



Eine niedermolekulare Verbindung inhibiert die Proteindisulfid-isomerase und sensibilisiert Krebszellen für die Chemotherapie**

Jürgen Eirich, Simone Braig, Liliana Schyschka, Phil Servatius, Judith Hoffmann, Sabrina Hecht, Simone Fulda, Stefan Zahler, Iris Antes, Uli Kazmaier, Stephan A. Sieber* und Angelika M. Vollmar*

Abstract: Die Entwicklung von Resistzenzen gegen Chemotherapeutika stellt eine der größten Herausforderungen der Krebsforschung dar. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist, Chemotherapeutika zusammen mit Verbindungen zu verabreichen, die Zellen gegen die Medikamente sensibilisieren und Apoptose induzieren. Wir beschreiben die Entdeckung einer neuen Substanzklasse (**T8**), die verschiedene Krebszellen gegen subtoxische Konzentrationen von Etoposid sensibilisiert. Durch Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass die Proteindisulfidisomerase (PDI) das alleinige Ziel der **T8**-Verbindungen ist. Detaillierte biologische und chemische Studien wie die Optimierung der Molekülstrukturen, Docking-Analysen, Fluoreszenzmikroskopie und Apoptoseuntersuchungen belegen den Wirkmechanismus der reversiblen Inhibition der PDI und zeigen eine erhöhte Stressantwort im endoplasmatischen Retikulum durch **T8**.

Resistzenzen gegenüber Medikamenten können bei Tumorzellen durch zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen hervorgerufen werden und dazu führen, dass Apoptosesignalwege und die zelluläre Stressantwort im endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht mehr korrekt ablaufen.^[1] Durch ihr Wachstumsverhalten sind Krebszellen auf eine erhöhte Proteinproduktion angewiesen und reagieren auf den dadurch gesteigerten ER-Stress mit der Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR), welche durch Cha-

perone wie der Proteindisulfidisomerase (PDI) herbeigeführt wird.^[1c,2]

Da Chaperone die Homöostase im ER erhalten und so das Überleben und die Teilung von Krebszellen unterstützen, liegt ein gesteigertes Interesse darin, diese Proteine zu inhibieren und somit auch gegen Chemoresistzenzen vorzugehen. Die PDI ist dabei besonders in den Fokus geraten. Kürzlich wurde zudem eine Kristallstruktur der oxidierten und reduzierten Form dieses Enzyms veröffentlicht.^[3] Die Isomerase ist in vier Domänen gegliedert, die mit a, a' und b, b' bezeichnet werden. a und a' sind dabei katalytisch aktiv und zeigen eine große Homologie zueinander. Die PDI katalysiert den Austausch von Thiolen und Disulfiden sowohl intra- als auch intermolekular.^[4] Das Enzym spielt nicht nur bei Krebs, sondern auch im Zusammenhang vieler weiterer Krankheiten eine entscheidende Rolle, was erst kürzlich im Detail besprochen wurde.^[5] Obwohl in den letzten Jahren mehrere Inhibitoren der PDI vorgestellt wurden,^[6–12] zeigen die spezifischeren Substanzen – 16F16, RB-11-ca, PACMA31 und P1 – eine pharmakologisch nachteilige irreversible Wirkungsweise. Wir stellen hier neuartige, reversible und hoch spezifische PDI-Inhibitoren vor, die Tumorzellen für klassische Chemotherapeutika sensibilisieren.

Substanzen aus einer kommerziell erhältlichen Sammlung (Asinex) wurden in Kombination mit Etoposid in verschiedenen humanen Krebslinien auf ihren chemosensibilisierenden

[*] Dr. J. Eirich,^[§] Prof. Dr. I. Antes, Prof. Dr. S. A. Sieber
Center for Integrated Protein Science Munich CIPSM
Department Chemie, Institute of Advanced Studies IAS
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: stephan.sieber@tum.de

Dr. S. Braig,^[+] Dr. L. Schyschka, Prof. Dr. S. Zahler,
Prof. Dr. A. M. Vollmar
Department Pharmazie, Center for Drug Research
Pharmazeutische Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: angelika.vollmar@cup.uni-muenchen.de

P. Servatius, J. Hoffmann, Prof. Dr. U. Kazmaier
Institut für Organische Chemie, Universität des Saarlandes
Im Stadtwald, Geb. C4.2, 66123 Saarbrücken (Deutschland)
Prof. Dr. S. Fulda

Institut für Experimentelle Tumorforschung in der Pädiatrie
Universitätsklinikum Frankfurt

Komturstraße 3a, 60528 Frankfurt a. M. (Deutschland)

S. Hecht, Prof. Dr. I. Antes
Department Biowissenschaftliche Grundlagen

Technische Universität München

Emil-Erlenmeyer-Forum 8, 85354 Freising-Weihenstephan
(Deutschland)

[§] Derzeitige Adresse: Department of Oncology/Pathology
Cancer Proteomics Mass Spectrometry, SciLifeLab Stockholm
Karolinska Institutet
Tornedebodavägen 23, 17165 Solna (Schweden)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
[**] Wir danken Mona Wolff, Katja Bäuml und Burghard Cordes für die exzellente Unterstützung und Dr. Hermann Stuppner (Universität Innsbruck) sowie Dr. Thierry Langner (Universität Wien) für die gute Zusammenarbeit. S.A.S. wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, SFB749, SFB1035, FOR1406, einem ERC starting grant und dem Center for Integrated Protein Science Munich CIPSM unterstützt. J.E. dankt der TUM Graduate School. A.M.V. dankt der DFG und der Wilhelm Sander-Stiftung für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (zu Synthese und Charakterisierung der Verbindungen, biologischen Experimenten, Zellbiologie, Proteomherstellung und -markierung sowie Massenspektrometrie) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406577> zu finden.

den Effekt hin untersucht. Dabei zeigte sich **T8** als vielversprechende Leitstruktur. **T8** führt bei einer Mindestkonzentration von $25 \mu\text{M}$ dosisabhängig in Kombination mit einer per se nichttoxischen Konzentration von 500nM Etoposid zu einer erhöhten Apoptoserate der behandelten Leukämiezelllinie Jurkat und der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (Abbildung 1A). Darüber hinaus zeigt sich in einem Langzeit-Proliferationsversuch, dass das Überleben von Jurkat-Zellen über mehrere Tage durch die gemeinsame Gabe von Etoposid und **T8** für nur 4 h synergistisch gehemmt wird (Abbildung 1B). Das Wachstum verschiedener Karzinomzelllinien, wie LNCAP (Prostata) oder PancTu1 und L3.6pl (Pankreas), wurde durch die Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika, zum Beispiel Doxorubicin oder TRAIL, mit **T8** stark inhibiert (Abbildungen S1 und S2). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei nicht transformierten humanen Primärendothelzellen (HUVEC) weder ein antiproliferativer Effekt bei der Kombination von **T8** mit Etoposid noch mit Doxorubicin (Abbildung S3). Mittels Western-Blot konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation der Jurkat-

Zellen mit **T8** in Kombination mit Etoposid wichtige Apoptosemarker, wie etwa die Spaltung von PARP, oder die Aktivität von Caspase 3 und 9, signifikant gesteigert wurden (Abbildung 1C). Eine Vorbehandlung mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVADfmk hebt die Wirkung von **T8** auf, was zeigt, dass der chemosensibilisierende Effekt der Verbindung abhängig von der Caspaseaktivität ist (Abbildung 1D). Zusätzliche Daten belegen, dass die Wirksamkeit von **T8** in Kombination mit Etoposid auf eine erhöhte Caspase-3- und Caspase-9-Aktivierung zurückzuführen ist (Abbildung S4). Weiterhin unterdrückt **T8** gemeinsam mit dem Topoisomerase-Inhibitor das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen (L3.6pl), welche auf die chorioallantoide Membran (CAM) eines Hühnerembryos implantiert wurden (Abbildung 1E). Repräsentative Bilder der Hämatoxylin/Eosin-Färbung des Gewebes verdeutlichen den antiproliferativen Effekt, den die Kombinationstherapie aus **T8** und Etoposid aufweist.

Um die Zielproteine von **T8** identifizieren zu können, wurde ABPP („activity-based protein profiling“) durchgeführt.^[13] Dazu wurde das Grundgerüst der Leitverbindung mit

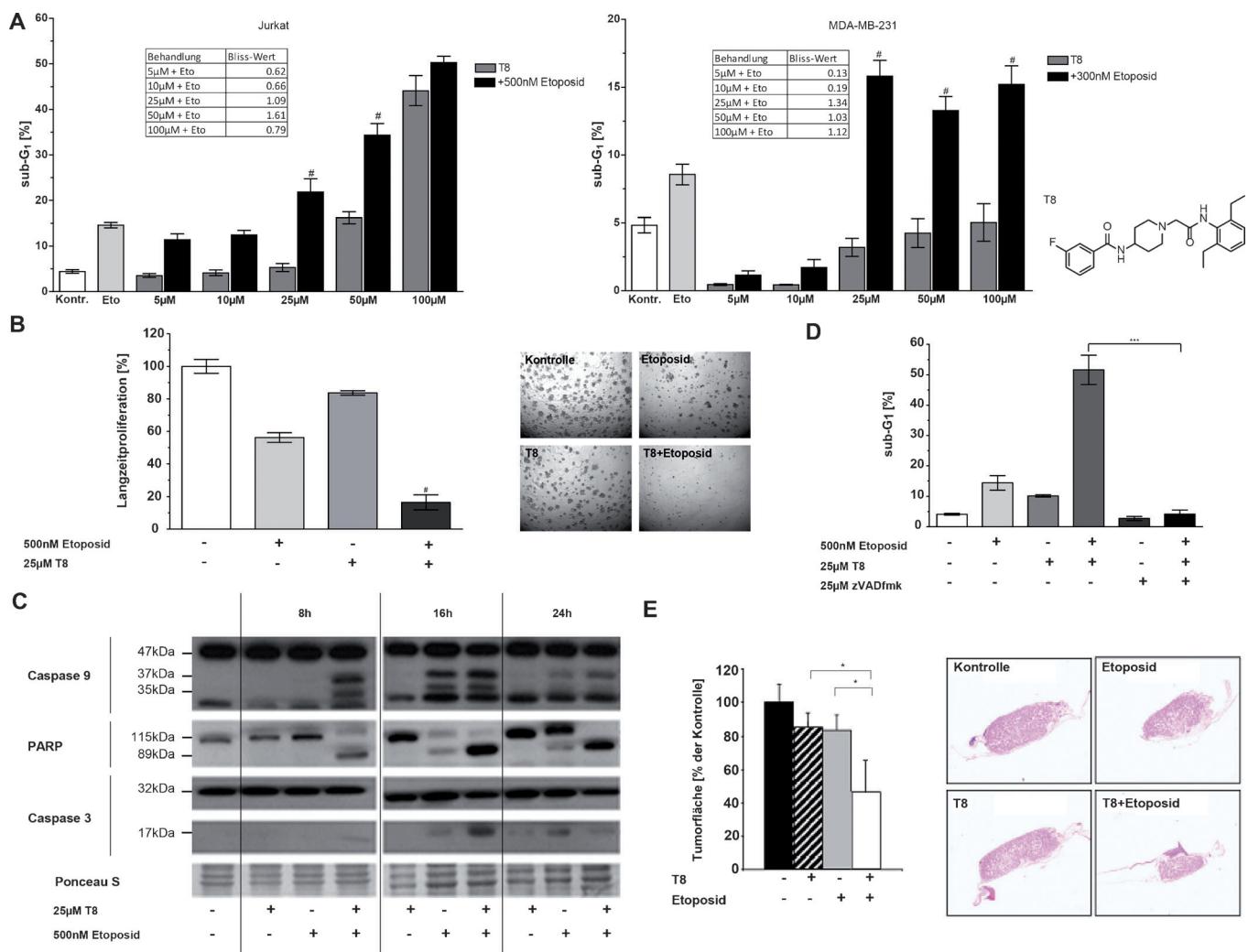


Abbildung 1. T8 sensibilisiert Krebszelllinien gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Etoposid. A) Apoptose-Assay mittels FACS-Analyse; Molekülstruktur von **T8**. B) Langzeit-Proliferationsassay an nach Behandlung. C) Caspase-Aktivierung (Western-Blot-Experimente). D) Effekt der Caspase-Inhibition durch zVADfmk. E) Einfluss von T8 auf das CAM-basierte Tumorwachstum (L3.6pl-Pankreaskarzinomzellen). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. # zeigt Synergie.

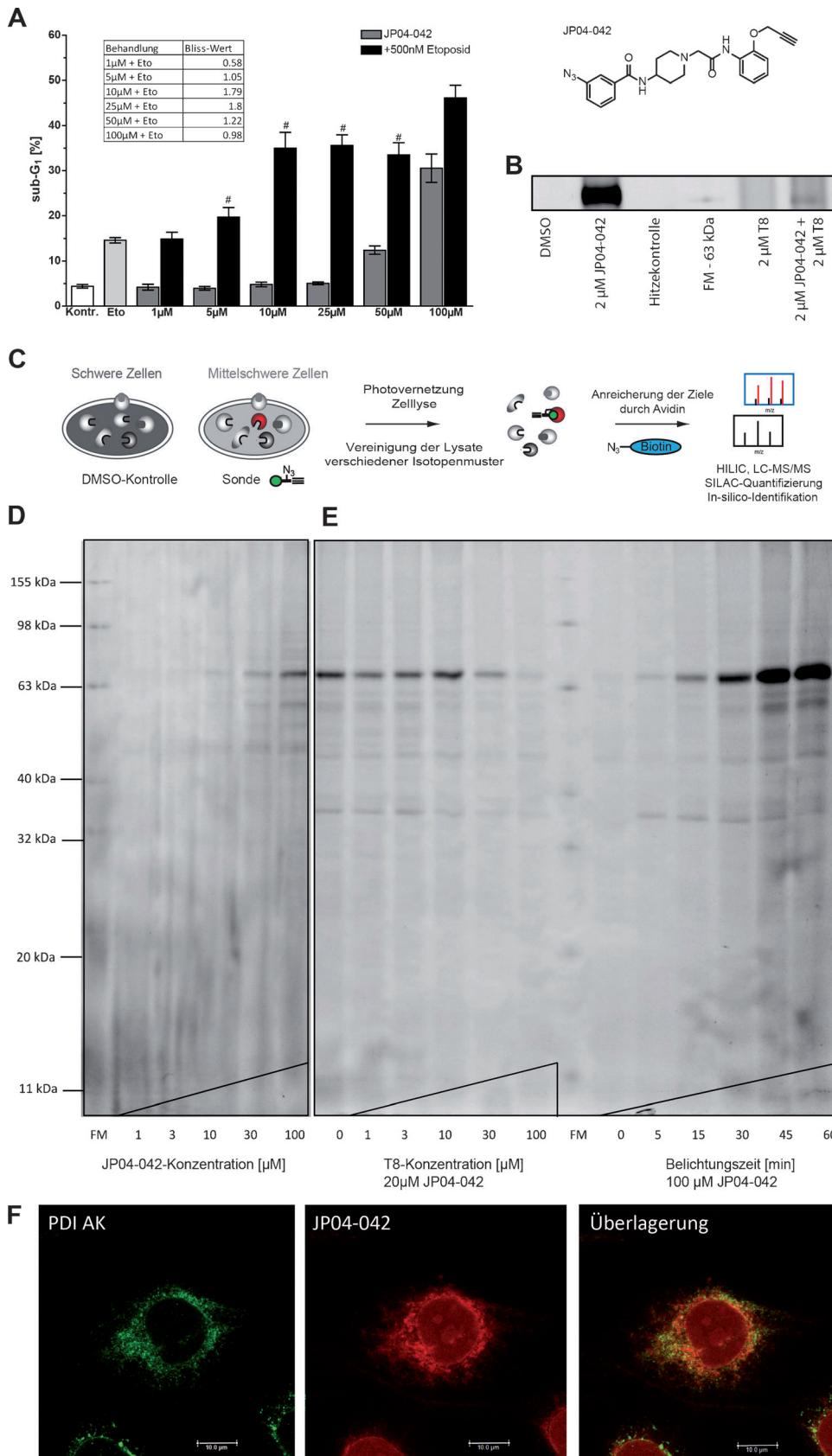


Abbildung 2. Proteinmarkierung, Zielidentifizierung und -validierung. A) Molekülstruktur der Photosonde **JP04-042**. Effekt auf die Apoptose durch **JP04-042** alleine und in Kombination. # zeigt Synergie. B) Markierung der rekombinanten PDI mit **JP04-042** und **T8**. FM: Fluoreszenzmarker C) Experimenteller Aufbau der Arbeitsschritte zur Zielidentifizierung. D) Konzentrationsabhängige Markierung von MDA-MB-231-Zellen mit **JP04-042**. E) links: Verdrängungsstudien: 20 μM Photosonde, ansteigende Konzentrationen von **T8**; rechts: zeitabhängige Markierung 100 μM Sonde HeLa-Zellen. F) PDI Färbung mit spez. Antikörper (grün; links) oder **JP04-042** (rot; mittig). Überlagerte Fluoreszenzaufnahmen (rechts) zeigen Kolokalisation von PDI mit **JP04-042**.

einem terminalen Alkin und einer lichtreaktiven Gruppe versehen (**JP04-042**, Abbildung 2A).

Interessanterweise führten diese Modifikationen sogar zu einer erhöhten chemosensibilisierenden Wirkung von **JP04-042** (Abbildung 2A, S4C).

Aufbauend darauf wurden die humanen Krebszelllinien MDA-MB-231 und HeLa mit der Photosonde inkubiert. Die Verbindung wurde durch UV-Bestrahlung *in situ* mit ihren zellulären Zielen vernetzt. Nach der Zellyse wurde ein azidfunktionalisierter Rhodamin-Reporterfarbstoff mittels Klick-Chemie^[14] (CC) eingeführt, um potenzielle Zielmoleküle über Fluoreszenz nach einer Gelelektrophorese zu detektieren (Abbildung 2C). Verschiedene Konzentrationen von **JP04-042** (Abbildung 2D) und Belichtungszeiten (Abbildung 2E, rechter Teil) wurden untersucht. Es zeigte sich dabei eine dominante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 63 kDa, die die Annahme nahelegt, dass die Sonde fast ausschließlich ein zelluläres Zielprotein aufweist. Um zu untersuchen, ob die Photosonde und das Ursprungsmolekül **T8** dasselbe Zielmolekül binden, wurde ein Verdrängungsexperiment in HeLa-Zellen durchgeführt. Bei einer unveränderten Konzentration von **JP04-042** wurde die Konzentration von **T8** variiert. Bereits ein 1.5-facher Überschuss von **T8** (30 µM) gegenüber **JP04-042** (20 µM) zeigte eine Verringerung der Signalintensität der Proteinbande (Abbildung 2E, linker Teil). Anschließend wurde zur Identifizierung der Zielmoleküle die Methode des SILAC herangezogen und dazu MDA-MB-231-Brustkrebszellen mit Aminosäuren markiert, die ein „schweres“ oder „mittelschweres“ unnatürliches Isotopenmuster tragen. Nach UV-Vernetzung und Zellyse wurden durch CC entweder ein Biotin-PEG-Azid oder ein trifunktioneller Linker eingeführt.^[15] Markierte Proteine wurden durch einen Biotin-Avidin-„Pull-down“ angereichert. Die Proteine wurden entweder durch Gelelektrophorese aufgetrennt oder durch tryptischen Verdau direkt für die Massenspektrometrie vorbereitet. Alle Experimente zeigten unabhängig voneinander, dass die Proteindisulfidisomerase (PDI), bzw. einige ihrer Isoformen, stark angereichert werden konnten. (Tabelle 1 zeigt eine Auswahl, die Tabellen S1–S4 enthalten die vollständigen Listen und sind nach dem Anreicherungsfaktor sortiert.) Zur Validierung der Zielstruktur konnte sowohl eine Markierung rekombinant hergestellter PDI als auch deren Inhibition *in vitro* durch **JP04-042** gezeigt werden. Das rekombinante Protein konnte mit der Sonde markiert werden und das Fluoreszenzsignal verschwindet sowohl bei einer Vorbehandlung mit **T8** als auch durch Denaturierung des Proteins mittels Hitzeeinwirkung. Dies legt nahe, dass die

Verbindungen spezifisch mit dem intakten, aktiven Enzym wechselwirken (Abbildung 2B).

Um die PDI als potenzielles Zielprotein des **T8**-Derivates **JP04-042** zu verifizieren, wurde zudem eine Parallelfärbung von intakten Zellen mit der Sonde und einem proteinselektiven Antikörper durchgeführt. Dazu wurden intakte MDA-MB-231-Zellen mit der Sonde inkubiert und belichtet, um das Molekül kovalent an sein Zielprotein zu binden. Die Zellen wurden fixiert. Zur Visualisierung von Sonde, Zellkern und potenziellem Zielprotein wurden CC, eine Hoechst DNA-Färbung und ein PDI-spezifischer Antikörper verwendet. Kontrollexperimente, bei denen nur die Reagentien für die CC aber keine Sonde verwendet wurden, zeigten, dass der Rhodaminfarbstoff ein äußerst schwaches Hintergrundsignal hervorruft (Abbildung S5). Die Kofärbung des PDI-spezifischen Antikörpers mit der farbstoffmarkierten Sonde weist darauf hin, dass **JP04-042** an PDI bindet (Abbildung 2F).

Um die Beziehung zwischen Struktur und Aktivität (SAR) der von **T8** abgeleiteten *N*-(1(2-(R²amino)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)R¹amid-Kernstruktur untersuchen zu können, wurden verschiedene neue Analoga hergestellt, die unterschiedliche Substitutionsmuster an den beiden aromatischen Ringen tragen (Abbildung 3A). Unter diesen Verbindungen zeigte **PS89**, das eine große Ähnlichkeit mit **T8** aufweist und bei dem lediglich das Fluorid in R¹ durch eine Azidgruppe ersetzt wurde, die höchste sensibilisierende Aktivität aller Derivate in den Apoptoseuntersuchungen mit Jurkat-Zellen (Abbildungen 3B und C). Darüber hinaus ist die Verbindung, wie für PDI-Inhibition beschrieben, bei Konzentrationen über 50 µM toxisch. Im Gegensatz dazu zeigt **PS88** keine synergistischen Effekte mit Etoposid, was nahelegt, dass die 3,4-Dimethyl-Substitution im R²-Ring weniger vorteilhaft ist als die 2,6-Diethyl- oder 2-Propargylether-Funktionalisierung, wie sie bei den aktiven Substanzen auftritt. Ähnliche Tendenzen sind auch in anderen Tumorzellen zu beobachten. Dies ist für MDA-MB-231-Zellen in den Abbildungen S4D und E gezeigt. Um nachzuweisen, dass **PS89** in Kombination mit Etoposid in Tumorzellen ER-Stress hervorruft, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Die Behandlung von MDA-MB-231-Zellen mit Etoposid und **PS89** führt zu einer erhöhten Expression von Proteinen, die eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung von ER-Stress spielen, wie beispielsweise p-eIF2α, BiP/GRP78 und CHOP (Abbildung S6).

Um zu untersuchen, ob die Wechselwirkung von **T8** und den Derivaten mit der PDI zu einer Inhibition der enzymatischen Aktivität führt, wurde mit allen Substanzen ein In-

Tabelle 1: Ausgewählte Treffer aus den quantitativen Vollproteomanreicherungen und der Gel-basierten Analyse aus isotopenmarkierten MDA-MB-231-Zellen.^[a]

Uniprot ID	Beschreibung		x-fache Anreicherung			MW [kDa]
			Sonde/DMSO	Gel-basiert	Gel-frei, Replikat	
			1	2	3	
P07237	Proteindisulfidisomerase		26	56	41	57.1
B3KQT9	cDNA PSEC0175 fis, Klon OVARC1000169, sehr ähnlich zu Proteindisulfidisomerase A3	18		13	11	54.1
P13667	Proteindisulfidisomerase A4			31	3	72.9

[a] Vollständige Listen sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

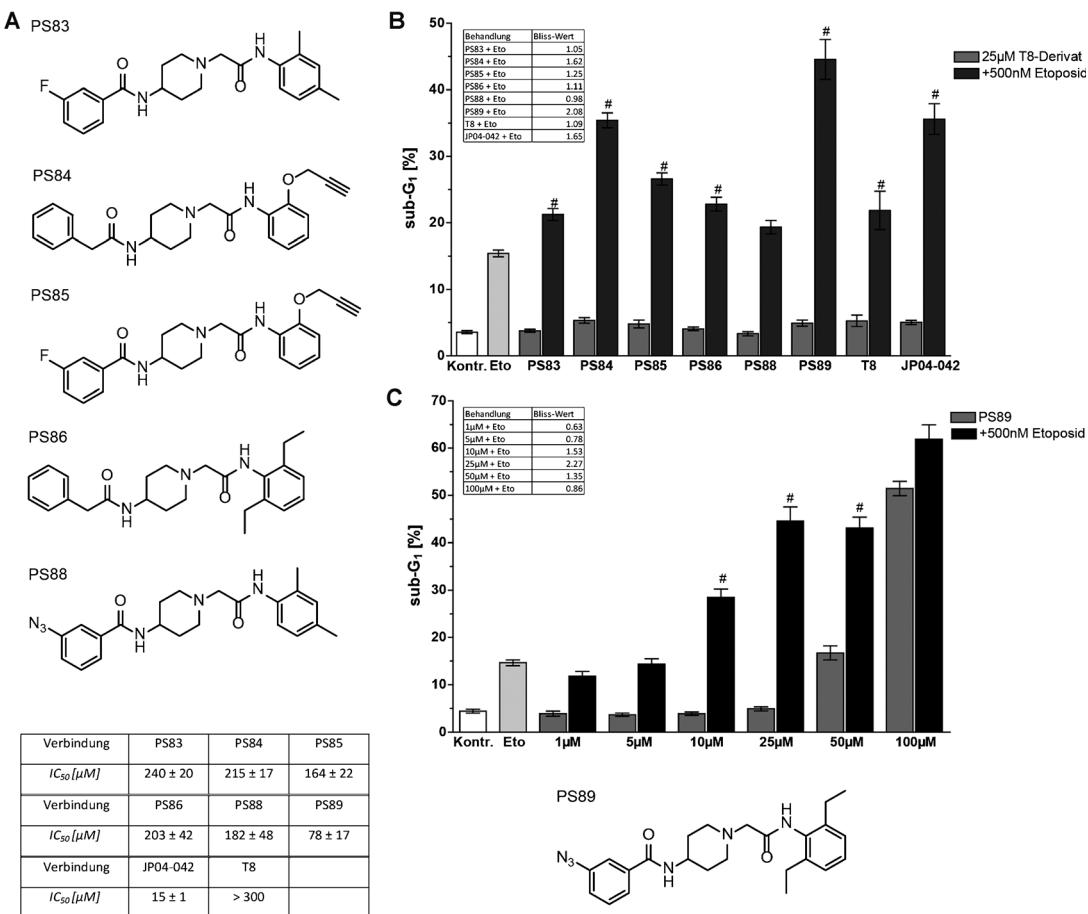


Abbildung 3. T8-Derivate, Inhibition der rekombinanten PDI und Apoptose-Assays. A) Molekülstrukturen weiterer T8-Derivate (PS83-PS89) und entsprechende IC_{50} -Werte für die In-vitro-PDI-Inhibition. B) Apoptose der T8 Derivate PS83-PS89 in Jurkat-Zellen +/- Etoposid. C) PS89 führt dosisabhängig zur Apoptoseinduktion +/- Etoposid. # zeigt Synergie.

sulinreduktionsassay^[16] durchgeführt (Tabelle in Abbildung 3A). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass **T8** ein schwacher Inhibitor der PDI-Reduktaseaktivität unter diesen Bedingungen ist. Die wirksameren Analoga, wie die Sonde **JP04-042** oder **PS89** zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition mit IC_{50} -Werten von bis zu 15 µM.

Die unterschiedlichen Inhibitionseigenschaften konnten durch molekulare Docking-Studien von **JP04-42**, **PS89** und **T8** für die beiden katalytisch aktiven Domänen a und a' und deren weitere Umgebung (± 40 Å) erklärt werden. Dabei zeigten sich zwei bevorzugte Bindestellen in direkter Nähe (± 40 Å) beider katalytischer Zentren (Abbildung S8). Eine nähere Betrachtung der beiden Stellen zeigt erweiterte exponierte Furchen, die auf der Vorder- und Rückseite der katalytischen Cysteine liegen (Abbildung 4A und B, sowie S9). Es gibt jedoch klare Unterschiede in den Bindungseigenschaften von **JP04-42** und **PS89** im Vergleich zu **T8**. Einige der Dockingposen für die zehn energetisch besten Strukturen von **JP04-042** und **PS89** zeigen, dass die Verbindungen das katalytische Zentrum abschirmen, was wiederum eine Voraussetzung für eine starke Inhibition ist. Im Gegensatz dazu bindet **T8** tief in die Furchen neben den katalytischen Zentren (Abbildung 4C und D). **JP04-42** und **PS89** tragen einen Azidsubstituenten, der perfekt in die elektrostatisch kom-

plementäre tiefe Nebentasche der Bindefurche vor den katalytischen Zentren von a und a' passt (Abbildung 4C und D, sowie S10). Die Diethylphenyl-Gruppe von **T8** hingegen bindet bevorzugt an die hydrophobe Proteinwechselwirkungsstelle innerhalb der Bindefurche. Somit kann **T8** als allosterischer Inhibitor betrachtet werden, der die Substrat-bindung beeinträchtigt ohne dabei die katalytischen Cysteine zu blockieren. Obwohl **T8** eine andere Art der Bindung aufweist, überlappt es teilweise in der Bindetasche mit **JP04-42** und **PS89**, was die beobachtete Verdrängung des Inhibitors (Abbildung 4C) erklärt. Darüber hinaus könnte diese andersartige Bindung von **T8** die Unterschiede in den IC_{50} -Werten bedingen, die im Insulinreduktionsassay bestimmt wurden (siehe die Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend charakterisieren also die eindeutige Spezifität für die PDI, die bisher beispiellose Art der Inhibition und die starke Sensibilisierung von Krebszelllinien in verschiedensten Experimenten **T8** und dessen optimierte Derivate als äußerst vielversprechende Kandidaten für die weitere pharmazeutische Testung. Die meisten der bisher beschriebenen PDI-Inhibitoren binden das Enzym irreversibel oder zeigen eine geringe Selektivität. Beide Faktoren sind für eine medizinische Anwendung ungünstig. Die außerordentliche Spezifität und die reversible Wirkweise unserer **T8**-

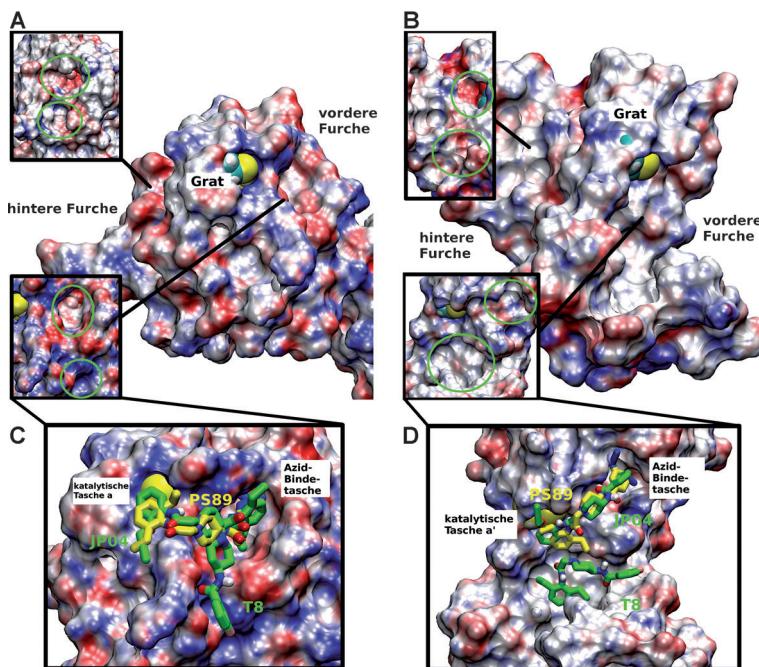


Abbildung 4. Docking-Experimente. Bindungsstellen nahe der katalytischen Zentren der Domänen a) und a'). Die beiden eingebetteten Bilder zeigen die hintere (oben) und die vordere (unten) Bindefurche aus der jeweiligen Vorderansicht. Die tiefen Taschen der Bindefurchen sind durch grüne Kreise hervorgehoben. C,D) Gegebene Strukturen von **JP04-042** (grün), **PS89** (gelb), und **T8** (grün) im katalytischen Zentrum von, C) Domäne a, D) Domäne a'. Für das Protein ist seine elektrostatische Potentialoberfläche gezeigt, die Liganden sind als grüne (**JP04-042** und **T8**) und gelbe (**PS89**) Stäbe mit elementspezifischen Farben wiedergegeben. Die Abbildungen wurden unter Verwendung von VMD erstellt.

Derivate sowie ihr Erfolg bei der Anwendung in unterschiedlichsten Tumor-basierten Modellen verstärken deren pharmakologisches Profil. Sie erfüllen zudem die Regeln von Lipinski. Darüber hinaus bilden die detaillierte Analyse der PDI-Bindung und die Untersuchung der entsprechenden Apoptosesignalwege wichtige Grundlagen für die weiterführende Untersuchung dieses Zielproteins in der Krebsforschung.

Eingegangen am 30. Juni 2014
Online veröffentlicht am 26. September 2014

Stichwörter: Chemotherapeutika · Kombinationstherapie · Krebs · Proteomik · Sensibilisierung

[1] a) C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726; b) T. R. Wilson,

- P. G. Johnston, D. B. Longley, *Curr. Cancer Drug Targets* **2009**, *9*, 307–319; c) I. Kim, W. Xu, J. C. Reed, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 1013–1030.
 [2] B. Luo, A. S. Lee, *Oncogene* **2013**, *32*, 805–818.
 [3] C. Wang, W. Li, J. Ren, J. Fang, H. Ke, W. Gong, W. Feng, C. C. Wang, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, *19*, 36–45.
 [4] a) T. E. Creighton, *BioEssays* **1992**, *14*, 195–199;
 b) P. T. Varandani, M. A. Nafz, M. L. Chandler, *Biochemistry* **1975**, *14*, 2115–2120; c) N. A. Murkofsky, M. E. Lamm, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12181–12184; d) C. C. Wang, C. L. Tsou, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1515–1517.
 [5] a) A. M. Benham, *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, *16*, 781–789; b) S. Xu, S. Sankar, N. Neamati, *Drug Discovery Today* **2014**, *19*, 222–240.
 [6] J. Ge, C. J. Zhang, L. Li, L. M. Chong, X. Wu, P. Hao, S. K. Sze, S. Q. Yao, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2577–2585.
 [7] M. M. Khan, S. Simizu, N. S. Lai, M. Kawatani, T. Shimizu, H. Osada, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 245–251.
 [8] B. G. Hoffstrom, A. Kaplan, R. Letso, R. S. Schmid, G. J. Turmel, D. C. Lo, B. R. Stockwell, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 900–906.
 [9] R. Banerjee, N. J. Pace, D. R. Brown, E. Weerapana, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2497–2500.
 [10] S. Xu, A. N. Butkevich, R. Yamada, Y. Zhou, B. Debnath, R. Duncan, E. Zandi, N. A. Petasis, N. Neamati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16348–16353.
 [11] J. C. Tsibris, L. T. Hunt, G. Ballejo, W. C. Barker, L. J. Toney, W. N. Spellacy, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13967–13970.
 [12] R. Guthapfel, P. Gueguen, E. Quemeneur, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242*, 315–319.
 [13] a) M. J. Evans, A. Saghatelian, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1303–1307; b) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301; c) M. Fonović, M. Bogyo, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, *5*, 721–730; d) B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 663–668; e) P. P. Geurink, L. M. Prely, G. A. van der Marel, R. Bischoff, H. S. Overkleef, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 85–113.
 [14] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; b) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193; c) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
 [15] J. Eirich, J. L. Burkhardt, A. Ullrich, G. C. Rudolf, A. Vollmar, S. Zahler, U. Kazmaier, S. A. Sieber, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 2067–2075.
 [16] A. M. Smith, J. Chan, D. Oksenberg, R. Urfer, D. S. Wexler, A. Ow, L. Gao, A. McAlorum, S. G. Huang, *J. Biomol. Screening* **2004**, *9*, 614–620.