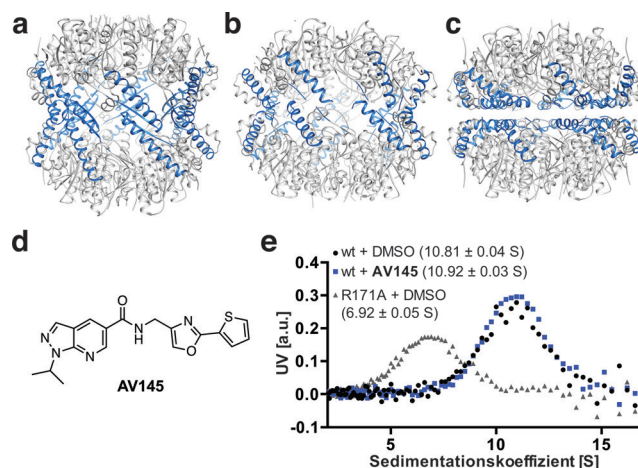


# Reversible Inhibitoren arretieren ClpP in einer definierten Konformation, die durch Bindung von ClpX aufgehoben wird

Axel Pahl, Markus Lakemeyer, Marie-Theres Vielberg, Mathias W. Hackl, Jan Vomacka, Vadim S. Korotkov, Martin L. Stein, Christian Fetzer, Katrin Lorenz-Baath, Klaus Richter, Herbert Waldmann, Michael Groll\* und Stephan A. Sieber\*

**Abstract:** Die caseinolytische Protease P ist ein wichtiger Regulator der Pathogenität von *Staphylococcus aureus*. Mithilfe eines Hochdurchsatz-Screenings bezüglich der Inhibition der ClpP-Peptidaseaktivität identifizierten wir den ersten nichtkovalenten Inhibitor dieser Enzymklasse. Die Cokristallisation der niedermolekularen Verbindung mit ClpP von *S. aureus* offenbarte einen neuen Bindungsmodus: Die Rotation des konservierten Prolinests 125 arretiert ClpP in einer Konformation, in der die korrekte Ausrichtung der katalytischen Triade verhindert und damit die Peptidaseaktivität inhibiert wird. In Optimierungstudien wurden Derivate entwickelt, die frühere ClpP-Inhibitoren in ihrer Potenz übertreffen. Erstaunlicherweise wird die durch die Inhibitoren verursachte Blockade bei Bindung des Chaperons ClpX rückgängig gemacht. Die Verdrängung des Inhibitors durch mit ClpP assoziierte Chaperone stellt einen unvermuteten Regulationsmechanismus dar, der sich jedoch für die Entwicklung von ClpP-Inhibitoren als entscheidend erweist.

Die caseinolytische Protease P (ClpP) gehört zur Familie der Serin-Hydrolasen und ist ein bedeutender Regulator der bakteriellen Zellhomöostase.<sup>[1]</sup> Der Enzymkomplex besteht aus zwei übereinanderliegenden heptameren Ringen, die durch die zentralen  $\alpha$ -Helices E der einzelnen Untereinheiten verbunden sind, und ClpP nimmt eine 14-gliedrige fassartige Struktur ein. Auf jede Helix E folgt ein Beta-Strang  $\beta_9$ , der an den Grenzflächen der Heptamere essentielle Wasserstoffbrücken bildet. In der Literatur wurden verschiedene Konformationen von ClpP beschrieben: Eine gestreckte Helix E (Abbildung 1a, PDB ID: 3V5E)<sup>[2]</sup> ist entscheidend für die peptidolytische Aktivität und die Stabilität des tetra-



**Abbildung 1.** SaClpP in seinem a) gestreckten (PDB ID: 3V5E), b) kompakten (PDB ID: 4EMM) und c) komprimierten (PDB ID: 3QWD) Zustand. Die E-Helices sind blau dargestellt. d) Struktur von AV145. e) Analytische Ultrazentrifugation von Wildtyp-ClpP und der heptameren<sup>[2]</sup> ClpP-Mutante R171A. DMSO diente als Kontrolle. Die Maxima der Sedimentationskoeffizienten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

dekameren Komplexes. Ein Knick in dieser Helix hingegen führt zu einem kompakten (Abbildung 1b, PDB ID: 4EMM)<sup>[3]</sup> oder komprimierten Zustand (Abbildung 1c, PDB ID: 3QWD),<sup>[4]</sup> in denen die Reste der katalytische Triade fehlgestellt sind. Dies verursacht eine Rotation des konservierten Pro125 (im Strang  $\beta_9$ ), was den Zusammenfall der Helix E bewirkt. Zur Entfaltung und zum Verdau größerer Proteinsubstrate benötigt ClpP assoziierte Chaperone wie das hexamere ClpX.<sup>[1]</sup> Zusätzlich wird angenommen, dass durch die Bindung von ClpX der gestreckte, aktive Zustand von ClpP bevorzugt wird.<sup>[5]</sup>

In Proteom-Analysen wurden bisher lediglich  $\beta$ -Lactone und Phenylester als spezifische ClpP-Inhibitoren beschrieben.<sup>[6]</sup> Beide Verbindungsklassen acylieren das aktive Ser98.<sup>[7]</sup> Solch eine kovalente, irreversible Modifikation erweist sich im Fall von Markierungsexperimenten sowie mechanistischen Studien als vorteilhaft und gewährleistet eine verlängerte Verweildauer des Inhibitors an seinem Angriffsziel. Die In-vitro-<sup>[5,6]</sup> und In-vivo-Anwendung<sup>[8]</sup> irreversibler ClpP-Inhibitoren ist jedoch aufgrund der geringen hydrolytischen Stabilität ihrer elektrophilen Gruppen stark eingeschränkt.<sup>[9]</sup> Alle bisherigen Bemühungen, nichtkovalente Inhibitoren zu entwickeln, scheiterten.<sup>[7a]</sup> Trotz der Relevanz einer effektiven Hemmung von ClpP und der daraus resultierenden

[\*] Dr. A. Pahl,<sup>[‡]</sup> M. Lakemeyer,<sup>[‡]</sup> M.-T. Vielberg,<sup>[‡]</sup> M. W. Hackl, J. Vomacka, Dr. V. S. Korotkov, Dr. M. L. Stein, C. Fetzer, Dr. K. Lorenz-Baath, Dr. K. Richter, Prof. Dr. M. Groll, Prof. Dr. S. A. Sieber  
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: michael.groll@tum.de  
stephan.sieber@tum.de

Prof. Dr. H. Waldmann  
Department für Chemie und Chemische Biologie  
Technische Universität Dortmund  
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Ⓒ Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem

Ⓘ Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507266> zu finden.

Notwendigkeit eines rationalen Wirkstoffdesigns ist bis heute nur eine Komplex-Kristallstruktur der Protease mit einem nichtspezifischen Chlormethylketon(CMK)-Peptidliganden bekannt (PDB ID: 2FZS).<sup>[10]</sup> Hier präsentieren wir die erste Kokristallstruktur eines spezifischen ClpP-Inhibitors mit einem neuartigen, reversiblen Wirkmechanismus. Der Ligand wurde basierend auf den strukturellen Erkenntnissen mithilfe rationalen Wirkstoffdesigns und In-silico-Screenings weiter optimiert.

Bei einem vorangegangenen Hochdurchsatz-Screening (HTS) mit etwa 140 000 Verbindungen der COMAS-Bibliothek (MPI Dortmund) wurde kein einziger nichtkovalenter SaClpP-Inhibitor mit einem  $IC_{50} < 2 \mu M$  identifiziert.<sup>[6a]</sup> Da ClpP jedoch bezüglich des Standardsubstrats Suc-Leu-Tyr-AMC nur eine geringe peptidolytische Aktivität aufweist, wird eine Enzymkonzentration von mindestens  $1 \mu M$  benötigt, um signifikanten Umsatz messen zu können. Diese Tatsache bewirkt, dass die Potenz der besten Inhibitoren auf den mikromolaren Bereich begrenzt ist. Aus diesem Grund analysierten wir unsere früheren HTS-Ergebnisse erneut und senkten das Selektionskriterium auf einen  $IC_{50} \leq 10 \mu M$ .<sup>[6a]</sup> Vier Verbindungen erfüllten diese Rahmenbedingung (Abbildung S1). Die massenspektrometrische Analyse intakter Proteine zeigte, dass **AV145** nichtkovalent an ClpP bindet (Abbildung 1 d, Abbildung S1). Anhand medizinisch-chemischer Überlegungen wurde diese Verbindung als erfolgversprechendster Kandidat für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. **AV145** trägt keinerlei reaktive Gruppen und besteht aus drei charakteristischen Heterocyclen: einem Pyrazolopyridin-Ring und einer 2-(Thiophen-2-yl)oxazol-Gruppe. Die zeitabhängige Inkubation von SaClpP mit **AV145** beeinflusste die  $IC_{50}$  nicht (Abbildung S2), wodurch das Vorliegen eines reversiblen Wirkmechanismus bestätigt wurde. Analytische Ultrazentrifugationsstudien offenbarten, dass **AV145**, im Unterschied zu den meisten Phenylester- und Lacton-Verbindungen, die Dissoziation von ClpP in heptamere Spezies nicht induziert (Abbildung 1 e).<sup>[6a, 7b]</sup>

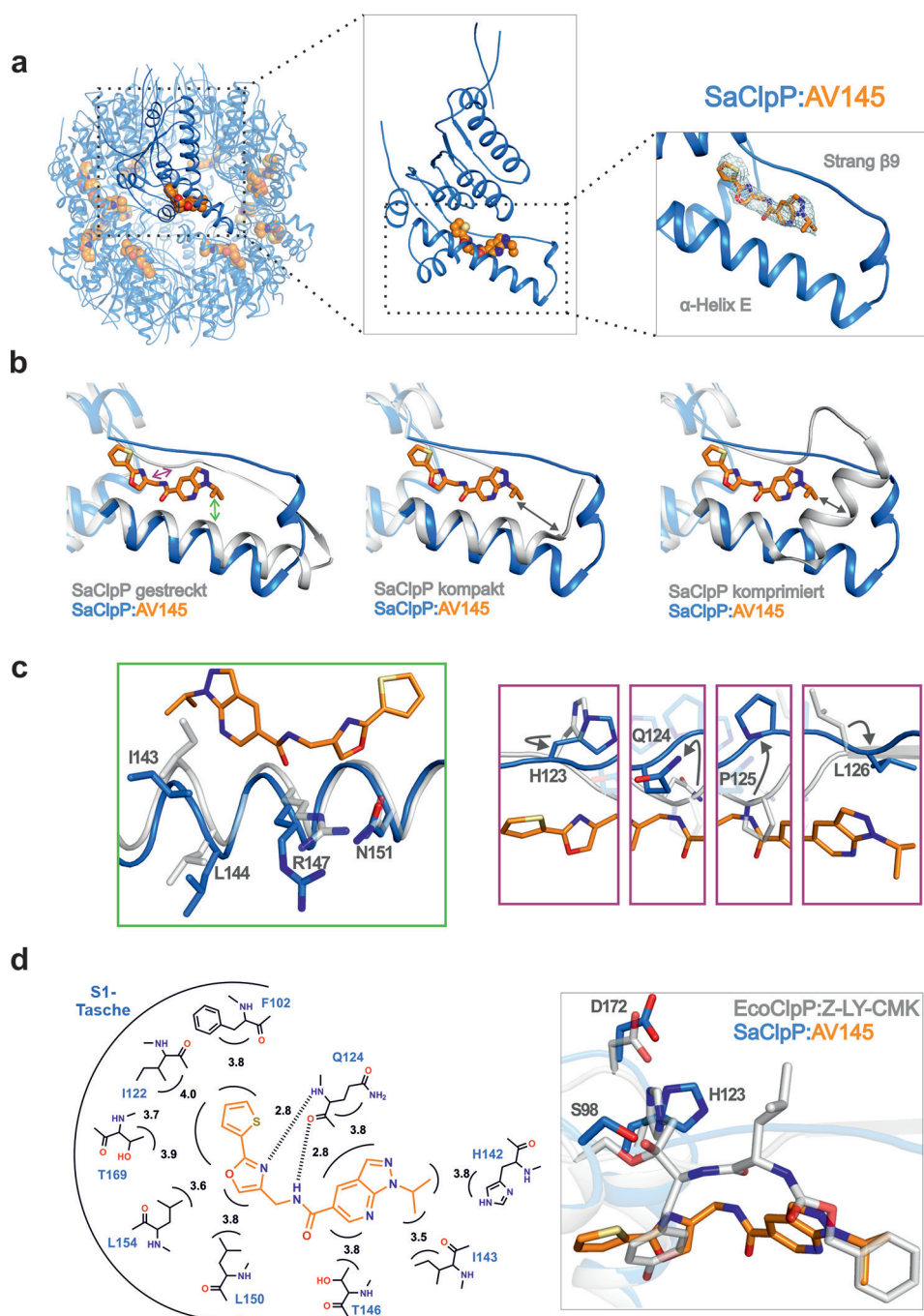
Um den Inhibitionsmechanismus weiter aufzuklären, kristallisierten wir **AV145** mit SaClpP und lösten die Komplexstruktur bei einer Auflösung von  $3 \text{ \AA}$  durch molekularen Ersatz ( $R_{\text{frei}} = 27.4\%$ , Tabelle S1, PDB ID: 5DL1). Die asymmetrische Einheit enthält das vollständige Enzym und den Inhibitor, der an jede Untereinheit bindet. Trotz unterschiedlicher Okkupanz konnte **AV145** in der gemittelten  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte eindeutig in der Nähe des aktiven Zentrums zwischen  $\alpha$ -Helix E und Beta-Strang  $\beta 9$  positioniert werden (Abbildung 2 a). Überlagerungen mit den Strukturen des Apoenzyms in seiner gestreckten, kompakten und komprimierten Form zeigen, dass der Inhibitor in einem nicht-substratähnlichen Modus bindet und ClpP dadurch in einer neuartigen Konformation arretiert (Abbildung 2 b). Obwohl Helix E nahezu vollständig ausgerichtet ist wie in der aktiven, gestreckten Enzymform, verdrängt **AV145** die Reste Ile143 und Arg147 aufgrund sterischer Hinderungen (Abbildung 2 c). Daraus resultiert eine Verschiebung im Zentrum der Helix um ungefähr  $1.4 \text{ \AA}$  (grüner Pfeil in Abbildung 2 b). Die meisten konformativen Änderungen werden jedoch im Strang  $\beta 9$  gefunden (lila Pfeil in Abbildung 2 b). So wird die Bildung eines  $\beta$ -Faltblattes mit der Untereinheit des gegen-

überliegenden Ringes behindert. Dies wird in der partiellen Fehlordnung der beiden Glycinreste 127 und 128 deutlich. Insbesondere fällt jedoch die Drehung des Pro125 im Strang  $\beta 9$  um nahezu  $180^\circ$  ins Auge. Es kommt jedoch nicht zum Bindungsbruch, und der Aminosäurerest nimmt eine ähnliche Position ein, wie in der inaktiven Form der Protease (Abbildung 2 c). Aus dieser Verlagerung resultiert die Verschiebung von His123 aus der katalytischen Triade heraus, die damit inaktiviert wird, was die inhibitorischen Eigenschaften von **AV145** begründet. Weiterhin folgt der Strukturumlagerung von Pro125 eine wesentliche Verschiebung von Gln124. Dabei arretiert Gln124 in einem Zustand, in dem zwischen **AV145** und dem Proteinrückgrat zwei Wasserstoffbrücken gebildet werden, die wahrscheinlich die entscheidenden Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen darstellen. Die Bindung des Moleküls wird außerdem durch ein ausgedehntes Netzwerk von Van-der-Waals-Kontakten mit Phe102, Ile122, His142, Thr146, Leu150, Leu154 und Thr169 stabilisiert (Abbildung 2 d). Zusammengefasst erklärt dieser neuartige Bindungsmodus, warum **AV145** ein nichtkovalenter Inhibitor von SaClpP ist. Die Überlagerung unserer Struktur mit der des Z-LY-CMK-gebundenen EcClpP zeigt, dass sich das Verhalten der Inhibitoren deutlich voneinander abgrenzt: Im Unterschied zum CMK beeinflusst **AV145** nicht direkt das katalytische Zentrum von SaClpP, sondern es agiert über die benachbarten Aminosäurereste. Solch eine Art der indirekten Bindung wurde für diese Enzymklasse bisher nicht beschrieben.

Die Kokristallstruktur von SaClpP in Komplex mit **AV145** diene als Ausgangspunkt für eine Optimierung der Inhibitoren. Sowohl der Pyrazolopyridin-Teil (Säure-Teil) als auch der 2-(Thiophen-2-yl)-oxazol-Teil (Amin-Teil) des Moleküls wurden durch verschiedene chemische Gruppen substituiert, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu untersuchen (Abbildung 3 a). Die Verbindungen wurden entweder auf Grundlage rationaler Überlegungen entwickelt oder entstammten einem virtuellen Screening (siehe die Hintergrundinformationen). Änderungen des Amin-Teils, z. B. die Einführung von Thiophen-Substituenten oder der Austausch des Thiophens gegen eine Phenyl- oder Oxazol-Gruppe, ergaben inaktive Substanzen (Abbildungen S3, S4). Modifikationen des Säure-Teils wurden hingegen wesentlich besser toleriert und führten zur Entwicklung potenterer Inhibitoren. So synthetisierten wir 11 Derivate mit N-Aryl-Substituenten (Abbildung 3 c) und untersuchten, ob durch Einführung aromatischer Gruppen eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit His142 (Teil des Strangs  $\beta 9$ ) erreicht werden kann.

Die Synthese der Derivate, exemplarisch dargestellt für **AV280** in Abbildung 3 b, umfasste die N-Alkylierung von Pyrazolopyridin **1** mit 3,4-Dimethylbenzylbromid und die anschließende Verseifung des Esters durch Lithiumhydroxid. Für die Synthese des Oxazols **3** wurde zunächst das entsprechende Arylamin mit Dichloraceton bei  $120^\circ C$  kondensiert. Das entstandene Chlormethyloxazol **2** wurde in zwei Schritten in das Amin **3** umgewandelt. Das gewünschte Produkt wurde durch Peptidkupplung zwischen der Säure und dem Amin erhalten.

Im Vergleich zu **AV145** hemmen **AV191** und **AV280**, die einen Benzyl- bzw. einen 3,4-Dimethylbenzyl-Substituenten



**Abbildung 2.** a) Bindung von AV145 an SaClpP (PDB ID: 5DL1). b) Strukturüberlagerung von SaClpP:AV145 mit der gestreckten, kompakten und komprimierten Form von SaClpP. Strukturänderungen zwischen der gestreckten und der Cokristallstruktur sind durch farbige Pfeile angezeigt. c) Detaillierte Untersuchung der Strukturänderungen innerhalb der  $\alpha$ -Helix E und des Strangs  $\beta 9$  im Vergleich zur gestreckten Konformation. d) Die Analyse der spezifischen Enzym-Inhibitor-Kontakte und die Überlagerung mit der EcoClpP:Z-LY-CMK-Struktur (PDB ID: 2FZS) verdeutlichen den nichtkovalenten Inhibitionsmechanismus von AV145. Farbcodierung: SaClpP:AV145 blau, AV145 orange, SaClpP:gestreckt/kompakt/komprimiert und EcoClpP:Z-LY-CMK grau; Heteroatome: O rot, N blau, S gelb.

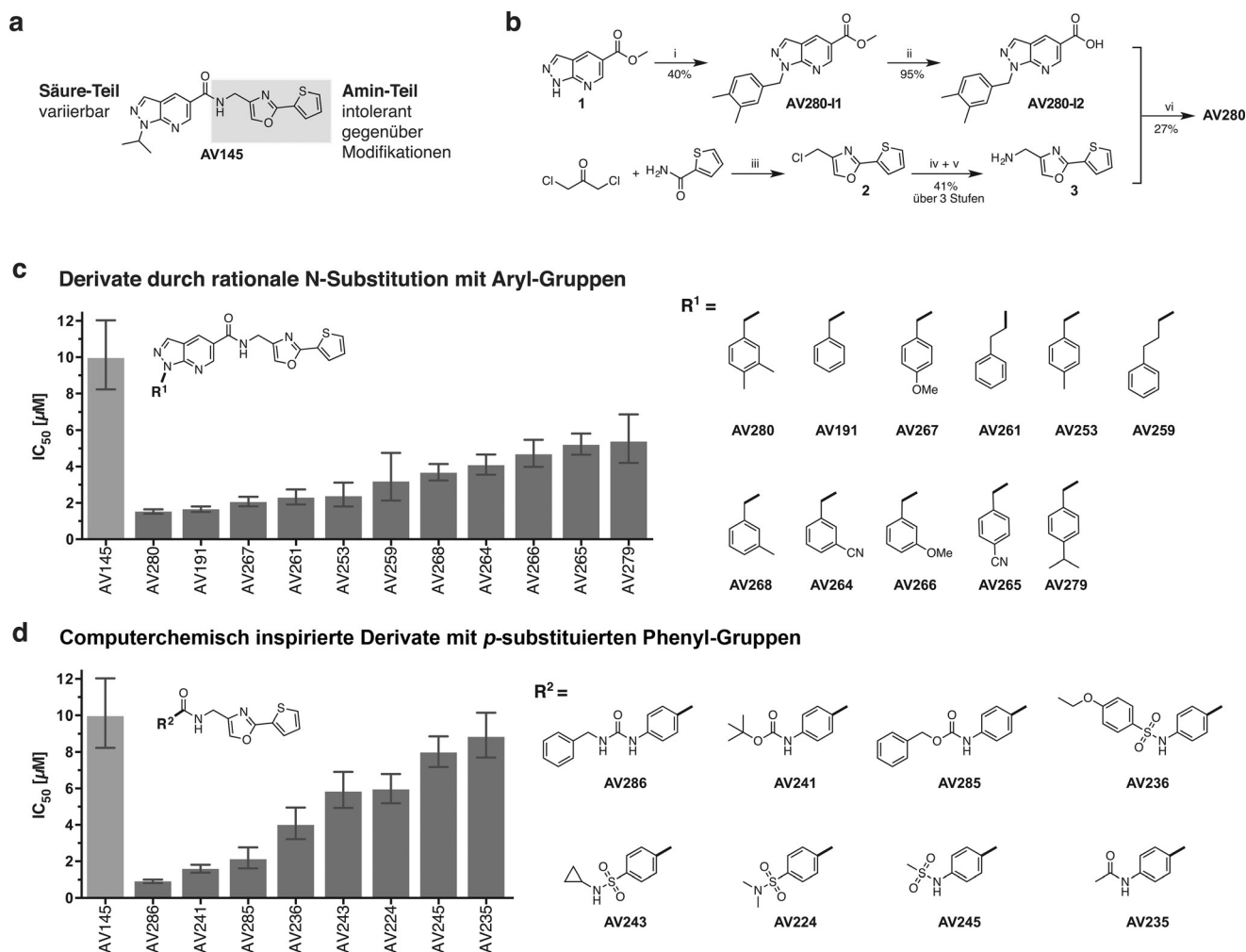
tragen, ClpP mit  $IC_{50}$ -Werten von 1.7 und 1.5  $\mu M$  etwa sechsmal stärker (Abbildung 3c). Basierend auf den Ergebnissen des virtuellen Screenings ersetzten wir anschließend die Pyrazolopyridingruppe durch Phenylringe mit *para*-Harnstoff- oder *para*-Carbamat-Substituenten. Die dabei

entstandene Verbindung AV286 hat eine  $IC_{50}$  von 0.9  $\mu M$  (Abbildung 3d). Dieser Wert zeigt, dass eine stöchiometrische Menge an AV286 (bezogen auf die Monomerkonzentration der Protease) ausreichend ist, um 50% von SaClpP zu inhibieren. Eine erhöhte Substratkonzentration beeinflusste dabei die Bindung des Inhibitors nicht (Abbildung S5).

Da uns nun potente und reversible ClpP-Inhibitoren zur Verfügung standen, untersuchten wir die Zellpermeabilität der besten Verbindung sowie die selektive Bindung an das Zielprotein in situ. Dazu wurde eine AV286-ähnliche Photosonde (AV321) für das aktivitätsbasierte Protein-Profiling<sup>[11]</sup> synthetisiert, die einen Diazirin-Photovernetzer und eine Alkin-Gruppe trägt (Abbildung 4a).<sup>[12]</sup> Erfreulicherweise konnte auch für die Sonde ein geringer  $IC_{50}$ -Wert (2  $\mu M$ ) für die Hemmung der SaClpP-Peptidaseaktivität bestimmt werden (Abbildung S6). Lebende *S. aureus*-Zellen wurden mit AV321 inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt, damit sich eine kovalente Bindung zwischen Zielprotein und Diazirin bilden konnte. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und die Sonde über eine Klick-Reaktion an eine Azid-funktionalisierte Markierung (Fluoreszenzfarbstoff oder Biotin) gekuppelt. Das so markierte Proteom wurde mittels Fluoreszenz-SDS-PAGE (Abbildung 4b) oder Massenspektrometrie (MS; Abbildung 4c) analysiert. Auf der SDS-PAGE war eine deutliche, dem Molekulargewicht von ClpP entsprechende Bande zu erkennen (Abbildung 4b). Um die Bin-

dung an ClpP in situ zu bestätigen, führten wir quantitative, gelfreie MS mit Isotopenmarkierung durch.<sup>[13]</sup> Die MS-basierte Anreicherung der Zielproteine wurde mithilfe eines Vulkandiagramms visualisiert (Abbildung 4c, Abbildung S7). In allen Läufen war ClpP stark angereichert, und nur wenige





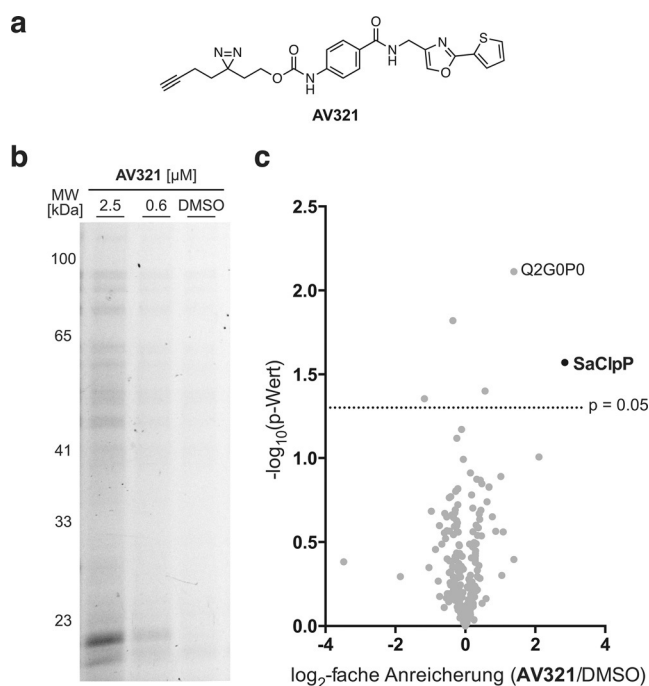
**Abbildung 3.** a) Studien zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung. a) Der Amin-Teil von **AV145** ist intolerant gegenüber Modifikationen, während der Säure-Teil modifiziert werden kann, um die Hemmung von ClpP zu optimieren. b) Synthese von **AV280**: Reagentien und Bedingungen: i) 3,4-Dimethylbenzylbromid, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, RT, 18 h; ii) LiOH, THF/H<sub>2</sub>O (9:1), RT, 18 h; iii) ohne Lösungsmittel, 120 °C, 16 h; iv) NaN<sub>3</sub>, DMF, 60 °C, 16 h; v) PPh<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O (9:1), RT, 16 h; vi) TBTU, NMM, DMF, 0 °C bis RT, 18 h. Strukturen und IC<sub>50</sub>-Werte für Derivate mit c) N-Aryl-Substituenten und d) *p*-substituierten Phenylgruppen, deren Synthese durch die Ergebnisse eines virtuellen Screening inspiriert worden war. IC<sub>50</sub>-Werte entstammen von mindestens zwei biologischen Experimenten mit je drei technischen Replikaten pro Konzentration und sind als Mittelwert und 95% Konfidenzintervall dargestellt. Siehe die Hintergrundinformationen für weitere Details.

potenzielle „Off-Targets“ (unerwünschte Angriffsziele; Signifikanzniveau:  $p \leq 0.05$ ) wie das 50S-ribosomale Protein L1 (Protein-ID: Q2G0P0) konnten detektiert werden. Weiterhin untersuchten wir, ob die zellpermeablen Hemmstoffe die Produktion von  $\alpha$ -Hämolyisin (hla), dem wichtigsten Toxin von *S. aureus*, das durch ClpP reguliert wird, senken. Überraschenderweise war der hla-Spiegel allgemein hoch, was nahelegt, dass die Inhibition der intrazellulären Proteolyse weniger effektiv war als die Reduktion der Peptidaseaktivität *in vitro* vermuten ließ.

Um dieses Ergebnis weiter zu analysieren, untersuchten wir die potentesten Peptidase-Inhibitoren in einem ClpXP-Protease-Assay mit dem fluoreszierenden Substrat GFP-SsrA (markiert für den ClpXP-Abbau). Tatsächlich waren alle Inhibitoren in diesem Assay weitestgehend inaktiv (Abbildung S8), woraus gefolgert werden kann, dass ClpX die durch den Liganden induzierte Konformation aufhebt. Um den mechanistischen Ursprung für dieses unerwartete Verhalten

zu untersuchen, griffen wir auf einen bekannten Aktivator von ClpP zurück.<sup>[14]</sup> Diese Verbindung verdrängt ClpX in Protease-Assays und wurde daher als Ersatz für das Chaperon verwendet (Abbildung S9). Das Molekül hob die Hemmung von ClpP durch **AV286** in Casein- und Peptidase-Assays konzentrationsabhängig auf, was eine konformative Selektion des aktiven Enzymzustandes durch ClpX oder entsprechende Surrogate bestätigt (Abbildung S9).<sup>[15]</sup> Unsere Beobachtungen stimmen mit denen einer jüngst veröffentlichten Studie überein, die zeigte, dass durch Bindung von Acyldepsipeptiden, welche ClpX imitieren, der Wechsel in den aktiven Zustand des Enzyms erfolgt.<sup>[5]</sup> Daher stellt die Regulation durch ClpX und andere proteolytische Aktivatoren einen wichtigen und bisher vernachlässigten Parameter für die Entwicklung zukünftiger ClpP-Inhibitoren dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindung von **AV145** an ClpP das Enzym in einem neuartigen, inaktiven Zustand arretiert, in dem Pro125 rotiert und die katalytischen



**Abbildung 4.** In-situ-Validierung der Zielproteine in lebenden *S. aureus*-Zellen mit **AV321**. a) Strukturformel der aktivitätsbasierten Photosonde **AV321**. b) Fluoreszenz-SDS-PAGE der löslichen Fraktion. c) Vulkan-diagramm der gelreinen, quantitativen ABPP-Experimente, die an der Orbitrap XL gemessen wurden. Die Daten entstammen jeweils drei biologischen Replikaten für DMSO und **AV321** (5  $\mu\text{M}$ ).  $\log_2$ -fache Anreicherungen wurden auf den Z-Wert normalisiert, und der  $\log_{10}$  (p-Wert) wurde mittels zweiseitigem, einfachem t-Test berechnet. Proteine, die zusätzlich zu SaClpP angereichert wurden: Protein-ID Q2G0P0: 50S-ribosomales Protein L1. Siehe die Hintergrundinformationen für weitere Details und zusätzliche Analysen.

Triade fehlgestellt ist. Die Art und Weise der Wechselwirkung zwischen der Protease und dem Inhibitor diente als Grundlage für die Entwicklung von neuen Verbindungen, was zu **AV286**, dem ersten nichtkovalenten Inhibitor von ClpP mit einer  $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ , führte. Erstaunlicherweise hebt ClpX die nichtkovalente Bindung der untersuchten Hemmstoffe an ClpP auf. Dies ist ein widersprüchliches Erkenntnis im Hinblick darauf, dass für ähnliche proteolytische Komplexe, wie das Proteasom, stabile Inhibitoren für einzelne Untereinheiten bekannt sind.<sup>[16]</sup> Unsere Ergebnisse weisen deutlich daraufhin, dass Regulatoren wie das ATP-abhängige ClpX verschiedene Konformationen der hydrolytischen Kammer induzieren und modifizieren. Für die Identifizierung von nichtkovalenten, in situ aktiven ClpP-Inhibitoren ist es daher entscheidend, sich nicht ausschließlich auf die Peptidaseaktivität des isolierten ClpP-Komplexes zu fokussieren, da dieser Ansatz – obwohl einfach zu verfolgen – die Situation in lebenden Zellen nicht akkurat widerspiegelt. Wir vermuten, dass eine fortdauernde Hemmung von ClpP durch Verstärkung der durch die niedermolekulare Verbindung ausgelösten konformativen Sperre erzielt werden kann, z.B. durch Blockieren der proteolytischen Kammer mittels sterisch anspruchsvoller Liganden. Eine alternative Herangehensweise wäre die Entwicklung von Inhibitoren mithilfe des komplexeren, proteolytischen ClpXP-Systems. Beide Strategien

weisen vielversprechende Ansatzpunkte für die zukünftige Optimierung von Verbindungen auf, die die Virulenz von *S. aureus*, vor allem die der antibiotikaresistenten Stämme, adressieren.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB1035, das Bundesministerium für Bildung und Forschung (FKZ: 031A131) sowie das Siebte Rahmenprogramm der Europäischen Gemeinschaft (FP7/2007-2013) unter BioStruct-X (grant agreement N°283570) und dem Center for Integrated Protein Science CIPSM finanziell unterstützt. M.L. wurde durch die Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert. Wir danken den Mitarbeitern der Beamline X06SA am Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source (Villingen, Schweiz), für die Hilfe bei der Datengenerierung. Außerdem danken wir Heike Hofmann, Ernst Bernges, Katja Bäumel, Burghard Cordes und Mona Wolff für technische Unterstützung. Wir bedanken uns bei Elena Kunold für die Mithilfe bei der Analyse der quantitativen massenspektrometrischen Daten, Pavel Kielkowski für die Synthese des ADEP-Fragments und Megan Wright für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

**Stichwörter:** Caseinolytische Protease · Konformationsselektion · Nichtkovalente Inhibition · Proteinkristallographie · Strukturelle Umlagerung

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15892–15896  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 16121–16126

- [1] a) T. A. Baker, R. T. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 15–28; b) J. Ortega, S. K. Singh, T. Ishikawa, M. R. Maurizi, A. C. Steven, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1515–1521; c) J. A. Alexopoulos, A. Guarne, J. Ortega, *J. Struct. Biol.* **2012**, *179*, 202–210.
- [2] M. Gersch, A. List, M. Groll, S. A. Sieber, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9484–9494.
- [3] F. Ye, J. Zhang, H. Liu, R. Hilgenfeld, R. Zhang, X. Kong, L. Li, J. Lu, X. Zhang, D. Li, H. Jiang, C. G. Yang, C. Luo, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17643–17653.
- [4] S. R. Geiger, T. Böttcher, S. A. Sieber, P. Cramer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5749–5752; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5867–5871.
- [5] M. Gersch, K. Famulla, M. Dahmen, C. Göbl, I. Malik, K. Richter, V. S. Korotkov, P. Sass, H. Rubsam-Schaeff, T. Madl, H. Brotz-Oesterheld, S. A. Sieber, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6320.
- [6] a) M. W. Hackl, M. Lakemeyer, M. Dahmen, M. Glaser, A. Pahl, K. Lorenz-Baath, T. Menzel, S. Sievers, T. Böttcher, I. Antes, H. Waldmann, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8475–8483; b) T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4600–4603; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4677–4680.
- [7] a) M. Gersch, F. Gut, V. S. Korotkov, J. Lehmann, T. Böttcher, M. Rusch, C. Hedberg, H. Waldmann, G. Klebe, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3009–3014; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 3083–3088; b) M. Gersch, R. Kolb, F. Alte, M. Groll, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1360–1366.
- [8] F. Weinandy, K. Lorenz-Baath, V. S. Korotkov, T. Böttcher, S. Sethi, T. Chakraborty, S. A. Sieber, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 710–713.
- [9] A. Cole et al., *Cancer Cell* **2015**, *27*, 864–876.

- [10] A. Szyk, M. R. Maurizi, *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 165–174.
- [11] a) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301; b) P. P. Geurink, L. M. Prely, G. A. van der Marel, R. Bischoff, H. S. Overkleeft, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 85–113.
- [12] a) Z. Li, P. Hao, L. Li, C. Y. J. Tan, X. Cheng, G. Y. J. Chen, S. K. Sze, H.-M. Shen, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8551–8556; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8713–8718; b) V. V. Ros-tovtsev, J. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; c) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; d) R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357–396.
- [13] P. J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A. J. Heck, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 484–494.
- [14] D. W. Carney, C. L. Compton, K. R. Schmitz, J. P. Stevens, R. T. Sauer, J. K. Sello, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2216–2220.
- [15] M. Merdanovic, T. Mönig, M. Ehrmann, M. Kaiser, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 19–26.
- [16] E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8838–8850.

Eingegangen am 4. August 2015,  
veränderte Fassung am 15. September 2015  
Online veröffentlicht am 13. November 2015