

Regulierbare Sonden mit direktem Fluoreszenzsignal für das konstitutive und das Immunoproteasom

Christian Dubiella⁺,* Haissi Cui⁺ und Michael Groll*

Abstract: Reaktive Elektrophile werden häufig für die Hemmung von Proteasen genutzt. Insbesondere die Aktivität von Inhibitoren gegen das Proteasom – ein zentraler Regulator des Zellüberlebens und ein klinisch genutzter Angriffspunkt für Medikamente – hängt von der entsprechenden Kopfgruppe ab. Hier zeigen wir, dass diese Reaktivität in peptidischen Sulfonsäureestern durch Variation der Abgangsgruppe (AG) einstellbar ist. Tatsächlich korrelierte die Wirksamkeit der Inhibitoren mit dem pK_s -Wert der verwendeten AG. Der Einsatz von Fluorophoren als AG ermöglicht zudem das Design von Sonden, die ein stöchiometrisches Fluoreszenzsignal während der Bindung an das Proteasom erzeugen und damit direkt deren Inaktivierung mit einem Messwert verknüpfen. Dieses Prinzip könnte auch für weitere, auf Sulfonylfluoriden basierende Inhibitoren anwendbar sein und das Design von empfindlichen Sonden für enzymatische Studien ermöglichen.

Die Bedeutung von Proteasen für die Zellfunktion spiegelt sich darin wider, dass bis zu 2 % des humanen Genoms für diese Proteine kodieren.^[1] Trotz der Vielzahl an Mechanismen, die in dieser Enzymklasse für Proteolyse beschrieben wurden, nutzen alle Proteasen das gleiche Katalyseprinzip: 1) direkte (Aspartat-, Glutamat- und Metalloproteasen) oder 2) indirekte (Serin-, Threonin- und Cysteinproteasen) Aktivierung eines Wassermoleküls, um einen nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung zu erleichtern. Zu den wichtigsten intrazellulären proteolytischen Enzymen zählen das konstitutive Proteasom (cCP, „core particle“, CP) und das Immunoproteasom (iCP). Diese nutzen die Basizität eines N-terminalen Threonins (Thr1) im aktiven Zentrum der katalytischen Untereinheiten $\beta 1c/i$, $\beta 2c/i$ und $\beta 5c/i$ für ihren Katalysemechanismus.^[2] Im Unterschied zu dem nur mäßig nukleophilen Wasser ($pK_s = 15.7$) ist das Alkoxid von Thr1 ($pK_s \approx 9$)^[3] in der Lage, das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung in Proteinsubstraten anzugreifen. Diese Reaktivität wird bei antineoplastischen Wirkstoffen wie Bortezomib^[4] und Carfilzomib^[5] (CFZ, Abbildung 1) genutzt, die mit ihrer C-terminalen elektrophilen Kopfgruppe kovalent an

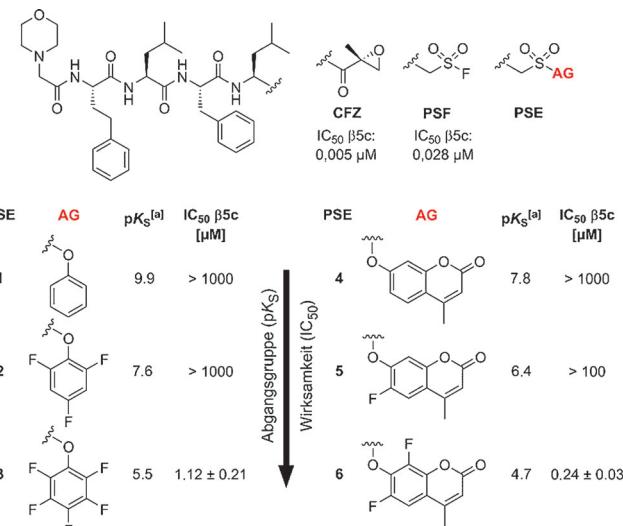


Abbildung 1. Carfilzomib (CFZ) und das entsprechende peptidische Sulfonylfluorid sowie das Sulfonsäureesterderivat. IC_{50} -Werte wurden an humanem cCP mithilfe fluorogener (PSE 1, 2 und 3, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cCP) und lumineszierender (PSE 4, 5 und 6, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cCP) Substrate gemessen.^[a] pK_s -Werte gelten jeweils für die konjugierte Säure der Abgangsgruppe (AG).

Thr1 binden. Eine systematische Untersuchung^[6] zeigt, dass CP-Inhibitoren mit verschiedenen Kopfgruppen sich vor allem in der chemischen Reaktivität ihres jeweiligen Elektrophils unterscheiden.^[7] Jedoch ist diese Reaktivität in der Mehrheit der CP-Inhibitoren nur schwer regulierbar. Dagegen ermöglichen Sulfonylfluorid-basierte iCP- und cCP-Inhibitoren^[8] das Einstellen der Kopfgruppenreakтивität. Zu diesem Zweck tauschten wir die Fluoridabgangsgruppe (Abgangsgruppe: AG) von peptidischen Sulfonylfluoriden^[8] (PSF, Abbildung 1) gegen phenolische AG, um reaktive Sulfonsäureester zu erzeugen (PSE, Abbildung 1). In diesen Systemen ist über elektronenziehende Gruppen im Phenolsystem eine Feineinstellung der Abgangsgruppe möglich. Diese führen zu verschiedenen pK_s -Werten und beeinflussen somit die Reaktivität. Vergleichbare Studien wurden bereits mit auf Acyloxy- und Aryloxymethylketonen basierenden Cysteinprotease-Inhibitoren durchgeführt.^[9] Hier ist eine Korrelation zwischen dem pK_s -Wert der Abgangsgruppe (konjugierte Säure) und der Inhibitionsrate ersichtlich.^[9] Außerdem deuten Vergleiche zwischen Analoga des CP-Inhibitors Salinosporamid A mit verschiedenen AG einen Zusammenhang zwischen der Abgangsgruppenwahl und der Wirksamkeit der Inhibitoren an.^[10]

Daher fokussierten wir uns auf Phenole mit einem pK_s -Wert zwischen 6 und 10, um hydrolytisch stabile Peptido-

[*] Dr. C. Dubiella,^[+] Dr. H. Cui,^[+] 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

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605753> zu finden.

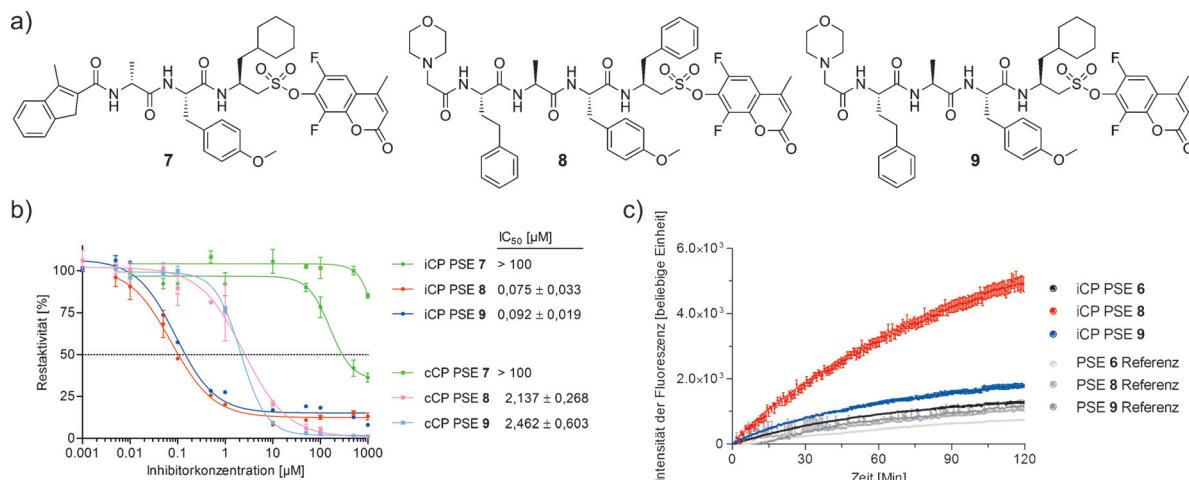


Abbildung 2. a) Optimierte Sonden für iCP-Bindung: PSEs **7**, **8** und **9**. b) In-vitro-IC₅₀-Messungen gegen die Chymotrypsin-ähnliche β 5-Aktivität von humanem iCP und cCP nach 1 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der PSE-Inhibitoren **6**, **7**, **8** und **9**. Es wurde ein Ansatz mit luminogenem Suc-LLVY-Aminoluciferin-Substrat verwendet. Die Daten sind normiert auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle und werden als relative Aktivität \pm Standardabweichung dargestellt. c) Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzanstiegs mit PSE **6**, **8** und **9** bei einer Konzentration von 1 μ M und 30°C in Gegenwart von 50 μ g mL⁻¹ iCP. Die Reaktion zwischen iCP und PSE **7**, **8** und **9** sättigt nicht in der angegebenen Zeit. Die Daten in (b) und (c) sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Sulfonsäureester (PSE **1–3**) zu erzeugen.^[11] Unser Design konzentrierte sich auf fluorierte AG, die in ihrem pK_S variieren, aber ähnliche sterische Ansprüche für die Bindung aufweisen. Wir synthetisierten Sulfonylchlorid-Vorläufer von L-Leucin,^[8] die jeweils mit Phenol (pK_S = 9.9), 2,4,6-Trifluorophenol (TFP; pK_S ≈ 7.6) oder Pentafluorphenol (PFP; pK_S = 5.5) derivatisiert wurden.^[12] PFP-Ester werden als Ersatz für Carbonsäurehalogenide und Succinimid-Ester genutzt, die in Konjugationsreaktionen aufgrund ihrer Stabilität in Wasser und ihrer langen Haltbarkeit Verwendung finden.^[13] Die Phenylsulfonsäureester-Vorläufer wurden durch HATU-vermittelte Amidkupplung mit einem β 5-spezifischen CFZ-Peptidrückgrat verbunden, das durch Festphasensynthese mit Fmoc-Strategie hergestellt wurde. Diese konvergente Strategie führte zu PSE **1**, **2** und **3** (Abbildung 1). Im Anschluss wurden PSE **1**, **2** und **3** mit gereinigtem humanem cCP und fluorogenem Substrat ((7-Amino-4-Methylcumarin (AMC)) in ihrer Wirksamkeit gegen die Chymotrypsin-ähnliche (ChTL) Aktivität der Untereinheit β 5c getestet. Das nicht-fluorierte PSE **1** und das dreifach fluorierte PSE **2** hatten keinen Einfluss auf die ChTL-Aktivität (IC₅₀ > 1 mM). Bemerkenswerterweise inhibierte jedoch PSE **3** die Untereinheit β 5c erheblich (IC₅₀ = 1.12 μ M, Abbildung 1, Abbildung S1), wenn auch mit 40-fach geringerer Wirksamkeit als das entsprechende Sulfonylfluorid (IC₅₀ = 0.028 μ M).

Um den Bindemodus von PSE **3** mithilfe der Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen, inkubierten wir *Saccharomyces cerevisiae*-CP-Kristalle mit der Verbindung PSE **3**. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass der Mechanismus analog zu demjenigen der PSFs verläuft:^[8a] 1) Nach Adduktbildung am Thr1 durch Sulfonylierung wird der Inhibitor durch einen intramolekularen Angriff der Thr1-Aminofunktion abgespalten, was zur Bildung eines Aziridin-Zwischenprodukts führt (2.5 Å Auflösung, R_{frei} = 21.9 %, PDB ID: 5LAI, Abbildung S2, Tabelle ST1). 2) Daran anschließend führt eine nukleophile Ringöffnung durch die Base Lys33 zu

einer irreversiblen Vernetzung der β 5-Untereinheit (2.9 Å Auflösung, R_{frei} = 20.1 %, PDB-ID: 5LAJ, Abbildung S2, Tabelle ST1). Somit bestätigten die Strukturdaten, dass die Abspaltung der PFP-AG ein integraler Teil des Inhibitionsmechanismus ist. Da der sterische Anspruch aller verwendeten Phenylsysteme ähnlich ist, legt der Anstieg der Wirksamkeit eine direkte Korrelation zwischen dem pK_S-Wert der Abgangsgruppe und der Reaktivität des Elektrophils nahe.

Da die Freisetzung der AG eine direkte Konsequenz der Hemmung der aktiven Untereinheit ist, konnten wir darauf aufbauend PSE-Sonden entwickeln, die durch ihre Reaktion ein Messsignal erzeugen. Dafür verwendeten wir einfach nachzuweisende Fluorophore als AG, mit deren Hilfe man proteasomale Aktivität detektieren kann (PSE **4–6**). Die hier gezeigte Methode unterscheidet sich von klassischen Aktivitätsbestimmungen, die auf der Spaltung eines fluoreszenzmarkierten peptidischen Substrates basieren. Diese haben einen kontinuierlichen Substratumsatz und senden dadurch stetig Signale aus. Dagegen geben PSE-Sonden ein einziges fluoreszierendes Molekül pro aktives Zentrum bei der Reaktion ab. Somit können diese Sonden für die Evaluierung der Proteasomaktivität ohne weitere Analyse verwendet werden. Ein ähnlicher Mechanismus wird bei fluoreszenzlöschenden aktivitätsbasierten Sonden verwendet, einer Variante des aktivitätsbasierten Protein-Profilings.^[14] Diese trennen bei Inaktivierung der Protease eine fluoreszenzlöschende Abgangsgruppe ab und lassen den mit der Sonde markierten Inhibitor an das Ziel gebunden zurück.^[15]

Basierend auf dem vorherigen Ergebnis, dass ein pK_S-Bereich zwischen 4 und 6 notwendig ist, nutzten wir Methylumbelliferone (MU) als kleine signalgebende AG (PSE **4–6**, Abbildung 1). Der pK_S-Wert von MU ist durch Fluorierung einfach einstellbar und diese sind über Pechmann-Kondensation leicht zu synthetisieren.^[16] So wurden 6-Fluor-4-methylumbelliferon (FMU; pK_S = 6.4) und 6,8-Difluor-4-methylumbelliferon (DiFMU; pK_S = 4.7) hergestellt.^[16] DiFMU

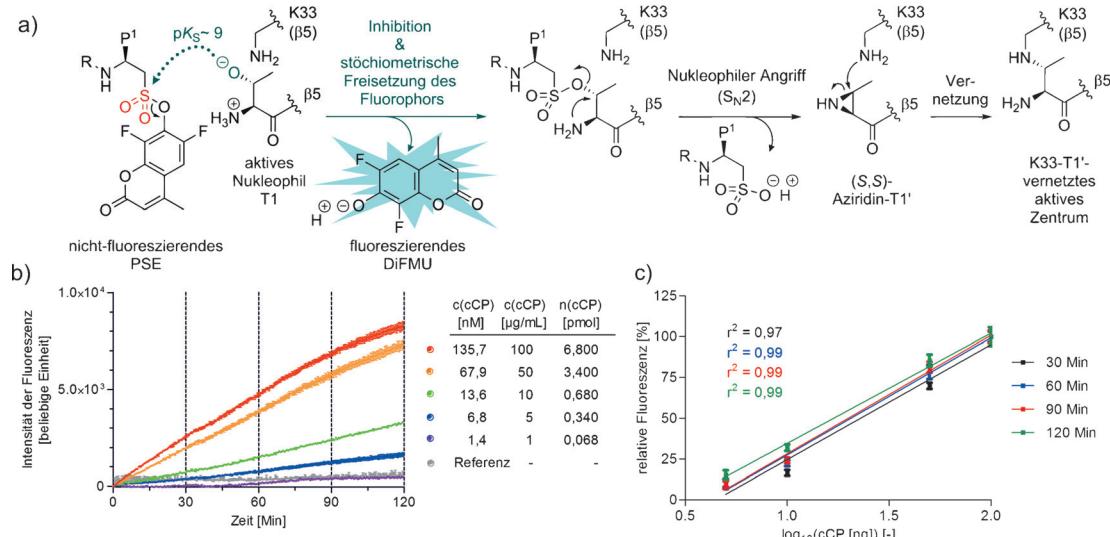


Abbildung 3. a) Vorgeschlagener Mechanismus der Reaktion zwischen PSE und dem aktiven Zentrum des Proteasoms.^[8a] R steht für das Inhibitorrückgrat, P^1 für die Seitengruppe, die in die S1-Spezifitätstasche ragt. b) Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzanstiegs mit verschiedenen cCP-Konzentrationen ($1\text{--}100 \text{ ng mL}^{-1}$ cCP) in Anwesenheit von 0.01% SDS. cCP wurde mit 100 nm PSE **6** für 2 Stunden bei 30°C und pH 7.5 gemessen (Anregung: $\lambda = 360 \text{ nm}$; Emission: $\lambda = 460 \text{ nm}$). Die Reaktion zwischen cCP und PSE **6** erreicht in der angegebenen Zeit keine Sättigung. c) Die normalisierte Fluoreszenzintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten (vertikale Linien) verhält sich linear zur cCP-Konzentration [$\mu\text{g mL}^{-1}$]. r^2 : Bestimmtheitsmaß. Daten in (b) und (c) werden als Mittelwert von Triplikaten \pm Standardabweichung dargestellt.

weist vorteilhafte photophysikalische Eigenschaften auf, zum Beispiel eine hohe Quantenausbeute ($\Phi_F = 0.89$), eine lineare Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung S3), gute Resistenz gegenüber Photobleichung^[16] und eine geringe Größe angesichts des begrenzten verfügbaren Raums im aktiven Zentrum des Proteasoms. Zudem ist DiFMU als Teil einer Sulfonsäureestergruppe nichtfluoreszierend und wird somit an Peptide gekuppelt zur Charakterisierung vieler Enzymklassen in Substratversuchen genutzt.^[17] Als Negativkontrolle verwendeten wir nichtfluoriertes PSE **4** (MU; $\text{p}K_{\text{S}} = 7.8$)^[16] (Abbildung 1). Die IC_{50} -Werte der Verbindungen wurden mithilfe von gereinigtem humanem cCP bestimmt. Dafür wurde ein Substratverdau mit lumineszierendem Aminoluciferin-Substrat verwendet, der in seiner Signalgebung orthogonal zu den freigesetzten MU-Fluorophoren ist. Entsprechend den Vorergebnissen war die DiFMU-Verbindung PSE **6** über 400-mal aktiver ($\text{IC}_{50} = 0.236 \mu\text{M}$, Morrison $K_i = 0.062 \mu\text{M}$, K_i in Abhängigkeit von $K_{\text{obs}} = 0.18 \mu\text{M}$; Abbildung S4–S6) als das einfach fluorierte PSE **5** ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) und das nichtfluorierte PSE **4** ($\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$). Inaktivierung von $\beta 1\text{c}$ (Caspase-ähnliche Aktivität, $\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$) und $\beta 2\text{c}$ (Trypsin-ähnliche Aktivität, $\text{IC}_{50} > 1 \text{ mM}$) sowie von einigen anderen Proteasen wurde nicht beobachtet (Abbildung S7). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die hier konzipierten PSE eine AG mit einem $\text{p}K_{\text{S}} < 5$ benötigen, um eine effiziente Hemmung im nanomolaren Bereich zu erzielen.

Um die DiFMU-Sulfonsäureester(DSE)-Kopfgruppe in Relation zu anderen, bereits etablierten Elektrophilen einstufen zu können, verglichen wir eine Reihe von Proteasominhibitoren in einem substratbasierten Versuch. Zu diesem Zweck evaluierten wir die Reaktivität der verschiedenen Kopfgruppen (Abbildung S8) unabhängig vom Peptidrückgrat, indem wir Inhibitoren mit der gleichen Sequenz (Z-LLL) verwendeten.^[6] In Übereinstimmung mit unseren

Kristallstrukturuntersuchungen zeigte das DSE-Elektrophil einen irreversiblen Bindemodus bei einer Aktivität zwischen Epoxyketon- und α -Ketoaldehyd-Kopfgruppen.

Für die weitere Charakterisierung der DSE-Kopfgruppe nutzten wir $\beta 5\text{i}$ -optimierte Rückgrate, um Sonden für iCP herzustellen. Das iCP ist ein potenzielles therapeutisches Angriffsziel zur Regulation der Immunantwort, da es ein Schlüsselement in der Antigenpräsentation und der Zytokinproduktion darstellt.^[18] Da das iCP in seinen Bindepräferenzen vom cCP abweicht, testeten wir Rückgrate von aktuellen iCP-selektiven Inhibitoren mit unserem Elektrophil (PSE **7–9**, Abbildung 2a). Das $\beta 5\text{i}$ -spezifische Tripeptid von LU-035i ($\text{IC}_{50} (\beta 5\text{i}) = 0.011 \mu\text{M}$)^[19] wurde als Vorlage für PSE **7** genutzt, während das Tetrapeptid in PSE **8** ($\text{IC}_{50} (\beta 5\text{i}) = 0.028 \mu\text{M}$) von ONX 0914 abgeleitet wurde.^[18a] Diese Rückgrate wurden an L-Phenylalanin- und 3-Cyclohexyl-L-Alanin-DiFMU-Vorläufer gekuppelt. Um die inhibitorische Wirkung abzuschätzen, wurden die IC_{50} -Werte von PSE **7** und **8** für $\beta 5\text{i}$ gegenüber $\beta 5\text{c}$ mithilfe von humanem iCP und cCP bestimmt (Abbildung 2b, S9). Obwohl das Rückgrat von PSE **7** identisch zu dem Epoxyketon-Äquivalent LU-035i ist, wirkte es nur über einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ inhibierend. Das ist in Übereinstimmung mit früheren Studien, die zeigten, dass für eine ausreichende Stabilisierung im aktiven Zentrum mindestens ein Tetrapeptid-Rückgrat nötig ist.^[8] Ein Vergleich des DiFMU-Sulfonsäureester-Elektrophils mit anderen Kopfgruppen ergab, dass dieses relativ langsam mit Thr1 reagiert (Abbildung S8). Hingegen blockierte PSE **8** die Untereinheit $\beta 5\text{i}$ bereits im niedrigen nanomolaren Bereich ($\text{IC}_{50} = 0.075 \mu\text{M}$) und wies eine moderate Aktivität gegenüber $\beta 5\text{c}$ auf ($\text{IC}_{50} = 2.14 \mu\text{M}$). Zusammengenommen hat PSE **8** also eine 25mal höhere Selektivität gegenüber $\beta 5\text{i}$ als PSF-Inhibitoren.^[8]

Angesichts dieser Ergebnisse wurde die Freisetzung von DiFMU durch PSE **8** in Gegenwart von iCP bestimmt. Überraschenderweise führte das veränderte Rückgrat zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals relativ zu PSE **6** (Abbildung 2c). Um die Reaktivität von PSE **6** und **8** unabhängig von der Bindung an das Proteasom zu vergleichen, untersuchten wir deren Sensitivität gegenüber Hydrolyse bei unterschiedlichen pH-Werten (Abbildung S10). PSE **8** (P1-Phenylalanin) war tatsächlich trotz der identischen Kopfgruppe anfälliger für Hydrolyse als PSE **5** (P1-Leucin). Dieser unerwartete Beitrag der P1-Seitenkette zu der Reaktivität der Sonde weist auf eine zusätzliche Möglichkeit zur Feineinstellung des Inhibitors hin. Diese Annahme wurde durch die Synthese von PSE **9** verifiziert, das sich nur in der P1-Position von PSE **8** unterscheidet. Da wir davon ausgehen, dass die zusätzliche Reaktivität von PSE **8** auf das elektronenreiche P1-Arylsystem zurückzuführen ist, tauschten wir das Phenylalanin in PSE **9** durch einen gesättigten Cyclohexylrest aus. Während diese Substitution keinen Effekt auf β 5i- und β 5c-Inhibition hatte (IC_{50} (β 5i) = 0.092 μ M, IC_{50} (β 5c) = 2.46 μ M), zeigte PSE **9** in pH-abhängigen Versuchen eine ähnliche Hydrolyserate wie PSE **6** (Abbildung S10). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Reaktivität zusätzlich von der P1-Seitenkette beeinflusst wird. Bemerkenswerterweise ermöglicht die hohe Empfindlichkeit – die auf die Freisetzung eines einzigen Fluorophors bei Inhibition zurückgeht – die Detektion dieser sehr geringen Aktivitätsänderungen, welche mit substratbasierten Methoden nicht sichtbar sind.

Basierend auf dem hier vorgeschlagenen Mechanismus korreliert jeder freigesetzte DiFMU-Fluorophor mit einem inhibierten aktiven Zentrum des Proteasoms, denn es findet nur ein einmaliger Umsatz am aktiven Zentrum statt (Abbildung 3a). Diese spezifische Eigenschaft nutzten wir zur Quantifizierung der Menge an inhibiertem und damit an vorhandenem CP, da das Fluoreszenzsignal proportional dazu ansteigen sollte. iCP-spezifische Gewebe sind jedoch nur schwierig in ausreichenden Mengen zu erwerben. Somit reinigten wir für quantitative Messungen humanes cCP aus Erythrozyten und verwendeten PSE **6** als eine geeignete Sonde. DiFMU-Emission wurde bei physiologisch relevanten cCP-Konzentrationen gemessen (ca. 190 nm \pm 140 μ g mL $^{-1}$ in lebenden Zellen),^[20] während die Konzentration an PSE **6** konstant gehalten wurde (100 nm: Abbildung 3b, 1 μ M: Abbildung S11). Wir beobachteten die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 2 Stunden und fanden, dass sich das Signal linear mit zunehmenden Mengen an cCP über die Zeit intensivierte (Abbildung 3b). Die cCP-Mengen konnten quantitativ über das Fluoreszenzsignal bestimmt werden (Abbildung S12). Dafür waren Konzentrationen von PSE **6** unterhalb seines IC_{50} -Wertes ausreichend (100 nm PSE, Abbildung 3c); bei diesen Mengen ist die Hintergrundfluoreszenz durch Hydrolyse vernachlässigbar (Abbildung S12). Bemerkenswerterweise war das Signal bis zu einer Konzentration von 5 μ g mL $^{-1}$ cCP messbar. Dies entspricht einer absoluten Proteinmenge von 340 fmol in einem Probenvolumen von 50 μ L, die ohne jegliche Signalamplifikation nachweisbar ist.

Um sicherzustellen, dass die Fluoreszenz nicht von unspezifischen Reaktionen der PSE-Sonde **6** mit nukleophilen

Seitenketten des Proteins stammt, nutzten wir Rinderserumalbumin (BSA) als Negativkontrolle. Das Fluoreszenzsignal in Gegenwart von BSA war vergleichbar mit der Hintergrundhydrolyse (Abbildung S13). Um zu verifizieren, dass die Signalentstehung bei Spaltung von PSE **6** auch wirklich auf CP-Aktivität zurückzuführen ist, inaktivierten wir letzteres vor der Messung mit verschiedenen, gut charakterisierten Proteasominhibitoren (je 50 μ M, Abbildung S14). Wir konnten zeigen, dass vorinkubierte CP-Proben eine stark reduzierte Fluoreszenz aufweisen (Abbildung S14). Dies bestätigte, dass die Freisetzung des Fluorophors von PSE **6** direkt mit dem inhibitorischen Mechanismus zusammenhängt und Rückschlüsse auf die aktive Konzentration von CP in der Probe gezogen werden können. Jedoch ist die Verwendbarkeit von PSE als Sonden in Zellen oder in Zelllysaten bislang eingeschränkt, da unter anderem physiologische Mengen an beispielsweise Glutathion das Signal verfälschen (Abbildung S15).

Zusammengefasst beschreiben wir hier eine neue Klasse von Inhibitoren für das konstitutive und das Immunoproteasom, deren Wirksamkeit über die Wahl der AG reguliert werden kann. Durch Verwendung von Fluorophoren als AG konnten wir Sonden herstellen, die ein einfach detektierbares Signal freisetzen, das die direkte Bestimmung der relativen proteasomalen Aktivität und Konzentration in Lösung ermöglicht. Die hier vorgestellte Methode ist präzise und empfindlich, da weder Verknüpfungselemente oder Abstandhalter zwischen Fluorophor und Inhibitor noch eine nachgeschaltete Signalamplifikation benötigt werden. Unsere Ergebnisse deuten an, dass Sulfonsäureester mit DiFMU als Elektrophil eine den Sulfonylfluoriden ähnliche Reaktivität zeigen. Prinzipiell ist die hier vorgestellte Strategie zur Entwicklung von Fluoreszenzsonden auf andere Sulfonylfluorid-basierte Inhibitoren, eine weit verbreitete und vielfältig angewandte Substanzklasse, übertragbar.^[21]

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch den SFB 749/A10 finanziert. Wir bedanken uns bei Richard Feicht und Dr. Sabine Schneider für Hilfe bei den Experimenten und bei unseren Studierenden: Regina Baur, Josef Braun, Theresa Rauh und Michael Heilmann. Wir danken der Belegschaft an der PXI am Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für ihre Hilfe bei der Datensammlung.

Stichwörter: Fluoreszenzsonden · Inhibitoren · Proteasom · Sondenentwicklung · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13330–13334
Angew. Chem. **2016**, *128*, 13524–13528

- [1] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 785–799.
- [2] E. M. Huber, W. Heinemeyer, X. Li, C. S. Arendt, M. Hochstrasser, M. Groll, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10900.
- [3] A. F. Kisselev, Z. Songyang, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14831–14837.
- [4] P. G. Richardson, T. Hidemitsu, K. C. Anderson, *Cancer Control* **2003**, *10*, 361–369.

- [5] 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.
- [6] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Krüger, M. Groll, B. Schmidt, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679–1683; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1705–1709.
- [7] M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 58–66.
- [8] a) C. Dubiella, H. Cui, M. Gersch, A. J. Brouwer, S. A. Sieber, A. Krüger, R. M. J. Liskamp, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11969–11973; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12163–12167; b) A. J. Brouwer, A. Jonker, P. Werkhoven, E. Kuo, N. Li, N. Gallastegui, J. Kemmink, B. I. Florea, M. Groll, H. S. Overkleeft et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10995–11003.
- [9] a) R. A. Smith, L. J. Copp, P. J. Coles, H. W. Pauls, V. J. Robinson, R. W. Spencer, S. B. Heard, A. Krantz, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4429–4431; b) A. Krantz, L. J. Copp, P. J. Coles, R. A. Smith, S. B. Heard, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4678–4687; c) B. R. Ullman, T. Aja, T. L. Deckwerth, J. L. Diaz, J. Herrmann, V. J. Kalish, D. S. Karanewsky, S. P. Meduna, K. Nalley, E. D. Robinson et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3623–3626.
- [10] a) R. R. Manam, K. A. McArthur, T.-H. Chao, J. Weiss, J. A. Ali, V. J. Palombella, M. Groll, G. K. Lloyd, M. A. Palladino, S. T. C. Neuteboom et al., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6711–6724; b) M. Groll, K. A. McArthur, V. R. Macherla, R. R. Manam, B. C. Potts, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5420–5428.
- [11] S. C. Miller, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4632–4635.
- [12] W. A. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5419–5422.
- [13] a) J. Bornholdt, K. Wilhemsen, J. Felding, J. Langgaard, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9280–9284; b) S. Caddick, J. D. Wilden, D. B. Judd, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1024–1025.
- [14] a) A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686–4687; b) G. de Bruin, B. T. Xin, M. Kraus, M. van der Stelt, G. A. van der Marel, A. F. Kisseelev, C. Driessens, B. I. Florea, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 4199–4203; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 4271–4275; c) N. Li, C.-L. Kuo, G. Paniagua, H. van den Elst, M. Verdoes, L. I. Willems, W. van der Linden, M. Ruben, E. van Genderen, J. Gubbens et al., *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1155–1168; d) C. Gu, I. Kolodziejek, J. Misas-Villamil, T. Shindo, T. Colby, M. Verdoes, K. H. Richau, J. Schmidt, H. S. Overkleeft, R. A. L. Van Der Hoorn, *Plant J.* **2010**, *62*, 160–170.
- [15] a) G. Blum, S. R. Mullins, K. Keren, M. Fonovič, C. Jedeszko, M. J. Rice, B. F. Sloane, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 203–209; b) G. Blum, G. von Degenfeld, M. J. Merchant, H. M. Blau, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 668–677; c) L. E. Edgington, A. B. Berger, G. Blum, V. E. Albrown, M. G. Paulick, N. Lineberry, M. Bogyo, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 967–973; d) S. Serim, U. Haedke, S. H. L. Verhelst, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1146–1159; e) M. Verdoes, S. H. L. Verhelst, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2016**, *1864*, 130–142; f) M. Hu, L. Li, H. Wu, Y. Su, P. Y. Yang, M. Uttamchandani, Q. H. Xu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12009–12020.
- [16] W. C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107–3110.
- [17] a) C. C. Fjeld, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20336–20343; b) V. Ahmed, M. Ispahany, S. Ruttgaez, G. Guillemette, S. D. Taylor, *Anal. Biochem.* **2005**, *340*, 80–88; c) Y. Ge, E. G. Antoulinakis, K. R. Gee, I. Johnson, *Anal. Biochem.* **2007**, *362*, 63–68.
- [18] a) 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; b) M. Groettrup, C. J. Kirk, M. Basler, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 73–78.
- [19] G. De Bruin, E. M. Huber, B.-T. Xin, E. J. van Rooden, K. Al-Ayed, K.-B. Kim, A. F. Kisseelev, C. Driessens, M. Van Der Stelt, G. A. van der Marel et al., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6197–6209.
- [20] a) S. Asano, Y. Fukuda, F. Beck, A. Aufderheide, F. Förster, R. Danev, W. Baumeister, *Science* **2015**, *347*, 439–442; b) P. Beck, H. Cui, J. D. Hegemann, M. A. Marahiel, A. Krüger, M. Groll, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1969–1973.
- [21] a) D. A. Shannon, C. Gu, C. J. McLaughlin, M. Kaiser, R. A. L. van der Hoorn, E. Weerapana, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2327–2330; b) J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750; c) A. Narayanan, L. H. Jones, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2650–2659.

Eingegangen am 14. Juni 2016,
veränderte Fassung am 20. Juli 2016
Online veröffentlicht am 22. September 2016