung (untere linke Ecke). Der Substituent R steht für das restliche peptidische Rückgrat, und P¹ bezeichnet die Aminosäureseitenkette des Inhibitors, die in der S1-Spezifitätstasche stabilisiert wird.

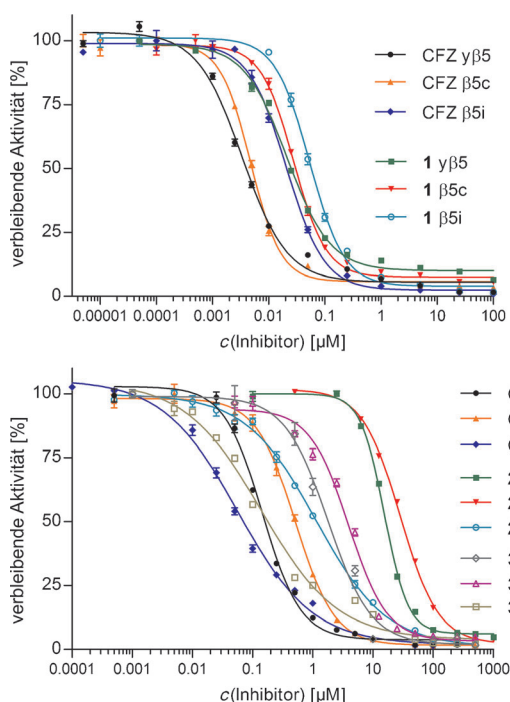


Abbildung 4. In-vitro-IC₅₀-Bestimmung der ChTL-Aktivität von verschiedenen gereinigten CP-Typen nach einstündiger Inkubation mit variierender Konzentration von CFZ und **1** (linker Bereich) sowie ONX 0914, **2** und **3** (rechter Bereich) mittels fluorogenem Substratassay. Daten von drei Wiederholungen wurden auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle normalisiert und sind als relative Aktivität mit Standardabweichung dargestellt (Tabelle 1).

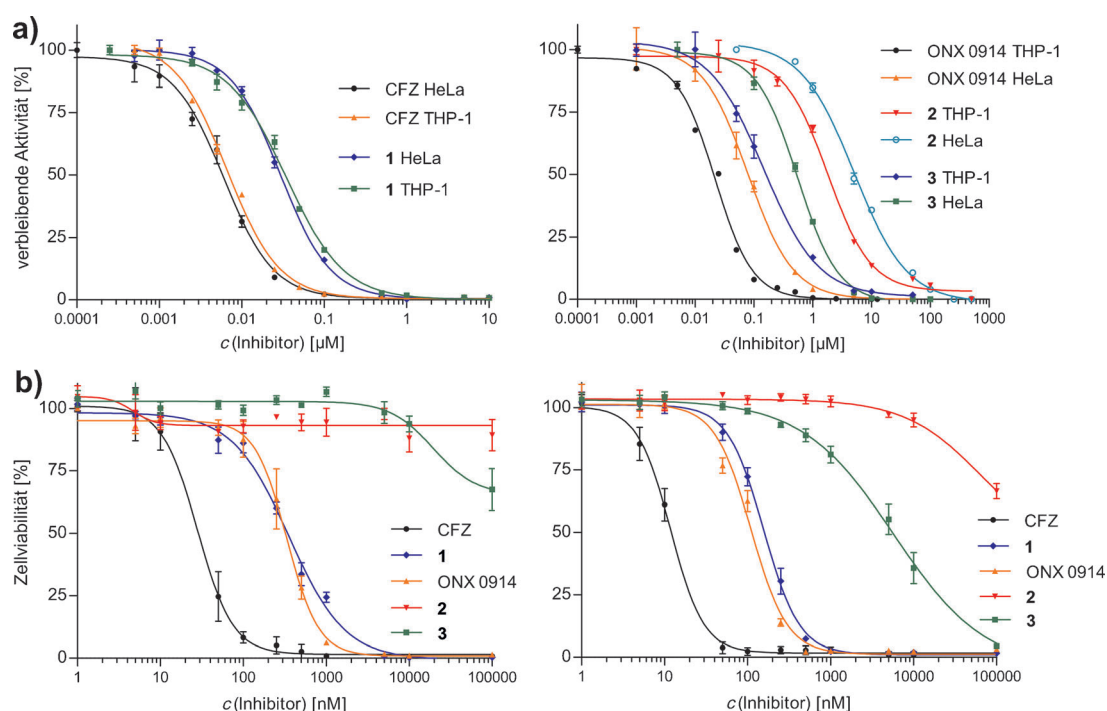


Abbildung 5. a) In-vivo-IC₅₀-Bestimmung der ChTL-Aktivität von HeLa- und THP-1-Zellen nach 105 min Inkubation bei verschiedenen Konzentrationen von CFZ und **1** (linker Bereich) sowie ONX 0914, **2** und **3** (rechter Bereich) mittels luminogenen Substratassay. b) LC₅₀ für HeLa- (linker Bereich) und THP-1-Zellen (rechter Bereich) nach 48 h Inkubation bei Konzentrationen von CFZ, **1**, ONX 0914, **2** und **3** zwischen 1 nM und 100 μM mittels AlamarBlue-basiertem Viabilitätsexperiment. Daten von drei Wiederholungen wurden auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle normalisiert und sind als relative Aktivität mit Standardabweichung dargestellt (Tabelle 2).

von iCP auszeichnet, andererseits HeLa-Zellen, welche primär cCP enthalten.^[21] ONX 0914, **2** und **3** erwiesen sich als drei- bis vierfach selektiver für THP-1-Zellen gegenüber HeLa-Zellen, während **1** und CFZ nahezu gleiche Bindeaffinität gegen beide Zelllinien aufwiesen, was den Ergebnissen der In-vitro-IC₅₀-Untersuchungen entspricht.

Um das Zytotoxizitätsprofil der Verbindungen zu untersuchen, bestimmten wir die LC₅₀ für THP-1- und HeLa-Zellen in Viabilitätsexperimenten (Tabelle 2, Abbildung 5 b). Bemerkenswerterweise hatten **2** und **3** kaum Einfluss auf die Überlebensrate beider Zelllinien, was auf die hohe β5i-Selektivität und geringe unspezifische Proteinbindung zurückführbar sein könnte. Ebenfalls schließen die In-vivo-IC₅₀-Werte von **1** aus (IC₅₀ (THP-1): 35 nM, IC₅₀ (HeLa): 29 nM), dass die geringe Zytotoxizität von einer raschen Hydrolyse der PSF-Kopfgruppe verursacht wird.

Abschließend kann festgestellt werden, dass der Vergleich von iCP-selektiven α',β'-Epoxyketonen mit ihren PSF-Vertretern die Sulfonylfluorid-Kopfgruppe als vielversprechendes Motiv für die adressierte β5i-Inhibition darstellt. Im Unterschied zu allen bisher analysierten CP-Inhibitoren manipulieren die PSFs die proteasomale Aktivität mittels eines bisher unbekannten Inhibitionsmechanismus, der eine Umpolung und intramolekulare Vernetzung des aktiven Zentrums umfasst. Wesentlich in diesem Zusammenhang, und im Unterschied zu dem unspezifischen Serinprotease-Inhibitor PMSF, ist der zusätzliche peptidische Rest an den PSF-Liganden, über den die zielgerichtete Proteasom-Inaktivierung stattfindet. Folglich könnte die spezifische iCP-Hemmung im

Tabelle 2: In-vivo-IC₅₀-Werte [nm] für die ChTL-Aktivität und LC₅₀-Werte [nm] für HeLa- und THP-1-Zellen.

Verbindung	IC ₅₀ HeLa	IC ₅₀ THP-1	LC ₅₀ HeLa	LC ₅₀ THP-1	LC ₅₀ /IC ₅₀ ^[a] HeLa	LC ₅₀ /IC ₅₀ ^[a] THP-1
CFZ	6 ± 1	7 ± 1	28 ± 6	12 ± 1	5	2
1	29 ± 3	35 ± 4	353 ± 63	156 ± 16	12	4
ONX 0914	78 ± 10	22 ± 2	333 ± 48	110 ± 14	4	5
2	5032 ± 577	1789 ± 378	> 100 000	> 100 000	> 19	> 56
3	550 ± 59	146 ± 40	> 100 000	5746 ± 1436	> 182	39

[a] Ein hohes LC₅₀/IC₅₀-Verhältnis deutet auf geringe Zytotoxizität in Relation zum entsprechenden IC₅₀-Wert hin.

nanomolaren Bereich in Verbindung mit geringer Zytotoxizität das therapeutische Fenster von zukünftigen antiinflammatorischen Wirkstoffen erweitern.

Eingegangen am 7. Juli 2014

Online veröffentlicht am 22. September 2014

Stichwörter: Immunoproteasom · Inhibitoren · Peptidische Sulfonylfluoride · Umpolung · Wirkstoff-Design

- [1] P. G. Richardson, T. Hideshima, K. C. Anderson, *Cancer Control* **2003**, *10*, 361–369.
- [2] 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, et al., *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383–6391.
- [3] T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, et al., *Nat. Med.* **2009**, *15*, 781–787.
- [4] M. Basler, S. Mundt, T. Muchamuel, C. Moll, J. Jiang, M. Groettrup, C. J. Kirk, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 226–238.
- [5] F. Parlati, S. J. Lee, M. Aujay, E. Suzuki, K. Levitsky, J. B. Lorens, D. R. Micklem, P. Ruurs, C. Sylvain, Y. Lu, et al., *Blood* **2009**, *114*, 3439–3447.
- [6] D. Niewerth, J. van Meerloo, G. Jansen, Y. G. Assaraf, T. C. Hendrickx, C. J. Kirk, J. L. Anderl, S. Zweegman, G. J. L. Kaspers, J. Cloos, *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 43–51.
- [7] E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8838–8850.
- [8] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.
- [9] L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403–10408.
- [10] A. Rentsch, D. Landsberg, T. Brodmann, L. Bülow, A.-K. Girbig, M. Kalesse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5450–5488; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5560–5599.
- [11] E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738.
- [12] G. de Bruin, E. M. Huber, B.-T. Xin, E. J. van Rooden, K. Al-Ayed, K.-B. Kim, A. F. Kisselev, C. Driessen, M. van der Stelt, G. A. van der Marel, et al., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6197–6209.
- [13] A. V. Singh, M. Bandi, M. A. Aujay, C. J. Kirk, D. E. Hark, N. Raj, D. Chauhan, K. C. Anderson, *Br. J. Haematol.* **2011**, *152*, 155–163.
- [14] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Krüger, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679–1683; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1705–1709.
- [15] M. Screen, M. Britton, S. L. Downey, M. Verdoes, M. J. Voges, A. E. M. Blom, P. P. Geurink, M. D. P. Risseuw, B. I. Florea, W. A. van der Linden, et al., *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40125–40134.
- [16] A. J. Brouwer, A. Jonker, P. Werkhoven, E. Kuo, N. Li, N. Galastegui, J. Kemmink, B. I. Florea, M. Groll, H. S. Overkleeft, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10995–11003.
- [17] R. W. Ashton, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6454–6463.
- [18] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- [19] M. Groll, T. Clausen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 665–673.
- [20] X. E. Hu, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2701–2743.
- [21] D. Niewerth, G. J. L. Kaspers, Y. G. Assaraf, J. van Meerloo, C. J. Kirk, J. Anderl, J. L. Blank, P. M. van de Ven, S. Zweegman, G. Jansen, et al., *J. Hematol. Oncol.* **2014**, *7*, 7.