

Selektive Hemmung des Immunproteasoms durch strukturbasierte Wahl eines nichtkatalytischen Cysteins als Angriffspunkt

Christian Dubiella,* Regina Baur, Haissi Cui, Eva M. Huber und Michael Groll*

Professor Luis Moroder zum 75. Geburtstag gewidmet

Abstract: Klinisch genutzte Proteasominhibitoren induzieren Zelltod durch die gleichzeitige Blockade des konstitutiven Proteasoms und des Immunproteasoms. Dagegen ist die selektive Hemmung des Immunproteasoms kaum zytotoxisch, und sie könnte Anwendung in der Modulation von chronischen Entzündungen und Autoimmunkrankheiten finden. Es wurden decarboxylierte Peptide entwickelt, die mittels eines α -Chloracetamides in einer Seitengruppe gezielt ein nichtkatalytisches Cystein in der β 5i-Untereinheit des Immunproteasoms angreifen. Die so gesteigerte Isoformspezifität resultierte in verminderten zytotoxischen Nebenwirkungen und reduzierte die Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Strukturbasierte Optimierung führte zu einer über 150-fachen Selektivität für die Untereinheit β 5i gegenüber β 5c. Diese neue Verbindungsklasse bietet einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung von potenziell antiinflammatorischen Inhibitoren, die selektiv das Immunproteasom hemmen.

Das katalytisch aktive Kernpartikel des Proteasoms („core particle“, CP) baut einen Großteil der intrazellulären Proteine ab und ist essenziell für Zellfunktion und -überleben.^[1] Das konstitutive Proteasom (cCP) wird als der zentrale proteolytisch aktive Komplex ubiquitär exprimiert, während die immunmodulatorische Isoform, das Immunproteasom (iCP), vor allem in Zellen des Immunsystems gefunden wird.^[2] Bei Entzündungszuständen beeinflussen iCPs die Produktion von Zytokinen, verändern die Antigen-Prozessierung und fördern dadurch die Immunantwort.^[2] Die von der FDA zugelassenen CP-Inhibitoren Bortezomib und Carfilzomib (CFZ) hemmen gleichermaßen die katalytisch aktive β 5-Untereinheit des cCPs (β 5c) und des iCPs (β 5i/LMP7).^[3] Diese simultane Inhibition von β 5c und β 5i oder die zusätzliche Hemmung von anderen Untereinheiten (β 1i/LMP2, β 1c, β 2i/MECL1, β 2c) ist stark zytotoxisch, was die klinische Nutzung der beiden Medikamente auf Blutkrebs beschränkt.^[4] Dagegen blockiert der Wirkstoff ONX 0914 (PR-957) bevorzugt β 5i und induziert keinen Zelltod. Interessanterweise ist die Inhibition von β 5i alleine ausreichend, um die Progression von multipler Sklerose und rheumatoide Arthritis im Mausmodell zu verlang-

samen.^[5,6] Entsprechend stellt die Untereinheit β 5i des Immunproteasoms ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für Autoimmunerkrankungen und chronische Entzündungs-krankheiten dar.^[7]

ONX 0914 weist durch sein optimiertes Peptidrückgrat eine etwa zehnfache Präferenz für β 5i gegenüber β 5c auf.^[5] Dabei wird durch das Epoxyketon-Elektrophil, das irreversibel mit dem nukleophilen Thr1 im aktiven Zentrum des Proteasoms reagiert, Bindeaffinität gewonnen (Schema S1).^[8] Allerdings können reaktive C-terminale Kopfgruppen potenziell auch β 5c inhibieren, da der Mechanismus der Proteolyse für alle aktiven Zentren identisch ist. Mit dem Ziel, neue Angriffspunkte abseits des aktiven Zentrums zu finden, nutzten wir bekannte Kristallstrukturen für die Entwicklung von β 5i-spezifischen Inhibitoren ohne C-terminale Kopfgruppe. Um dennoch eine kovalente Bindung und Verankerung der Verbindung im Proteasom zu erreichen, diente ein nichtkatalytisches Cystein als Angriffspunkt. Das gleiche Konzept wurde bereits erfolgreich für das Design von Inhibitoren gegen verschiedene Kininasen,^[9] G-Proteine^[10] und die $\gamma\beta$ 2-Untereinheit des Hefeproteasoms ($\gamma\beta$ 2P)^[11] genutzt. Wir identifizierten durch Überlagerung der Untereinheiten m β 5c und m β 5i sowie durch Sequenzabgleiche Cys48 als streng konserviertes Nukleophil, das ausschließlich in β 5i gefunden wird (Abbildung 1).^[8]

Cys48 trägt zur Bildung der S2- und S4-Substratbindetaschen in β 5i bei und ist am positiv geladenen Ende eines α -Helix-Dipols lokalisiert, was vermutlich den pK_a -Wert der Thiolgruppe senkt und ihre Nukleophilie erhöht. Eine Überlagerung der vorhandenen Kristallstrukturen deutet an, dass dieses Cystein über die P4-Seitenkette eines Tetrapeptides zugänglich ist (Abbildung 1). Deswegen begannen wir unser Inhibitordesign mit dem Austausch des P4-Restes von CFZ gegen L-2,3-Diaminopropansäure (Dap), das den sterischen Anforderungen von S4 genügt (Abbildung 2). Aufgrund seiner Aminofunktion können Elektrophile im letzten Syntheseschritt an das decarboxylierte Peptid angebracht werden. Das von CFZ-abgeleitete Peptidrückgrat wurde durch Fmoc-basierte Festphasensynthese hergestellt und ist C-terminal durch das bereits beschriebene 4-Methylbenzylamin geschützt.^[13,14]

Geeignete Elektrophile wurden kovalent über die jeweiligen Säurechloride, N-Hydroxysuccinimidester oder Carbonsäuren mittels Amidkupplungen in der Seitenkette verankert. Die hier verwendeten Elektrophile eignen sich besonders gut, um das relativ weiche Thiolnukleophil anzureißen (**1-CA**, **1-FA**, **1-AA**, **1-VS**, **1-EO**, **1-AZ**; Abbil-

[*] C. Dubiella, R. Baur, H. Cui, Dr. E. M. Huber, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Fakultät für Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: christian.dubiella@mytum.de
michael.groll@tum.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506631> zu finden.

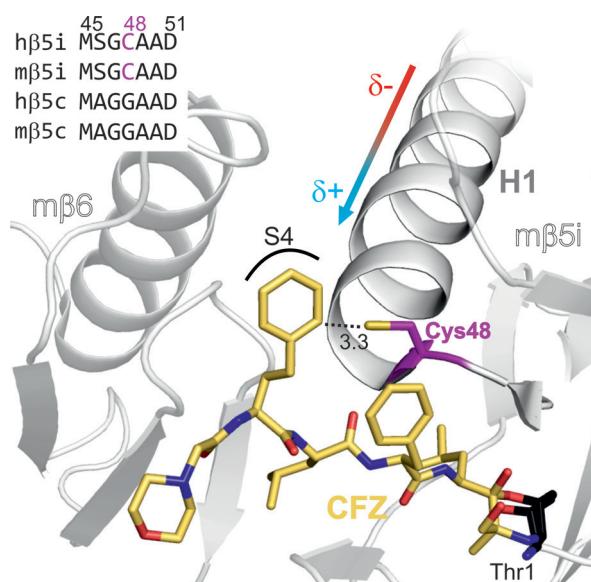
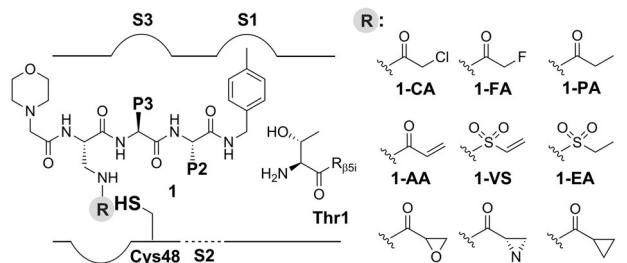


Abbildung 1. Überlagerung der Strukturen der murinen Untereinheiten m β 5i und m β 6 (PDB ID: 3UNH)^[8] mit der Untereinheit β 5 von yCP (PDB ID: 4QW4).^[12] CFZ (gelb) ist an Thr1 (schwarz) gebunden. Das Homophenylalanin von CFZ in P4 besetzt die Bindetasche S4 und ist nahe Cys48 (magenta, 3.3 Å) von m β 5i positioniert. Das positiv geladene N-terminale Ende des α -Helix-Dipols H1 zeigt auf Cys48. Der Sequenzabgleich von β 5i und β 5c hebt Cys48 hervor (h=human, m=murine; obere linke Ecke).

dung 2).^[9] Als Kontrolle wurden die jeweiligen nichtreaktiven Kongener **1-PA**, **1-EA** und **1-CP** genutzt (Abbildung 2).

Erste inhibitorische Studien mit humanem iCP und cCP zeigten, dass Sulfonamide (**1-VS**, **1-EA**) leicht selektiv für β 5c waren, während über Amidfunktionen verknüpfte Elektrophile β 5i präferierten (**1-CA**, **1-FA**, **1-AA**, **1-EO**, **1-AZ**, Tabelle ST1, Abbildung S1). Das wirksamste hier getestete Elektrophil war **1-CA**, das eine starke Aktivität gegenüber β 5i aufwies ($IC_{50}=1.24 \mu\text{M}$, Abbildung 2). Dieses Ergebnis stimmt mit Studien überein, die α -Chloracetamide für Inhibitoren mit nichtkatalytischen Cysteinen als Angriffspunkt vorschlagen.^[10,15] Trotz des unselektiven Peptidrückgrates von **1-CA** fanden wir bereits eine neunfache Präferenz für β 5i (β 5c/ β 5i = 9), was mit ONX 0914 (β 5c/ β 5i ≈ 10) vergleichbar ist.^[5] Hervorzuheben ist weiterhin, dass **1-CA** inaktiv gegen die Untereinheiten β 1c, β 1i, β 2c und β 2i war ($IC_{50}>100 \mu\text{M}$, Tabelle ST2). Das stabilere **1-FA** sowie das nichtreaktive Kongener **1-PA** waren deutlich schlechter als **1-CA** und blockierten die Aktivitäten von β 5i ($IC_{50}=36.25 \mu\text{M}$ bzw. $24.23 \mu\text{M}$) und β 5c ($IC_{50}=43.84 \mu\text{M}$ bzw. $29.05 \mu\text{M}$) gleichermaßen (β 5c/ β 5i = 1.2, Abbildung 2, Tabelle ST1). Die Bindeaffinität gegenüber β 5i scheint also auf der Bildung eines kovalenten Thioethers zwischen dem α -Chloracetamid-Elektrophil und Cys48 zu basieren (Schema S2).

Als nächstes versuchten wir, den kovalenten Bindemodus von **1-CA** mittels Röntgenstrukturanalyse zu bestätigen. Da iCPs aus Säugern nur schwierig kristallisierbar sind, stellten wir die S4-Bindetasche der β 5i-Untereinheit durch den Austausch von Gly48 zu Cys48 in der Untereinheit y β 5 des Hebefroteasoms nach. Hierfür nutzten wir die Methode des „Plasmid shuffling“ (Abbildung S3a). Nach anschließender



Verbindung	P3	P2	$IC_{50} \beta 5i [\mu\text{M}]$	$IC_{50} \beta 5c [\mu\text{M}]$	$IC_{50} \beta 5c/\beta 5i^{[a]}$
1-CA			1.24 ± 0.35	11.24 ± 2.59	9
1-PA			24.23 ± 3.50	29.05 ± 8.85	1.2
2-CA			6.65 ± 0.27	> 500	> 75
3-CA			2.53 ± 0.56	18.27 ± 5.58	7
4-CA			0.64 ± 0.14	> 100	> 150

Abbildung 2. Schema des Substratbindekanals von β 5i mit den Spezifitätstaschen S1–S4 und Cys48 (unterstrichen). Das von CFZ-abgeleitete decarboxyierte Peptid 1 enthält jeweils ein anderes Elektrophil an der P4-Seitenkette (R, grau hinterlegt): α -Chloracetamid (**1-CA**), α -Fluoracetamid (**1-FA**), Acrylamid (**1-AA**), Vinylsulfonamid (**1-VS**), Epoxid (**1-EO**) oder Aziridin (**1-AZ**). Die entsprechenden nichtreaktiven Kontrollen sind: Propionamid (**1-PA**), Ethansulfonamid (**1-EA**) oder Cyclopropanamid (**1-CP**). Eine vollständige Liste aller Verbindungen einschließlich der IC_{50} -Werte ist in den Hintergrundinformationen zu finden (Tabelle ST1–3). Der untere Abschnitt zeigt die α -Chloracetamide **1-CA** bis **4-CA** mit den entsprechenden P2- und P3-Resten und die Kontrolle **1-PA**. In-vitro- IC_{50} -Werte wurden mit humanem iCP oder cCP ermittelt. [a] Ein hohes $IC_{50} \beta 5c/\beta 5i$ -Verhältnis weist auf eine hohe Selektivität gegenüber β 5i hin.

Kristallisation und Strukturaufklärung (2.8 Å Auflösung, $R_{\text{free}}=20.1\%$, PDB-ID: 5CGF; Tabelle ST4) stellte sich heraus, dass Cys48 in der y β 5G48C-Mutante die gleiche Orientierung einnimmt wie in murinem iCP. Zusätzlich bestätigte eine y β 5G48C:ONX 0914-Komplexstruktur (2.8 Å Auflösung, $R_{\text{free}}=20.6\%$, PDB-ID: 5CGI) die Eignung unseres Modells, da die Konformation des Liganden analog zu der in m β 5i war (Abbildung S4, S5). Schließlich konnten wir durch Inkubation („soaking“) der y β 5G48C-yCP-Kristalle mit **1-CA** gefolgt von Röntgenstrukturanalyse (2.9 Å Auflösung, $R_{\text{free}}=23.1\%$, PDB-ID: 5CGG) zeigen, dass die Bindung von **1-CA** ausschließlich an die modifizierte y β 5-Untereinheit erfolgte. **1-CA** bildet ein antiparalleles β -Faltblatt im Substratbindekanal, analog zu bereits beschriebenen decarboxylierten Peptiden.^[13,14] Bemerkenswerterweise war anhand der Elektronendichte erkennbar, dass die P4-Seitenkette von **1-CA** durchgängig mit der Thiolgruppe des eingebrachten Cys48 über die Acetamid-Funktion verbunden ist (Abbildung 3a). Diese Verbrückung bestätigt den kovalenten Bindemodus und erklärt die neunfache Selektivität von **1-CA** für β 5i. Dagegen hatten Wildtyp-yCP-Kristalle, deren y β 5-

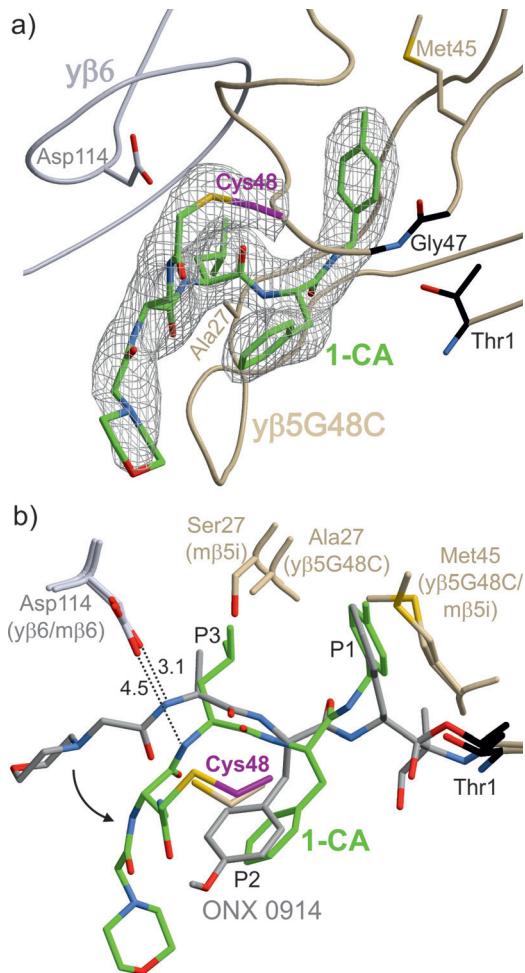


Abbildung 3. Röntgenstrukturbasierte Analyse der Bindung von **1-CA** an die $\gamma\beta 5G48C$ Mutante (PDB ID: 5CGG). a) Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (graues Gitter, konturiert bei 1σ , 2.9 \AA Auflösung) zeigt **1-CA** (grün) gebunden an Cys48 (magenta) in der Untereinheit $\gamma\beta 5G48C$ (beige) mit Thr1 im aktiven Zentrum (schwarz). Außerdem hervorgehoben sind das Amid von Gly47 (schwarz) im Oxyanion-Loch und Asp114 von $\gamma\beta 6$ (grau). b) Überlagerung der Strukturen von **1-CA** (grün) und ONX 0914 (grau) gebunden an $\gamma\beta 5G48C$ beziehungsweise $m\beta 5i$ (PDB ID: 3UNF). Die P1- bis P3-Positionen des Liganden und die Reste der Untereinheiten $\gamma\beta 5$ und $m\beta 5i$ (beige) sowie $\gamma\beta 6$ und $m\beta 6$ (grau) sind zusammen mit Abständen in \AA dargestellt (schwarze, gestrichelte Linien). Die Verschiebung von **1-CA** im Vergleich zu ONX 0914 wird durch einen schwarzen Pfeil angezeigt.

Untereinheit humanem $\beta 5c$ ähneln, nach Inkubation mit **1-CA** leere Substratbindekanäle. Das Ergebnis betont somit die Bedeutung von Cys48 für den Wirkmechanismus.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen optimierten wir das Peptidrückgrat, um die Selektivität gegenüber $\beta 5i$ weiter zu verbessern. Zuerst nutzten wir das Peptidgerüst von ONX 0914 als Vorlage und synthetisierten **2-CA** (Abbildung 2, Tabelle ST2). Unerwarteterweise war **2-CA** weniger aktiv gegenüber humanem $\beta 5i$ ($IC_{50} = 6.65 \mu\text{M}$) und nicht in der Lage, in „Soaking“-Versuchen an $\gamma\beta 5G48C$ -Kristalle zu binden. Um den Verlust an Wirksamkeit zu verstehen, verglichen wir die Bindemodi von ONX 0914 und **1-CA** und fanden deutliche Unterschiede: Wenn ONX 0914 an

$\beta 5G48C$ gebunden vorliegt, ermöglicht der P2-TyrOMe-Rest stabilisierende Schwefel-Aren-Wechselwirkungen mit Cys48.^[16,17] Dagegen führt die kovalente Bindung der P4-Seitenkette von **1-CA** an Cys48 zu einer Verschiebung des P2-Phe-Restes und zu einer Verkleinerung der S2-Tasche. Um den Beitrag des P2-TyrOMe-Restes von **2-CA** isoliert zu betrachten, stellten wir **3-CA** her (Abbildung 2, Tabelle ST2). **3-CA** hat eine schlechtere $\beta 5i$ -Bindaffinität ($IC_{50} = 2.53 \mu\text{M}$) als **1-CA** ($IC_{50} = 1.24 \mu\text{M}$), was einen nur geringen Beitrag der S2-Tasche andeutet. Insgesamt hat die P3-Position also einen größeren Einfluss auf die Wirksamkeit. Interessanterweise besetzt das P3-Leucin von **1-CA** die S3-Tasche nur teilweise und richtet dadurch das übrige Peptidrückgrat in Richtung der $\beta 5$ -Untereinheit aus (Abbildung 3b). Insgesamt ist die Bindung von **1-CA** nur von der Wechselwirkung mit $\beta 5$ abhängig, während das Peptidrückgrat von ONX 0914 zusätzlich durch Asp114 von $\beta 6$ stabilisiert wird (Abbildung 3b, S6). Aufgrund der fehlenden Wechselwirkung mit der $\beta 6$ -Untereinheit, die in cCP und iCP identisch ist, gewinnt **1-CA** an Spezifität. Um zu überprüfen, ob die Ausrichtung hin zu $\beta 5$ auf das kurze Dap-Zwischenstück zurückzuführen ist, haben wir in der P4-Seitenkette Dap durch ein flexibleres L-2,4-Diaminobutansäure-Zwischenstück (Dab) ausgetauscht (**1-Dab-CA**, Tabelle ST3). Diese Modifikation führte zu einer zehnfach reduzierten Aktivität gegenüber $\beta 5i$ ($IC_{50} = 13.07 \mu\text{M}$) und zeigt, dass Dap sowohl die optimale Zwischenstücklänge besitzt als auch seine steifere Konformation von Vorteil ist. Unsere Ergebnisse implizieren, dass die S3-Tasche entscheidend für die korrekte Positionierung des angrenzenden P4- α -Chloracetamids ist. In ähnlicher Weise entsteht die Selektivität von ONX 0914 hauptsächlich durch die Wechselwirkung des P1-Phe-Restes mit der S1-Tasche, welche die C-terminale Kopfgruppe für den nukleophilen Angriff auf Thr1 positioniert.^[8]

Ausgehend von unseren Ergebnissen konzentrierten wir uns auf die auffälligsten Unterschiede in der S3-Tasche der humanen $\beta 5i$ - und $\beta 5c$ -Untereinheiten, die mittels Homologiemodellierungen und Sequenzvergleichen identifiziert wurden (Abbildung S3b). Der streng konservierte Austausch von Ala27 ($\beta 5c$) zu Ser27 ($\beta 5i$) verändert die Polarität und die Größe der S3-Tasche (Abbildung 3b).^[8] Daher synthetisierten wir **4-CA** (Abbildung 2), dessen Asparagin in der P3-Position eine verstärkte Wasserstoffbrücke mit Ser27 erwarten lässt. Tatsächlich war **4-CA** über 150-fach selektiver für $\beta 5i$ ($IC_{50} = 0.64 \mu\text{M}$) als für $\beta 5c$, während das unreaktive Kongener **4-PA** nur siebenfache Spezifität für $\beta 5i$ aufwies und insgesamt deutlich schlechter inhibierte ($IC_{50} = 29.29 \mu\text{M}$, Tabelle ST2). Die Art des P3-Restes und seine Stabilisierung scheinen demzufolge entscheidend für die Stärke der Bindung zu sein. Die Modifikation der P3-Position war alleine ausreichend, um eine hohe Selektivität für $\beta 5i$ zu erreichen. Dagegen sind Inhibitoren, die Thr1 angreifen, stark auf eine Stabilisierung durch den P1-Rest angewiesen.

Als nächstes untersuchten wir den Effekt von **1-CA** und **4-CA** in Zellkultur, vor allem um die inhibitorischen und zytotoxischen Eigenschaften der Inhibitoren sowie deren Einfluss auf die Produktion von inflammatorischen Zytokinen zu testen. Mithilfe eines luminogenen Substratassays wurden zunächst In-vivo- IC_{50} -Werte ermittelt. Dafür verwendeten

wir das Lysat von THP-1-Zellen, die überwiegend iCP exprimieren.^[18] Sowohl **1-CA** ($IC_{50} = 2.83 \mu\text{M}$) als auch **4-CA** ($IC_{50} = 3.55 \mu\text{M}$) hemmten deutlich die β 5-Aktivität, während die unreaktive Kontrolle **1-PA** ($IC_{50} = 36.69 \mu\text{M}$) kaum inhibitorisch aktiv war, was mit den in vitro gemessenen Werten übereinstimmt (Abbildung S7a). Dazu komplementär betrachteten wir den Einfluss der Hemmstoffe auf das Zellüberleben. Konzentrationen bis zu $10 \mu\text{M}$ von **1-CA** und **4-CA** hatten keinen Einfluss auf THP-1-Zellen (Abbildung S7b).

Schließlich überprüften wir die mögliche Anwendung als antiinflammatorischer Wirkstoff. Hier beschränkten wir uns auf **1-CA**, dessen Peptidrückgrat dem pharmakokinetisch optimierten CFZ ähnelt. Wir untersuchten mithilfe von ELISAs („enzyme-linked immunosorbent assays“) den Einfluss von **1-CA** auf die inflammatorischen Marker Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6). Tatsächlich reduzierte **1-CA** konzentrationsabhängig die Produktion von TNF- α und IL-6. $10 \mu\text{M}$ von **1-CA** reduzierten bereits deutlich die IL-6-Ausschüttung ohne hierbei Zelltod auszulösen, während $25 \mu\text{M}$ zu einer verminderten TNF- α -Produktion führten (Abbildung 4, S8). Diese Reduktion der Zytokinproduktion wurde ähnlich für ONX 0914 beschrieben.^[5]

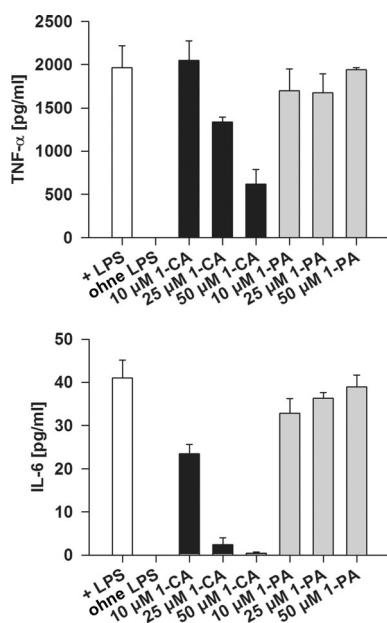


Abbildung 4. Konzentrationsbestimmung der Zytokine TNF- α und IL-6 durch ELISA. THP-1-Zellen wurden mit Lipopolysacchariden (LPS, Kontrollen mit weißen Balken) stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen an **1-CA** (schwarze Balken) behandelt ($10\text{--}50 \mu\text{M}$). **1-PA** diente als Negativkontrolle (graue Balken). **1-CA** supprimierte IL-6 und TNF- α abhängig von der gegebenen Konzentration. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert ($n=4$) zusammen mit Standardfehler.

Zusammengefasst beschreibt unsere Arbeit die ersten Immunproteasominhibitoren, die unabhängig von Thr1 im aktiven Zentrum wirken. Initiiert durch strukturbasierte Bioinformatik konnten wir Cys48 in β 5i als ein Isoform-spezifisches Nukleophil identifizieren, das durch Tetrapeptide zugänglich ist. Mit diesem Ziel synthetisierten wir decarboxyierte Peptide und testeten verschiedene Elektrophile,

wobei sich die α -Chloracetamid-Kopfgruppe von **1-CA** als die Beste erwies. Weiterhin konnten wir basierend auf Strukturdaten die P3-Position optimieren und ihren starken Einfluss auf die β 5i-Selektivität dieser Art von Inhibitoren bestätigen. **1-CA** blockierte in zellbasierten Versuchen die Aktivität von β 5i bereits in subletalen Konzentrationen und verminderte die Produktion von Zytokinen wie TNF- α und IL-6. Die hier beschriebene neue Verbindungsklasse bietet somit einen möglichen Ansatz für die Entwicklung von antiinflammatorischen selektiven Immunproteasominhibitoren.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch den SFB 1035/A2 gefördert. Wir danken Richard Feicht für Hilfe bei den Experimenten sowie den Mitarbeitern der PXI des Paul Scherrer Institutes, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz), für ihre Hilfe bei der Datenaufnahme.

Stichwörter: Immunologie · Immunproteasom · Selektive Inhibitoren · Struktur-Aktivitäts-Studien · Wirkstoff-Forschung

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. **2015**, *54*, 15888–15891
Angew. Chem. **2015**, *127*, 16116–16120

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479.
- [2] M. Groettrup, C. J. Kirk, M. Basler, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 73–78.
- [3] 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.
- [4] a) F. Parlati, S. J. Lee, M. Aujay, E. Suzuki, K. Levitsky, J. B. Lorenz, D. R. Micklem, P. Ruurs, C. Sylvain, Y. Lu, et al., *Blood* **2009**, *114*, 3439–3447; b) D. Niederwirth, 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; c) A. C. Mirabella, A. A. Pletnev, S. L. Downey, B. I. Florea, T. B. Shabaneh, M. Britton, M. Verdoes, D. V. Filippov, H. S. Overkleef, A. F. Kisseelev, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 608–618; d) M. Britton, M. M. Lucas, S. L. Downey, M. Screen, A. A. Pletnev, M. Verdoes, R. A. Tokhunts, O. Amir, A. L. Goddard, P. M. Pelphrey, et al., *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1278–1289.
- [5] 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.
- [6] M. Basler, S. Mundt, T. Muchamuel, C. Moll, J. Jiang, M. Groettrup, C. J. Kirk, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 226–238.
- [7] A. F. Kisseelev, M. Groettrup, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *23*, 16–22.
- [8] E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738.
- [9] a) Q. Liu, Y. Sabnis, Z. Zhao, T. Zhang, S. J. Buhrlage, L. H. Jones, N. S. Gray, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 146–159; b) T. Zhang, F. Inesta-Vaquera, M. Niepel, J. Zhang, S. B. Ficarro, T. Machleidt, T. Xie, J. A. Marto, N. Kim, T. Sim, et al., *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 140–154; c) M. Nacht, L. Qiao, M. P. Sheets, T. St. Martin, M. Labenski, H. Mazdiyasni, R. Karp, Z. Zhu, P. Chaturvedi, D. Bhavsar, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 712–721; d) M. Hagel, D. Niu, T. St. Martin, M. P. Sheets, L. Qiao, H. Bernard, R. M. Karp, Z. Zhu, M. T. Labenski, P. Chaturvedi, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 22–24; e) F. Solca, G. Dahl, A. Zoephel, G. Bader,

- M. Sanderson, C. Klein, O. Kraemer, F. Himmelsbach, E. Haaksma, G. R. Adolf, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *343*, 342–350; f) I. M. Serafimova, M. A. Pufall, S. Krishnan, K. Duda, M. S. Cohen, R. L. Maglathlin, J. M. McFarland, R. M. Miller, M. Frödin, J. Taunton, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 471–476.
- [10] S. M. Lim, K. D. Westover, S. B. Ficarro, R. A. Harrison, H. G. Choi, M. E. Pacold, M. Carrasco, J. Hunter, N. D. Kim, T. Xie, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 199–204; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 203–208.
- [11] G. Loidl, M. Groll, H.-J. Musiol, L. Ditzel, R. Huber, L. Moroder, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 197–204.
- [12] E. M. Huber, W. Heinemeyer, M. Groll, *Structure* **2015**, *23*, 407–417.
- [13] C. Blackburn, K. M. Gigstad, P. Hales, K. Garcia, M. Jones, F. J. Bruzzese, C. Barrett, J. X. Liu, T. A. Soucy, D. S. Sappal, et al., *Biochem. J.* **2010**, *430*, 461–476.
- [14] a) C. Blackburn, C. Barrett, J. L. Blank, F. J. Bruzzese, N. Bump, L. R. Dick, P. Fleming, K. Garcia, P. Hales, M. Jones, et al., *Medchemcomm* **2012**, *3*, 710–719; b) M. Groll, N. Gallastegui, X. Maréchal, V. Le Ravalec, N. Basse, N. Richy, E. Genin, R. Huber, L. Moroder, J. Vidal, et al., *ChemMedChem.* **2010**, *5*, 1701–1170.
- [15] a) C. Jöst, C. Nitsche, T. Scholz, L. Roux, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7590–7599; b) E. Weerapana, G. M. Simon, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 405–407; c) N. Brauckhoff, G. Hahne, J. T. H. Yeh, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4337–4340; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4425–4429.
- [16] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4808–4842; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4908–4944.
- [17] K. N. Daeffler, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14890–14896.
- [18] 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.

Eingegangen am 17. Juli 2015,
veränderte Fassung am 15. September 2015
Online veröffentlicht am 13. November 2015