

Ein minimales β -Lacton-Gerüst für selektive β 5c- oder β 5i-Proteasominhibitoren**

Michael Groll,* Vadim S. Korotkov, Eva M. Huber, Armin de Meijere und Antje Ludwig*

Abstract: Typ-unselektive Proteasominhibitoren werden in der Krebstherapie eingesetzt. Selektive Hemmung des Immunproteasoms könnte dagegen der Therapie von Autoimmunerkrankungen dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden minimale Strukturelemente identifiziert, welche die Selektivität von Inhibitoren für die proteasomalen Untereinheiten β 5c und β 5i bestimmen. Ausgehend von dem Naturstoff Belactosin C wurden zwei β -Lactone synthetisiert, die neben einer Dimethoxybenzyl-Einheit entweder eine Methylpropyl- (Pseudo-Isoleucin) oder eine Isopropyl-P1-Seitenkette (Pseudo-Valin) tragen. Das Isoleucin-Derivat ist gegenüber der β 5i-Untereinheit ($IC_{50} = 14$ nM) sechsfach wirksamer als das Valin-Pendant. Zellkulturexperimente bestätigen die Zellgängigkeit beider Substanzen, und röntgenkristallographische Daten visualisieren die Besetzung der gestrichenen und nichtgestrichenen Substratbindekanäle des Proteasoms. β -Lactone sind somit bestens für die Entwicklung nichtpeptidischer Proteasominhibitoren geeignet.

Das eukaryotische 20S-Proteasom („core particle“, CP) ist eine multikatalytische Protease von 720 kDa, die für den nichtlysosomalen Proteinabbau zuständig ist. Das CP bildet eine Schlüsselkomponente für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, unter anderem für den Zellzyklus und die Immunantwort.^[1] Während Hefe ein 20S-Proteasom (yCP) besitzt, existieren in Vertebraten drei verschiedene CP-Typen, die sich nur in der Zusammensetzung ihrer proteolytisch aktiven Untereinheiten unterscheiden: das konstitutive Proteasom (cCP), das Immunproteasom (iCP) und das Thymusproteasom (tCP).^[2] Die Hydrolyse von Proteinen findet in der

zentralen Kammer der jeweiligen CPs statt, und die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt in allen katalytischen Zentren nach einem allgemeinen Prinzip. Somit sind es die Spezifitätstaschen (S-Taschen) und deren einzigartige chemische Umgebung, die die verschiedenen Substratpräferenzen bestimmen, indem sie mit den Ligandseitenketten (P-Reste) wechselwirken.^[3] Die Zuteilung der Schnittspezifitäten der drei katalytischen Zentren erfolgte basierend auf der bevorzugten P1-Aminosäure chromophorer Testsubstrate. So spaltet β 1 nach sauren (Caspase-ähnlich, C-L), β 2 nach basischen (Trypsin-ähnlich, T-L) und β 5 nach apolaren Resten (Chymotrypsin-ähnlich, ChT-L).^[4]

Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter Expression des iCPs, oder seiner aktiven Untereinheiten β 1i, β 2i und β 5i, und der Entwicklung sowie dem Fortschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen,^[5] Autoimmunerkrankungen^[6] und verschiedenen Krebsarten festgestellt.^[7] Für den β 5i-selektiven peptidischen α' -Epoxyketon-Inhibitor ONX 0914 konnte im Mausmodell eine Unterdrückung autoreaktiver Immunantworten bei rheumatoider Arthritis, Lupus und experimenteller Encephalomyelitis gezeigt werden. Die Wirkung von ONX 0914 beruht dabei auf der verminderten Herstellung von Interleukinen und der reduzierten Freisetzung von Interferon- γ .^[8] Kristallographische Analysen des cCPs und iCPs aus der Maus visualisierten die unterschiedlichen Größen der S1-Taschen in den β 5c- und β 5i-Untereinheiten, die durch eine besondere Ausrichtung von Met45 entstehen und die verstärkte Affinität von ONX 0914 für β 5i bewirken. Aufgrund der Beobachtung, dass die erste Bindung des Liganden an das aktive Zentrum über den P1-Rest erfolgt, wurde vermutet, dass Verbindungen mit großen P1-Seitenketten von β 5i bevorzugt werden, während solche mit kleinen P1-Resten eher für die Untereinheit β 5c geeignet sind.^[9]

Nachfolgende Studien zur Wirkstoffentwicklung konnten bestehende β 5i-Inhibitoren verbessern, indem das P1-Phenylalanin durch einen Cyclohexylrest ersetzt wurde.^[10] Allerdings haben alle diese gegenwärtig verfügbaren Proteasominhibitoren ein peptidisches Grundgerüst, das ausschließlich die durch die Untereinheiten β 5i und β 6 gebildete nichtgestrichene Seite des Substratbindekanals adressieren. Berücksichtigt man, dass die β 6-Untereinheit zwischen cCP und iCP nicht ausgetauscht wird, so hindern vermutlich ausgeprägte Wechselwirkungen eines Liganden mit β 6 seine β 5i-Selektivität. Unser Ziel war es deshalb, kleine nichtpeptidische Proteasominhibitoren zu entwickeln, die sowohl in der gestrichenen als auch der nichtgestrichenen Seite alleinig mit der β 5-Untereinheit wechselwirken. Als Grundgerüst diente das Bisbenzyl-geschützte Homobelactosin C (**1**; Abbil-

[*] Prof. Dr. M. Groll, Dr. V. S. Korotkov, Dr. E. M. Huber
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

Dr. A. Ludwig
Charité Universitätsmedizin Berlin CCM
Medizinische Klinik für Kardiologie und Angiologie
Charitéplatz 1, 10117 Berlin (Deutschland)
E-Mail: antje.ludwig@charite.de

Prof. Dr. A. de Meijere
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (GR1861/10-1, M.G.). Wir danken Astrid König für ihre technische Unterstützung sowie den Mitarbeitern der BW6 am DESY in Hamburg für ihre Hilfe bei der Datenaufnahme.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502931> zu finden.

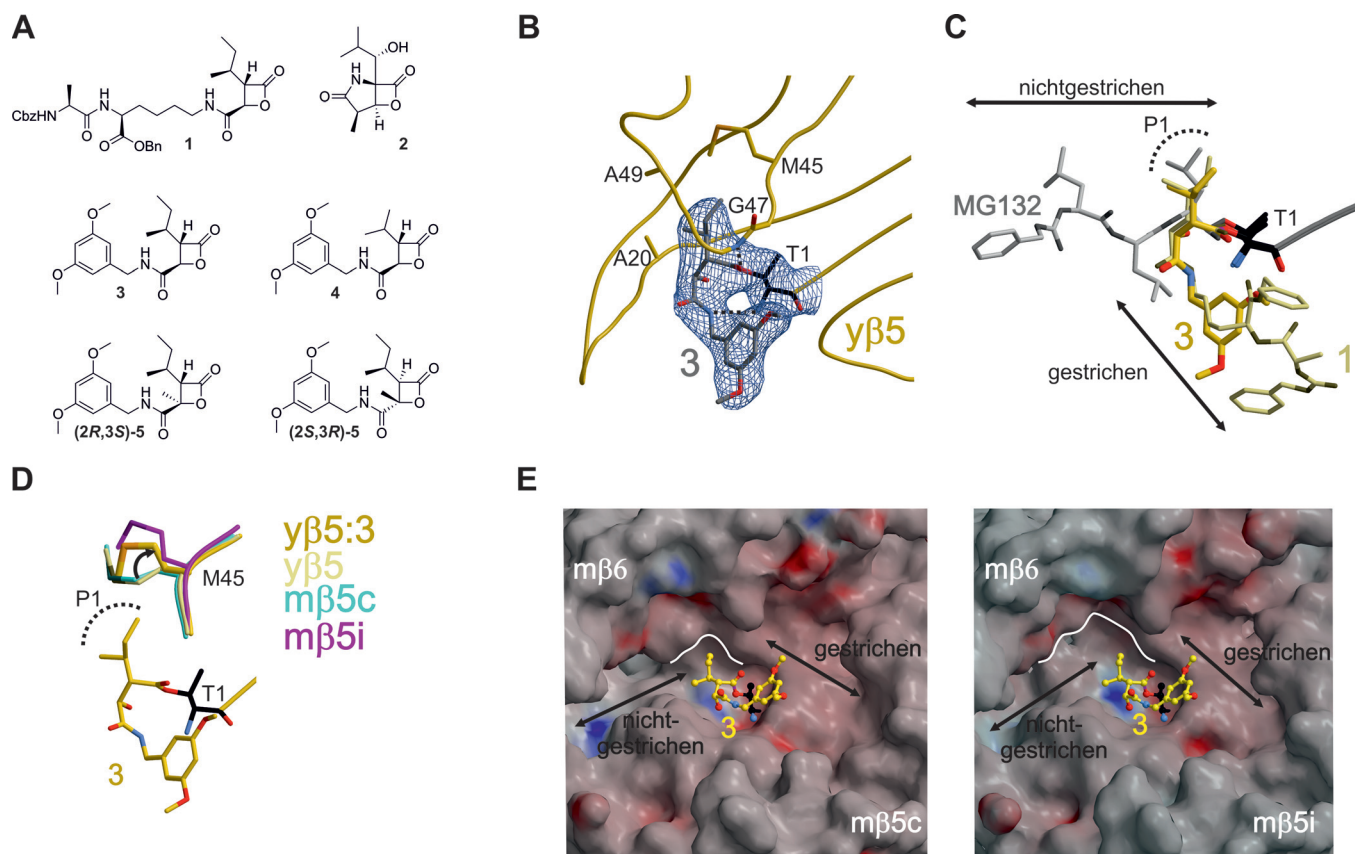


Abbildung 1. A) Strukturformeln für bisbenzyliertes Homobelactosin C (**1**), Omuralid (**2**) und die analysierten β -Lactone **3–5**. B) Kristallstruktur von yCP:3 am $y\beta 5$ -Katalysezentrum (PDB ID 4Z1 L). Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte (blau, Konturierung bei 1σ) ist für **3** und das nukleophile Thr1 gezeigt; gestrichelte Linien markieren die Wasserstoffbrücken zum „Oxyanionen-Loch“ Gly47NH und zu Thr1NH₂. Met45 bildet den Boden der S1-Tasche und bestimmt die Affinität und Spezifität des Inhibitors. C) Die Überlagerung der Strukturen von **1**,^[13] **3** und MG132^[16] gebunden an $y\beta 5$ veranschaulicht, dass die peptidische Verbindung MG132 ausschließlich in die nichtgestrichenen S1- bis S3-Bereiche bindet, während Homobelactosin C (**1**) und seine Derivate (**3**) die S1-Tasche (der P1-Rest des Liganden ist mit einem gestrichelten Halbkreis hervorgehoben) und die gestrichenen Taschen besetzen. D) Die Überlagerung der Strukturen von Hefe- und Maus- $\beta 5$ -Untereinheiten zeigen die unterschiedlichen Konformationen von Met45.^[9] Der schwarze Pfeil markiert die Umlagerung von Met45 während der Bindung von **3** an $y\beta 5$. Der Ile-ähnliche P1-Rest von **3** (angedeutet durch einen gestrichelten Halbkreis) geht hydrophobe Wechselwirkungen mit allen Met45-Konformationen ein und unterscheidet somit nicht zwischen $\beta 5c$ und $\beta 5i$. E) Oberflächendarstellungen der aktiven Zentren von $\beta 5c$ und $\beta 5i$ der Maus, in denen **3** mittels Strukturüberlagerung auf den $y\beta 5:3$ -Komplex modelliert wurde. Das positive und negative elektrostatische Oberflächenpotential ist von -30 kTe^{-1} (rot) bis 30 kTe^{-1} (blau) konturiert. Zur besseren Übersicht wurden die Aminosäuren 47 und 48 der $\beta 5$ -Untereinheit entfernt. Die S1-Taschen sind mit einer weißen Linie markiert, um deren unterschiedliche Größen in $\beta 5c$ und $\beta 5i$ hervorzuheben (siehe auch Abbildung S1C). Es sei angemerkt, dass das Binden der P1-Ile-Seitenkette an $\beta 5c$ die gleiche Konformationsänderung von Met45 erfordert wie für $y\beta 5$, um einen Zusammenstoß zu verhindern.

dung 1A), ein Derivat des natürlichen β -Lactons Belactosin C aus *Streptomyces* sp. UCK14.^[11]

Anders als β -Lacton- γ -Lactam-Inhibitoren, den mikrobiellen Metaboliten Omuralid (clasto-Lactacystin, **2**; Abbildung 1A) mit eingeschlossen,^[4a,12] bindet **1** sogar in Konzentrationen von 20 mM nur an $\beta 5$, wie durch kristallographische Ergebnisse gezeigt.^[13] Bemerkenswerterweise besetzen Belactosin C und seine Derivate im Unterschied zu **2** sowohl die S1-Spezifitätstasche als auch den bislang wenig beachteten gestrichenen Substratbindekanal einschließlich der benachbarten Untereinheit $\beta 4$.^[13,14] Um ausschließlich die Untereinheit $\beta 5$ zu adressieren und Strukturelemente zu finden, die zwischen $\beta 5c$ und $\beta 5i$ unterscheiden, haben wir eine Serie von verschiedenen Belactosin-C-Derivaten analysiert.^[14,15] Hierbei konnte ein minimales Grundgerüst identifiziert werden,

das mit hoher Affinität an die $\beta 5$ -Untereinheit bindet. Dieses ist mit einer *N*-(3,5-Dimethoxybenzyl)aminocarbonyl-Seitenkette an der C2-Position eines (3*S*)-((1*S*)-Methylpropyl)-(Isoleucin-Analogen **3**) oder eines (3*S*)-Isopropyl-4-oxooxetan-(2*R*)-carboxamids ausgestattet (Valin-Analogen **4**; Abbildung 1A).^[15]

Die Kristallstrukturanalyse von **3** im Komplex mit dem yCP wurde nach unseren Standardprotokollen durchgeführt^[17] und hat Strukturdaten bis zu einer Auflösung von 3.0 Å mit einem R_{free} von 22.9% ergeben (siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Aufgrund der hohen Ligandkonzentration, in die die Kristalle eingelegt wurden, zeigt die Elektronendichtekarte den Inhibitor kovalent an das N-terminale Thr1O^γ von allen aktiven Untereinheiten gebunden (Abbildungen 1B und S1A). Eine Überlagerung der

Strukturen von **3** gebunden an γ 1, γ 2 und γ 5 veranschaulicht, dass die Verbindung in jedem der Substratbindekanäle die gleiche Orientierung einnimmt (Abbildung S1B): Die Isoleucin-P1-Seitenkette ragt in die S1-Spezifitätstasche und verursacht eine Verschiebung von Met45 um 1 Å, wohingegen die C2-OH-Gruppe des Liganden, erzeugt durch den nukleophilen Angriff von Thr10^Y auf den β -Lacton-Ring, analog zu Homobelactosin C eine starke Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure 19 (2.7 Å) bildet.^[13,18] Die 3,5-Dimethoxybenzyl-Gruppe zeigt in den gestrichenen Substratbindekanal und wird nur über hydrophobe Wechselwirkungen mit den C ^{α} - und C ^{β} -Atomen von Ser129 stabilisiert, einem strikt konservierten und für die Katalyse essenziellen Rest.^[13] Die kristallographische Untersuchung von **3** gibt erstmals Einblicke in den gestrichenen Substratbindekanal der C-L- und T-L-Aktivitäten. Der identische Bindemodus von **3** für alle drei katalytischen Zentren offenbart, dass die Untereinheitenselektivität von Verbindungen vornehmlich auf deren Wechselwirkungen mit den individuell ausgeprägten gestrichenen und nichtgestrichenen Bindetaschen beruht. Das beschriebene minimale Grundgerüst, das nötig ist, um Liganden in die gestrichene Seite aller aktiven β -Untereinheiten zu orientieren, ist nun zugänglich für zukünftige Modifikationen mittels kombinatorischer Chemie zur Herstellung von Untereinheiten-selektiven Verbindungen.

Im Folgenden haben wir die Belactosin-Derivate **3** und **4**, die sich lediglich in einer einzelnen P1-Methylgruppe unterscheiden, bezüglich ihrer Hemmstärke für das humane cCP und iCP untersucht. Die Verbindungen **3** und **4** inhibieren aufgrund ihres unpolaren Charakters dosisabhängig die ChT-L-Aktivität von β 5c und β 5i (Abbildung 2A). Obwohl beide Substanzen keine P2-, P3- und P4-Reste tragen, sind sie ä-

berst effektiv. Die IC₅₀-Werte von **3** für β 5c (21.35 nM) und β 5i (14.37 nM) sind einander ähnlich, wohingegen **4** selektiver für β 5c (26.87 nM) als für β 5i (83.62 nM) ist. Somit ist eine einzelne P1-Methylgruppe, die **3** von **4** unterscheidet, für die Untereinheitenselektivität ausschlaggebend. Des Weiteren haben wir Inhibitionsstudien mit Lysaten von HUVEC (humane Nabelschnur-Endothelzellen, die überwiegend cCP enthalten) und THP-1-Zellen (eine humane monozytäre Leukämie-Zelllinie, die vorwiegend iCP enthält) durchgeführt. Diese bestätigen, dass ansteigende Dosen von **3** die ChT-L-Aktivität in beiden Zelltypen gleichermaßen inhibieren, während **4** eine erhöhte Wirksamkeit im HUVEC-Lysat zeigt (Abbildung 2B). Obwohl die beiden untersuchten P1-Reste sowohl in β 5c als auch in β 5i binden, belegen die Ergebnisse, dass die ChT-L-Aktivität von β 5i verglichen mit β 5c geräumigere Aminosäuren den kleineren, wie Val, vorzieht.^[9] Die besondere Konformation von Met45 in der Untereinheit β 5i vergrößert deren S1-Tasche und kann die kleinere P1-Val-Seitenkette von **4** über Van-der-Waals-Kontakte weniger gut stabilisieren (Abbildung 1D und E).

Als nächstes haben wir den Einfluss von **3** und **4** auf die Proteasomaktivität in lebenden Säugerzellen untersucht. HeLa-Zellen wurden 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von **3**, **4** und dem Standardproteasominhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) behandelt; DMSO wurde als Kontrolle für den Einfluss des Lösungsmittels verwendet (siehe die Hintergrundinformationen). In-vitro-Aktivitätstests in den Zell-Lysaten ergaben, dass **3** und **4** dosisabhängig den proteasomalen Proteinabbau hemmen und dabei hauptsächlich die ChT-L-Aktivität beeinflussen (Abbildung 3A). Wie erwartet führt die Inhibition des CP zur Blockade der gesamten Proteasomfunktion, was in der Anhäufung ubiquitinerter Proteine (Abbildung 3B, unten) sowie eines destabi-

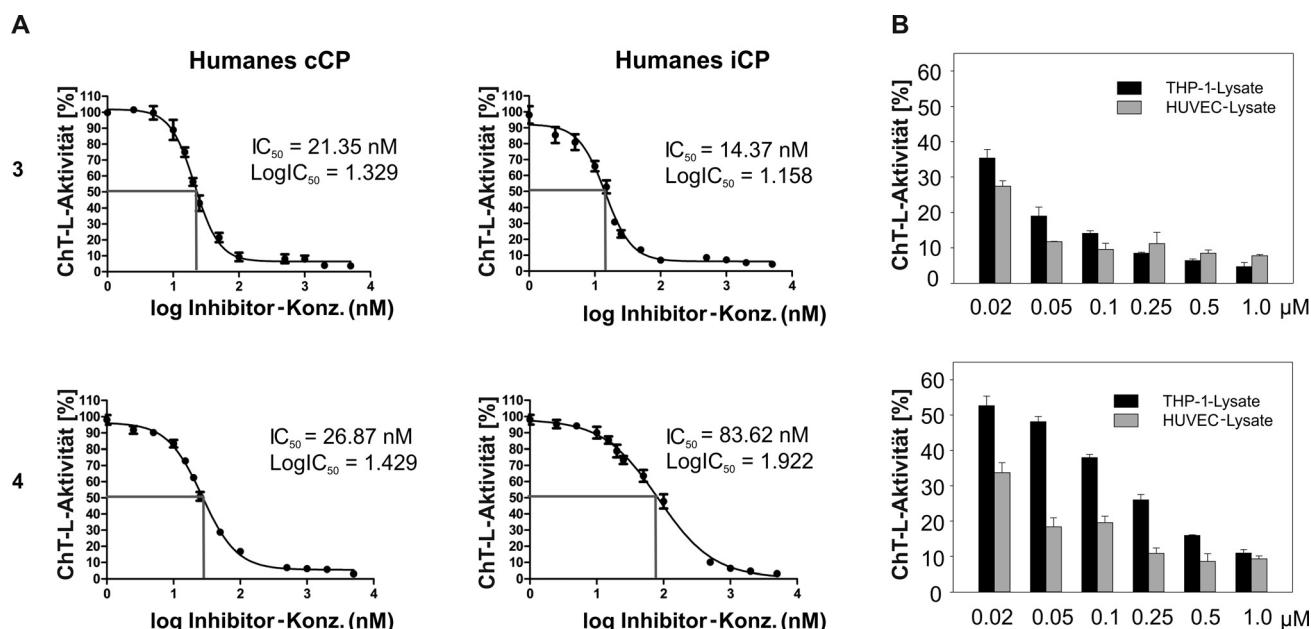


Abbildung 2. A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der von **3** und **4** vermittelten Hemmung der ChT-L-Aktivitäten des humanen cCPs und iCPs. Die experimentellen Werte wurden dreifach bestimmt und auf eine DMSO behandelte Kontrolle normalisiert. B) Inhibitionsprofil von **3** und **4** in den Lysaten von HUVEC (cCP) und monozytären THP-1 Zellen (überwiegend iCP). In den Abbildungen **A** und **B** ist die Restaktivität als Mittelwert in Prozent \pm Standardfehler (SF) angegeben.

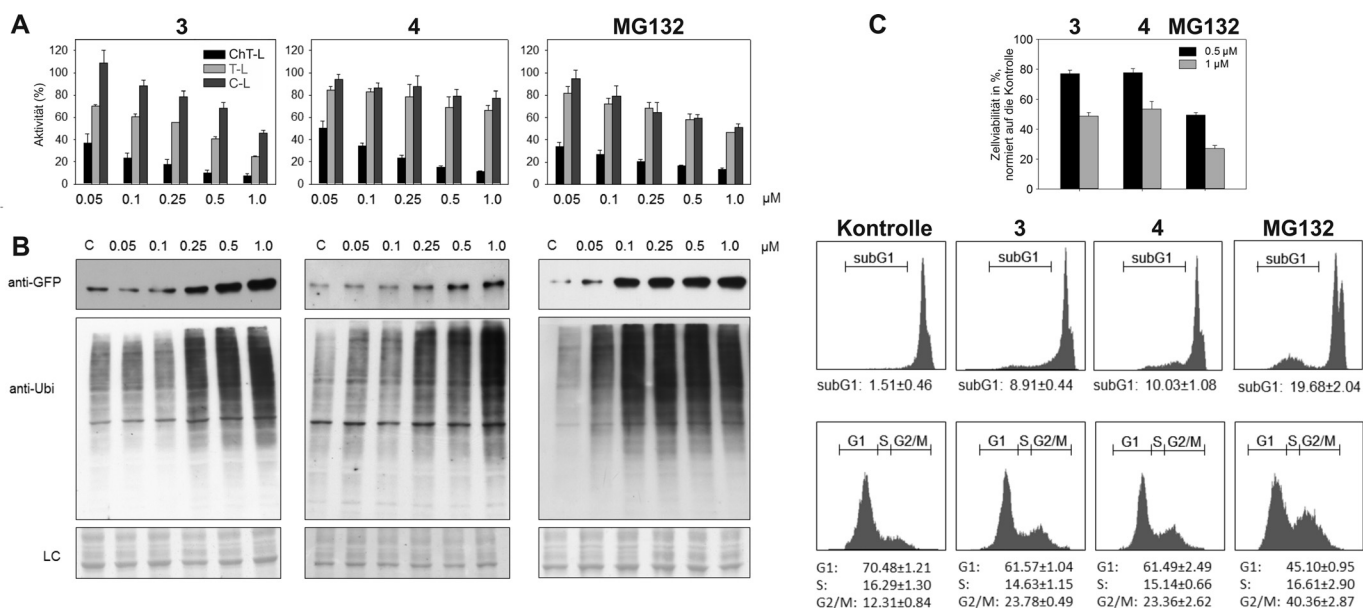


Abbildung 3. A) Hemmung der ChT-L, T-L und C-L-Aktivitäten durch **3** und **4** im Vergleich zu MG132 in HeLa-Zellen. Die relativen Aktivitäten sind in Prozentzahlen ausgedrückt und auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle normiert. B) Ubiquitin^{76V}-GFP1 in Ohrenfibroblasten transgener Mäuse und Proteine mit Ubiquitinketten häufen sich in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von **3**, **4** und MG132 im Vergleich zu DMSO (C) deutlich an. Der Western-Blot wurde mit Anti-GFP- und Anti-Ubiquitin(anti-Ubi)-Antikörpern angefärbt. Die gleiche Proteinbeladung (LC) in allen Spuren wurde mittels Amidoschwarz-Färbung der Western-Blot-Membranen überprüft. C) Die Lebensfähigkeit von HeLa-Zellen in Gegenwart von **3**, **4** und MG132 wurde mit einem MTT-Testverfahren bestimmt. Änderungen im Zellzyklus (Zahl der Zellen in den G1-, S- und G2/M-Phasen) sowie apoptotische Zellen (Zahl der Zellen in Sub-G1) wurden durch eine durchflusszytometrische Analyse des DNS-Gehalts ermittelt und auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle normiert. Die in Abbildungen (A) und (C) angegebenen Mittelwerte \pm SF wurden aus drei unabhängigen Experimenten erhalten.

bilisierten GFP-Reporterproteins in Ohrenfibroblasten einer Ubiquitin^{76V}-GFP1-Maus resultiert (Abbildung 3B, oben). Deshalb haben wir die Zytotoxizität der Verbindungen quantifiziert, indem wir HeLa-Zellen mit jeweils 500 nm und 1 μ M von **3** und **4** in einem MTT-Zellproliferations-Assay für 24 Stunden inkubierten (MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Überraschenderweise war die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Verabreichung von **3** und **4** doppelt so hoch wie mit dem Standardproteasominhibitor MG132 (Abbildung 3C), eine signifikante und wichtige Eigenschaft für die zukünftige Entwicklung von CP-Typ-selektiven Medikamenten für nichtonkologische Anwendungsbereiche wie chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen.

Des Weiteren haben wir eine durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen durchgeführt, die zuvor für 24 Stunden mit 500 nm der entsprechen Verbindungen inkubiert worden sind (siehe die Hintergrundinformationen). Ausgeprägte Sub-G1-Werte (apoptotischen Zellen entsprechend) wurden nach einer Behandlung mit **3** ($8.91 \pm 0.44\%$ aller Zellen), **4** ($10.03 \pm 1.08\%$) und MG132 ($19.68 \pm 2.04\%$) beobachtet. Die erhöhte Zahl an Zellen in der G2/M-Phase zeigt, dass beide Verbindungen einen Zellzyklusarrest in HeLa-Zellen verursachen (Kontrollwert: $12.31 \pm 0.84\%$, **3**: $23.78 \pm 0.49\%$ und **4**: $23.36 \pm 2.62\%$ von allen nichtapoptotischen Zellen), obgleich viel weniger ausgeprägt als bei MG132 ($40.36 \pm 2.87\%$). Zusätzlich zu **3** und **4** haben wir die β -Lactone (2R,3S)-**5** und (2S,3R)-**5**^[14,15] in unseren biologischen Testverfahren untersucht. Beide Substanzen tragen

eine weitere Methylgruppe an der C2-Position von Verbindung **3**, die sich von dem Naturstoff Salinosporamid A (Marizomib) ableitet.^[19] Salinosporamid A ist ein Proteasominhibitor der zweiten Generation, der sich gegenwärtig in klinischer Phase befindet. Erstaunlicherweise zeigten die Diastereomere (2R,3S)-**5** und (2S,3R)-**5** keine Hemmung des Proteasoms in HeLa-Zellen und waren in den MTT-Untersuchungen inaktiv (Abbildung S2). Diese Ergebnisse belegen die Zuverlässigkeit der vorgestellten Messwerte und verdeutlichen, dass eine einzelne Methylgruppe nicht nur entscheidend für die Untereinheitenselektivität sondern auch für die gesamte biologische Aktivität einer Verbindung sein kann.

Zusammenfassend konnten in dieser Studie kleinstmögliche Strukturelemente identifiziert werden, die eine Unterscheidung zwischen β 5c und β 5i zulassen. Aufbauend auf dem β -Lacton-Grundgerüst, einem rationalen Motiv für die Inhibition des Proteasoms, synthetisierten wir Belactosin-Derivate mit Valin- und Isoleucin-ähnlichen P1-Seitenketten, die eine ausgezeichnete Wirksamkeit im niederen nanomolaren Bereich aufweisen. Wir konnten zeigen, dass eine einzelne P1-Methylgruppe einen sechsfachen Unterschied in der Hemmstärke für β 5i bewirkt. Somit kann die selektive Inhibition alleinig über Modifizierung des P1-Rests erreicht werden, ein Ergebnis von zentralem Interesse für die Entwicklung von zukünftigen Proteasomhemmstoffen. Des Weiteren eignen sich die hier untersuchten β -Lactone als vielversprechendes Leitstrukturmotiv für Anwendungen bei chronischen Entzündungskrankheiten, da sie eine geringere

Zytotoxizität aufweisen als gegenwärtig verabreichte peptidische Proteasominhibitoren. Insbesondere die Derivatisierung der Dimethoxybenzyl-Seitenkette eröffnet eine ausgezeichnete Möglichkeit, das Grundgerüst im Hinblick auf die bislang wenig beachteten gestrichenen Bindekanäle der Untereinheiten $\beta 5c$ und $\beta 5i$, sowie der anderen proteasomalen Aktivitätszentren zu erweitern.

Stichwörter: Immunproteasom · Inhibitoren · Leitstruktur · Zytotoxizität · β -Lactone

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7810–7814
Angew. Chem. **2015**, *127*, 7921–7925

- [1] E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8838–8850.
- [2] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, *316*, 1349–1353.
- [3] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717.
- [4] a) M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471; b) M. Orlowski, C. Cardozo, C. Michaud, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1563–1572.
- [5] a) M. Mishto, E. Bellavista, A. Santoro, A. Stolzing, C. Ligorio, B. Nacmias, L. Spazzafumo, M. Chiappelli, F. Licastro, S. Sorbi, A. Pession, T. Ohm, T. Grune, C. Franceschi, *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 54–66; b) M. Diaz-Hernandez, F. Hernandez, E. Martin-Aparicio, P. Gomez-Ramos, M. A. Moran, J. G. Castano, I. Ferrer, J. Avila, J. J. Lucas, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 11653–11661.
- [6] a) A. Visekruna, N. Slavova, S. Dullat, J. Grone, A. J. Kroesen, J. P. Ritz, H. J. Buhr, U. Steinhoff, *Int. J. Colorectal. Dis.* **2009**, *24*, 1133–1139; b) L. R. Fitzpatrick, V. Khare, J. S. Small, W. A. Koltun, *Dig. Dis. Sci.* **2006**, *51*, 1269–1276.
- [7] Y. K. Ho, P. Bargagna-Mohan, M. Wehenkel, R. Mohan, K. B. Kim, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 419–430.
- [8] a) T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 781–787; b) M. Basler, S. Mundt, T. Muchamuel, C. Moll, J. Jiang, M. Groettrup, C. J. Kirk, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 226–238; c) H. T. Ichikawa, T. Conley, T. Muchamuel, J. Jiang, S. Lee, T. Owen, J. Barnard, S. Nevarez, B. I. Goldman, C. J. Kirk, R. J. Looney, J. H. Anolik, *Arthritis Rheum.* **2011**, *64*, 493–503.
- [9] E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738.
- [10] 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, M. Groll, H. S. Overkleeft, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6197–6209.
- [11] a) A. Asai, A. Hasegawa, K. Ochiai, Y. Yamashita, T. Mizukami, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 81–83; b) O. V. Larionov, A. de Meijere, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2153–2156.
- [12] a) G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 726–731; b) M. Groll, E. P. Balskus, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14981–14983; c) A. List, E. Zeiler, N. Gallastegui, M. Rusch, C. Hedberg, S. A. Sieber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 571–574; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 582–585.
- [13] M. Groll, O. V. Larionov, R. Huber, A. de Meijere, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4576–4579.
- [14] V. S. Korotkov, A. Ludwig, O. V. Larionov, A. V. Lygin, M. Groll, A. de Meijere, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7791–7798.
- [15] A. de Meijere, V. S. Korotkov, A. V. Lygin, O. V. Larionov, V. V. Sokolov, T. Graef, M. Es-Sayed, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6363–6374.
- [16] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Kruger, B. Schmidt, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679–1683; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1705–1709.
- [17] N. Gallastegui, M. Groll, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *832*, 373–390.
- [18] S. Kawamura, Y. Unno, A. List, A. Mizuno, M. Tanaka, T. Sasaki, M. Arisawa, A. Asai, M. Groll, S. Shuto, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3689–3700.
- [19] a) M. Groll, B. C. Potts, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2850–2878; b) M. Groll, R. Huber, B. C. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136–5141.

Eingegangen am 30. März 2015
Online veröffentlicht am 14. Mai 2015