



Stefan Knapp, Susanne Müller

5. Chemische Open-Access-Sonden für epigenetische Zielstrukturen

In:

Walter, Jörn / Hümpel, Anja (Hrsg.): Epigenetik : Implikationen für die Lebens- und Geisteswissenschaften. – 978-3-8487-2739-1. – Baden-Baden: Nomos, 2017, S. 95-113

(Forschungsberichte / Interdisziplinäre Arbeitsgruppen, Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften ; 37)

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:kobv:b4-opus-29014](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:b4-opus-29014)

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (cc by-nc-sa 4.0) Licence zur Verfügung gestellt.



5. Chemische Open-Access-Sonden für epigenetische Zielstrukturen

Genexpression wird im großen Umfang durch die lokale Chromatinstruktur bestimmt. DNA-Sequenzen, die in einer sogenannten offenen Chromatinstruktur gepackt sind, werden bevorzugt abgelesen, da diese Bereiche für Transkriptionsfaktoren zugänglich sind. Gene, die sich im Gegensatz dazu in dicht gepacktem Chromatin befinden, werden nicht abgelesen.¹ Diese Regulationsmechanismen bestimmen daher grundlegend die Zusammensetzung des zellulären Proteoms (d. h. die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle) und damit die Eigenschaften und Funktionen, die eine Zelle ausführen kann. Bei der Entstehung von Krankheiten ist das Muster der exprimierten Gene oft stark verändert. Bei Krebs zum Beispiel werden bevorzugt Gene exprimiert, die das Wachstum der Krebszellen fördern und Kontrollmechanismen inaktivieren, die verhindern, dass Zellen sich unkontrolliert teilen. Chromatinstruktur wird durch den epigenetischen Code bestimmt, ein kompliziertes Muster von posttranslationalen Modifikationen an Histonen, anderen Kernproteinen und der DNA selbst, die die Struktur des Chromatins reguliert.

Dieser epigenetische Code ist daher eine komplizierte Sprache, die von Proteinen, sogenannten epigenetischen Modulatoren, „geschrieben“, „gelöscht“ und auch „gelesen“ wird. Die Forschung auf diesem Gebiet wurde insbesondere durch die freie Verfügbarkeit von chemischen Inhibitoren vorangetrieben. Diese bieten Vorteile im Vergleich zu genetischen Methoden, die die Expression des zu untersuchenden Proteins verhindern. Denn obwohl diese Methoden gut entwickelt sind und auch durch neue Methoden wie dem CRISPR/Cas9-System einen neuen Aufschwung bekamen, lassen sie keine Rückschlüsse auf die Rolle einer bestimmten Domäne² im Protein zu und unterscheiden nicht zwischen der katalytischen Funktion eines Proteins und dessen Rolle,

¹ Vgl. Einleitung zum Band für eine ausführliche Beschreibung epigenetischer Regulationsmechanismen.

² Proteine bauen sich modular aus sogenannten Domänen mit charakteristischen Strukturen auf, die ihre individuellen Eigenschaften bestimmen.

mit anderen Proteinen zu interagieren („scaffolding function“). Diese spezifischen Aussagen können nur mithilfe komplizierter und oft langwieriger Experimente getroffen werden, wenn kein spezifischer Inhibitor frei zugänglich ist.

Selektive Inhibitoren, die die Funktion dieser epigenetischen Zielstrukturen hemmen, könnten Zellen in erkranktem Gewebe in einen nicht pathogenen Zustand zurückführen und damit neue Behandlungsmöglichkeiten schaffen. Aufgrund der Komplexität epigenetischer Prozesse lassen sich jedoch die Konsequenzen einer selektiven Hemmung von epigenetischen Leitstrukturen durch kleinmolekulare Inhibitoren nur schwer vorherbestimmen. Um dieses Problem zu lösen, haben wir³ ein Konsortium aus akademischen und industriellen Forschungseinrichtungen etabliert, das zum Ziel hat, hochselektive und hochwirksame Inhibitoren, sogenannte chemische Sonden, zu entwickeln und diese umgehend Forschungsgruppen, die im Bereich Epigenetik oder an molekularen Grundlagen der Krankheitsentstehung arbeiten, zur Verfügung zu stellen. Dieses Open-Access-Modell ermöglichte bereits neue Formen der offenen Zusammenarbeit zwischen industrieller und öffentlicher Forschung und führte zu neuen therapeutischen Ansätzen insbesondere in der Krebstherapie sowie zu einer schnellen Umsetzung dieser Ansätze in klinische Studien. Dieses Modell könnte daher auch in anderen Bereichen der Arzneimittelentwicklung angewandt werden, die ähnliche Komplexität aufweisen, und so zu einer schnellen Validierung von Leitstrukturen führen.

5.1 Was ist Open Access?

Der Informationsbedarf der heutigen Zeit nimmt stetig zu. Open Access oder freier, uneingeschränkter Zugang zu Information wird daher vermehrt nicht nur von der akademischen Forschung gefördert, sondern auch von der pharmazeutischen Industrie, die verstärkt auf akademische Grundlagenforschung angewiesen ist. Fördereinrichtungen wie die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG⁴ oder die Europäische Union (über das aktuelle Forschungsrahmenprogramm „Horizon 2020“)⁵ stellen zum Beispiel Mittel zur Verfügung, um Publikationen für alle an Forschung interessierten Personen weltweit ohne Einschränkung durch Abonnementkosten frei zugänglich zu machen. Auch Universitäten wie zum Beispiel die Leibniz-Universität Hannover oder die Universität Ulm⁶ unterstützen finanziell Open-Access-Publikationen.

3 www.thesgc.org [1.8.2016].

4 www.dfg.de/foerderung/programme/infrastruktur/lis/awbi/open_access/index.html [1.8.2016].

5 www.openaire.eu/open-access-in-fp7-seventh-research-framework-programme [01.08.2016].

6 www.uni-hannover.de/de/universitaet/ziele/open-access/ [01.08.2016], www.uni-ulm.de/open-access [24.08.2016].

Der Begriff „Open Access“ kann jedoch sehr unterschiedlich interpretiert werden. In einer Zeit, in der Information vielfach frei zugänglich ist, wird die Verwendung dieser Information mehr und mehr eingeschränkt. Denn obwohl frei verfügbare Information ein erster Schritt ist, sollten Open-Access-Modelle auch die Nutzung dieser Information garantieren und darüber hinaus die Reagenzien und Methoden der beschriebenen Projekte zur Verfügung stellen. Diese Modelle erzeugen jedoch oft einen Interessenkonflikt: Die kommerzielle Nutzung neuer Ergebnisse erfordert oft den Schutz durch Patente, was zu langen Verzögerungen der Bekanntmachung von Forschungsergebnissen führt und generell die Zusammenarbeit zwischen Institutionen erschwert. Diese Modelle erzeugen auch nicht zu unterschätzende Kosten für den Patentschutz. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist es, die Grenze zwischen akademischer offener Forschung und der kommerziellen Entwicklung von Arzneimitteln neu zu definieren. Inhibitoren, die für innovative Leitstrukturen in akademischen Labors entwickelt werden, müssen normalerweise für In-vivo-Untersuchungen oder gar klinische Studien aufwendig optimiert werden. Dieser Prozess erfordert in der Regel mehrere Jahre an aufwendiger pharmazeutischer Forschung. Die Patentierung und damit die Geheimhaltung dieser frühen, nicht optimierten Inhibitoren ist deshalb nicht sinnvoll. Viele pharmazeutische Firmen haben sich daher dazu entschlossen, solche Inhibitoren als sogenannte präkompetitive (vorwettbewerbliche) Reagenzien mit akademischen Labors ohne Einschränkung ihrer Nutzung zu teilen. Denn obwohl diese chemischen Verbindungen für klinische Anwendungen noch ungeeignet sind, stellen sie nach umgehender Charakterisierung sehr wichtige Reagenzien für zum Beispiel zelluläre In-vitro-Studien dar.

Diese Veränderung in der Forschungspolitik ermöglicht nun neue öffentlich-private Partnerschaften und damit neue Open-Access-Modelle, die nicht nur den Austausch von Informationen, sondern auch formlos und schnell den von Reagenzien ermöglichen und die von dem speziellen Wissen des privaten und öffentlichen Forschungssektors profitieren. Eine erfolgreiche Kollaboration dieser Art ist das Programm des Structural Genomics Consortium (SGC),⁷ das der Herstellung, Charakterisierung und Verteilung spezifischer chemischer Sonden, insbesondere aus dem Bereich der Epigenetik, gewidmet ist. Die Partnerschaft umfasst derzeit acht Pharmaunternehmen und akademische Forschungslabors an den Universitäten Oxford, Toronto, North Carolina und Campinas.

7 www.thesgc.org [01.08.2016].

5.2 Definition einer chemischen Sonde

Kleinmolekulare Inhibitoren werden fast täglich publiziert. Häufig sind diese chemischen Substanzen jedoch zu unvollständig charakterisiert, um sie als Werkzeuge für mechanistische Studien zu verwenden. Beispielsweise kann ein neuer Src-Kinase-Inhibitor auch andere Kinasen hemmen, gegen die er nicht getestet wurde. Chemische Sonden („probes“) sollten daher genau definierte Qualitätskriterien erfüllen, um die Entstehung widersprüchlicher oder ungenauer Forschungsergebnisse zu vermeiden. Es wäre wünschenswert, dass diese Qualitätskriterien für jede Leitstrukturklasse genau definiert werden. Basierend auf dem SGC-Programm und anderen Forschungsprogrammen sind im Bereich der Epigenetik jetzt viele chemische Sonden von hoher Qualität verfügbar, die umfangreich charakterisiert wurden.

Bemühungen haben sich insbesondere auf die Proteine konzentriert, die Modifikationen in den N-Terminus der Histone einfügen oder löschen und die an posttranslational modifizierte Histone binden. Insbesondere gibt es effektive chemische Sonden für Acetylierungen und Methylierungen des Chromatins. Alle diese Sonden erfüllten bestimmte Kriterien, was eine allgemeine Diskussion bezüglich Qualitätsreagenzien provozierte (Frye, 2010; Workman/Collins, 2010; Bunnage, 2011; Arrowshmith et al., 2015). Chemische Sonden sind nur dann sinnvoll, wenn sie nachweislich selektiv und ausreichend charakterisiert sind. Dies gilt nicht nur für die Interaktion mit dem Zielprotein, sondern auch – und insbesondere – für die Bindung an andere Proteine, sogenannte „off-targets“, die ungewollt durch die chemische Sonde beeinflusst werden und biologische Effekte verursachen, die dann fälschlicherweise dem Zielprotein zugeschrieben werden. Auch die chemische Stabilität und pharmakologischen Eigenschaften der Inhibitoren sind relevant. Es ist daher sinnvoll, Qualitätskriterien für chemische Sonden festzulegen. Das SGC Program benutzt für epigenetisch-chemische Sonden folgende Kriterien:

- ▶ Potenz (K_i , K_d , IC_{50}): <100 nM in vitro
- ▶ Selektivität: >30-fach (innerhalb der Proteinfamilie)
- ▶ Zelluläre Aktivität: <1 μ M

Da auch nach ausführlichen Tests ungewünschte Aktivitäten nicht ausgeschlossen werden können, werden idealerweise für jede Leitstruktur mindestens zwei spezifische Inhibitoren entwickelt, die sich in ihrer chemischen Struktur unterscheiden. Dadurch können in zellulären Analysen („assays“) biologische Effekte mit höherer Genauigkeit der Inhibierung einer bestimmten Zielstruktur oder einer Proteindomäne zugeordnet werden. Darüber hinaus sollte eine chemische Sonde gegen möglichst viele andere

Proteine getestet werden, um ihre Selektivität zu prüfen. Hierfür werden zum Beispiel Kinase-Bibliotheken oder kommerzielle Proteinarrays herangezogen. Ein inaktiver Inhibitor mit einer verwandten Struktur komplementiert ein ideales Daten- und Reagenzienpaket einer qualitativ hochwertigen chemischen Sonde (Brown/Muller, 2015).

5.3 Beispiele chemischer Sonden

5.3.1 Histon-Demethylasen

Histon-Demethylasen (HDMs) – Enzyme, die Methylgruppen von Histonen entfernen – sind erst seit kurzem bekannt; lange Zeit galten Histon-Methylierungen als irreversibel. HDMs können nach den benötigten Cofaktoren in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste identifizierte Histon-Demethylase LSD1⁸ gehört zur Gruppe der Enzyme, die FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) als Cofaktor benutzen. LSD1 entfernt Methylgruppen von mono- und dimethyliertem Lysin in der N-terminalen Position 3 und 4 im Histon H3 (H3K4me1 oder H3Kme2).⁹ Diese Histon-Markierung führt zur Inaktivierung der Gentranskription (Shi et al., 2004). Mehrere spezifische Inhibitoren für LSD1 sind in der Literatur beschrieben. Diese Verbindungen leiten sich chemisch vom klinischen Monoaminoxidasen-Inhibitor Tranylcypromin ab (Muller/Brown, 2012). Die zweite Gruppe der Histon-Demethylasen verwendet 2-Oxoglutarat als Cofaktor und gehört zu den eisenabhängigen (Fe²⁺) Enzymen.

Die mehr als 30 Mitglieder der 2-Oxoglutarat-abhängigen Jumonji-Familie JmjC katalysieren die Demethylierung von mono-, di- und trimethylierten Lysinen. Erst wenige spezifische Inhibitoren, die auch zelluläre Aktivität zeigen, sind für diese Gruppe beschrieben (Maes et al., 2015). Keiner der veröffentlichten Inhibitoren erfüllt alle der oben aufgeführten Kriterien. Obwohl kürzlich einige Patente Inhibitoren für JmjC-Demethylasen beschrieben, sind die veröffentlichten Daten unzureichend, um die Selektivität der Inhibitoren zu beurteilen. Auch sind diese Chemikalien nicht allgemein frei verfügbar.

Einer der am besten charakterisierten Inhibitoren ist *EPT-103182*, ein Inhibitor der KDM5-Subfamilie der Histon-Demethylasen, der zurzeit in präklinischer Entwicklung ist. Die chemische Struktur ist unbekannt, jedoch wurden In-vitro-Aktivitäten gegen KDM5B im subnanomolaren Bereich berichtet. Gegenüber der KDM4-Familie erreicht

⁸ Auch KDM1.

⁹ Methylierungen können an Lysinresten der unterschiedlichen Histone (H1-H5) des Chromatins stattfinden. Der Effekt auf die Genexpression hängt von der Position der Lysinreste in den Histonen und vom Grade der Methylierung (einfach, zweifach, dreifach methyliert) ab.

der Inhibitor eine 20- bis 50-fache Selektivität, gegenüber der KDM6-Familie wird eine etwa 3.000-fache Selektivität erreicht. Der Inhibitor hat eine sehr gute zelluläre Aktivität mit einer IC_{50} von 1.8 nM für das Substrat H3K4me3. Auch zeigt der Inhibitor gute Wirksamkeit in Mausmodellen für Multiples Myelom (Maes et al., 2015).

GSK-J1 ist ein potenter Inhibitor für die Histon-Demethylasen-Familie KDM6 (KDM6A und KDM6B). Der Inhibitor wurde jedoch zunächst nicht gegen die KDM5-Subfamilie getestet, da zur Zeit der Entwicklung keine geeignete Assaymethode zur Verfügung stand. Nach der erfolgreichen Entwicklung eines KDM5-Assays ergaben spätere Analysen eine geringere Selektivität (15-fach) gegenüber der KDM5-Familie (Heinemann et al., 2014; Kruidenier et al., 2014). Der Inhibitor hat aufgrund der geladenen Säuregruppe eine geringe zelluläre Aktivität, sodass stattdessen der Ethylester *GSK-J4* als Prodrug¹⁰ benutzt werden muss. Obwohl diese chemische Sonde noch verbessert werden sollte, ließ *GSK-J4* klare Rückschlüsse auf die Rolle der KDM6-Histon-Demethylasen als potenzielle therapeutische Ziele („targets“) zu. Mitglieder der KDM6-Subfamilie entfernen die repressiven H3K27me3-Methylmarkierungen von Histonen. Mithilfe von *GSK-J4* wurde die postulierte Rolle von KDM6B in Entzündungen bestätigt. Die mit der chemischen Sonde *GSK-J4* behandelten Makrophagen, die von Patienten mit chronischer rheumatoider Arthritis stammen, produzierten deutlich weniger proinflammatorische Zytokine (Kruidenier et al., 2012). *GSK-J4* ist auch effektiv bei Autoimmunerkrankungen und unterdrückt die Differenzierung einer Untergruppe der T-Helferzellen, der Th17-Zellen, durch eine Regulierung der repressiven H3K27me3-Histon-Markierung an regulatorischen Elementen des essenziellen Transkriptionsfaktors RORC für Th17-Zellen sowie an Th17-abhängigen Zytokinen, wie zum Beispiel die Interleukine IL17, IL17f und IL22 (Liu et al., 2015). Mithilfe von *GSK-J4* wurden auch neue therapeutische Möglichkeiten im Bereich der Onkologie nachgewiesen. Für eine Form der akuten lymphatischen Leukämie (T-Zell ALL, T-ALL) reduzierte die Behandlung mit *GSK-J4* die Proliferation der entarteten Blutzellen (Ntziachristos et al., 2014). Ähnliche antiproliferative Effekte wurden auch in Glioma (Hirntumoren) beobachtet, und zwar sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell. Der zelluläre Effekt konnte dabei auf eine Inhibierung von KDM6 zurückgeführt werden, da ein Anstieg der H3K27me3-Markierung zu beobachten war (Hashizume et al., 2014). Die Verwendung der *GSK-J4*-Sonde zeigte auch, dass KDM6B und KDM6A (UTX) wichtig für die Reaktivierung von *Herpes-simplex*-Virus 1 (HSV-1) sind. Die H3K27me3-Markierung der lytischen Gene von HSV-1 verhindert die Expression dieser Gene in der latenten Phase des Virus. Die Inhibierung der Demethylierung

¹⁰ Prodrugs sind biologisch inaktive Reagenzien, die in vivo durch chemische oder enzymatische Prozesse in eine aktive Form umgewandelt werden.

von H3K27me3 durch GSK-J4 verhindert so eine Reaktivierung der latenten Virusgene, was einen möglichen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von HSV darstellen könnte (Messer et al., 2015).

Wie wichtig eine sorgfältige Charakterisierung einer chemischen Sonde ist, inklusive möglicher Kreuzreaktivitäten, zeigt auch eine kürzlich erschienene Publikation. Kamikawa und Donohoe (2015) benutzten *GSK-J4*, um die Rolle von H3K27me3-Methylierung bei der Inaktivierung des weiblichen X-Chromosoms zu studieren. Das inaktive X-Chromosom ist bedeckt von der repressiven H3K27me3-Markierung. Umgekehrt wird in einer somatischen Zelle, bei der Pluripotenz induziert wurde, das inaktivierte X-Chromosom durch Entfernen der H3K27me3-Markierung reaktiviert. Die Studie identifizierte die Histon-Demethylase UTX als Schlüsselenzym („masterregulator“) für die X-Inaktivierung und -Reaktivierung, und zwar über die Regulierung des Transkriptionsfaktors Prdm14 sowie der beiden langen nicht codierenden RNAs Tsix und Xist. Aufgrund der berichteten möglichen Kreuzreaktivität zu den H3K4me3-Histon-Demethylasen der KDM5-Subfamilie testeten die Autoren auch diese Histonmarkierung, die in der Tat auch durch den Inhibitor beeinflusst war. Dies ließ eine korrekte und differenzierte Interpretation der Daten und der regulierten Gene zu (Kamikawa/Donohoe, 2015).

5.3.2 Histon-Methyltransferasen

Auch für Histon-Methyltransferasen sind mehrere frei verfügbare spezifische Inhibitoren beschrieben worden, die zum Teil von unterschiedlichen chemischen Klassen stammen. Insbesondere Inhibitoren für die Mono-, Di- und Tri-Methylase von Lysin 27 auf Histon 3 (H3K27) wurden vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomata berichtet und erste klinische Studien haben begonnen. Für weiterführende Details sei auf Brown und Muller (2015) verwiesen.

5.3.3 Bromodomäne-Proteine

Bromodomänen-Proteine sind epigenetische Modulatoren, die Histon-Modifikationen „lesen“ („reader“ proteins). Sie erkennen Acetylierungen und – wie erst kürzlich gezeigt wurde – auch Butyrylierungen und Krotonylierungen von Lysinen in Histonen oder anderen Proteinen im Zellkern und binden daran (Flynn et al., 2015; Filippakopoulos et al., 2012). Die 61 Bromodomänen, die im menschlichen Genom identifiziert wurden, sind Teil unterschiedlicher Kernproteine, die eine Vielzahl zusätzlicher Domänen enthalten können. Dies können entweder katalytische Domänen (z. B. Histon-Acetyl-

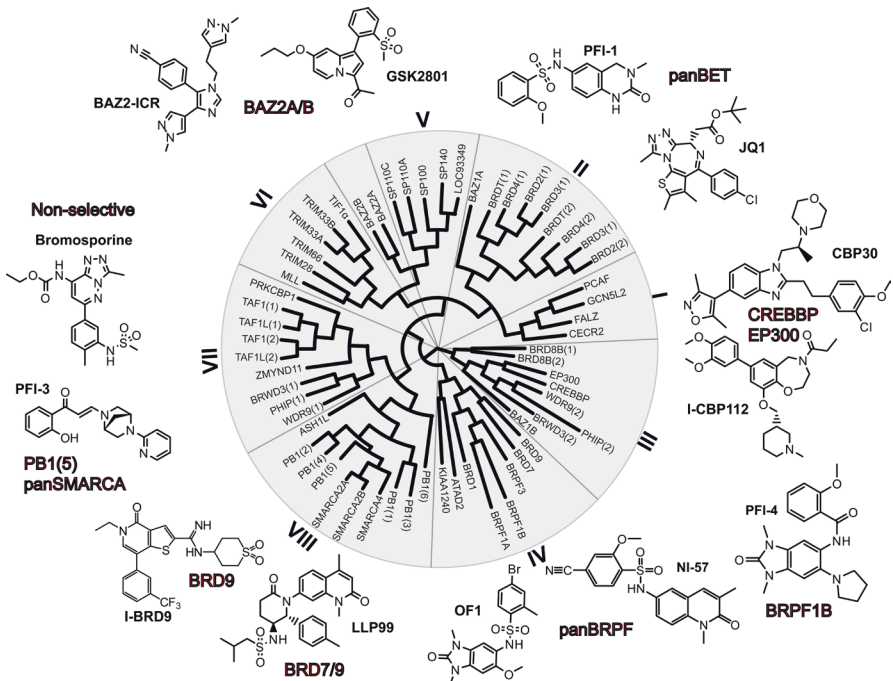
transferase-Domänen (HAT) oder Helikase-Domänen) oder non-katalytische Protein-Protein-Interaktionsdomänen (z. B. BAH- oder PHD-Domänen)¹¹ sein, wobei das Protein im letzteren Fall Gerüst-Funktionen („scaffolding“) hat. Proteine, die Bromodomänen enthalten, sind oft Teil großer Molekülkomplexe und dienen durch Bindung an acetylierte Sequenzen der Verankerung von Proteinen an Chromatinstrukturen wie zum Beispiel an acetylierte Histone oder auch dem Zusammenhalt großer Komplexe.

Bromodomänen sind kompakte stabile Domänen von circa 110 Aminosäuren, die über eine tiefe hydrophobe Bindetasche verfügen, in die Kleinmoleküle leicht binden können. Sie gelten daher als „druggable“, das heißt, sie stellen attraktive Angriffsziele für pharmazeutische Wirkstoffe wie Inhibitoren dar (Filippakopoulos/Knapp, 2014; Vidler et al., 2012). Eine zentrale Aminosäure in der Acetyllysine-Bindetasche ist ein Asparagin, das in den meisten Bromodomänen konserviert ist und eine Wasserstoffbrücke zu dem Acetylrest bildet. Es trägt so maßgeblich zur Erkennung der Acetylierung bei. Mutationen dieser Aminosäure zu Alanin oder Phenylalanin verhindern in den meisten Fällen die Bindung des gesamten Proteins an Chromatin (Philpott et al., 2014). Aber auch andere Aminosäuren wie Tyrosin, Threonin oder Aspartat werden in den sogenannten atypischen Bromodomänen anstelle des konservierten Asparagins gefunden. Die Auswirkung dieser Substitution für die Substraterkennung ist noch Gegenstand derzeitiger Forschung.

Fast alle Bromodomänen können in rekombinanter Form gereinigt werden und für die Mehrheit gibt es Kristallstrukturen (Filippakopoulos et al., 2012). Die große Anzahl experimenteller Proteinstrukturen bot ideale Voraussetzungen für die strukturbasierte Inhibitorentwicklung („structure based drug design“). Für die Bromodomänenfamilie gibt es mittlerweile für fast alle Subfamilien chemische Sonden mit jeweils unterschiedlicher inhibitorischer Potenz und basierend auf unterschiedlichen chemischen Klassen; eine zuverlässige Interpretation zellulärer Daten ist somit gegeben (Abbildung 1).

11 BAH-Domäne = Bromo adjacent homology domain, PHD-Domäne = plant homeodomain.

Abbildung 1: Beispiele frei verfügbarer chemischer Sonden für Bromodomänen



Strukturbasiertes Dendrogramm der humanen Bromodomänen in Anlehnung an Filippakopoulos et al., 2012. Die acht Subfamilien der Bromodomänenfamilie sind durch römische Ziffern gekennzeichnet.

Es wurden beispielsweise zwei Inhibitoren für die Bromodomänen-enthaltenden Histon-Acetyltransferasen CBP und EP300 beschrieben (Hammitzsch et al., 2015; Picaud et al., 2015). CBP und EP300 sind zwei verwandte Proteine, die als Koaktivatoren der Genexpression wirken und in vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle spielen. Außer der Bromodomäne und der HAT-Domäne enthalten diese beiden Proteine noch eine Anzahl weiterer DNA- und Proteininteraktions-Domänen. Die Aktivierung der CBP/EP300-abhängigen Zytokine hängt vom Zusammenspiel der unterschiedlichen Proteindomänen ab und wird auf genspezifische Weise kontrolliert. Obwohl die Inhibierung der Bromodomäne nicht dazu führt, dass CBP oder EP300 global vom Chromatin verdrängt werden, wie in Deletions- und Mutationsstudien gezeigt wurde (Philpott et al., 2014), so trägt die Bromodomäne zur Aktivierung spezifischer HAT-abhängiger Genexpression bei. Beispielsweise ist die Transkription des Zellzyklusregulators p21 abhängig von der EP300-Bromodomäne, wohingegen ein anderes EP300-abhängiges Gen, *E2F1*, nicht durch die Funktion der Bromodomäne beeinflusst

wird (Chen et al., 2010). Mithilfe des Inhibitors *SGC-CBP30* wurde gezeigt, dass die Inhibierung der CBP-Bromodomäne auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie dem Morbus Bechterew (ankylosierende Spondylitis) oder der Schuppenflechten-Arthritis (Arthritis psoriatica) spielen kann. In Zellen, die von Patienten stammten, die an diesen Krankheiten litten, führte die Behandlung mit *SGC-CBP30* zu einer reduzierten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-17A, das maßgeblich an beiden Krankheitsbildern beteiligt ist (Hammitzsch et al., 2015). Die CBP-Bromodomäne spielt auch eine Rolle bei Leukämieerkrankungen; mithilfe der chemischen Sonde *I-CBP112* wurde gezeigt, dass insbesondere Leukämienstammzellen abhängig von CBP sind. CBP-Inhibitoren wären daher idealerweise als Sekundärtherapie nach einer Chemotherapie einsetzbar, um einen Rückfall zu verhindern (Picaud et al., 2015).

Die Anzahl verfügbarer epigenetischer Sonden hat mittlerweile zugenommen, und so ist es jetzt möglich, gleichzeitig mehrere Proteine in einem Proteinkomplex zu inhibieren. Ein Beispiel sind die sogenannten BAF- oder PBAF-Chromatin-Remodellierungskomplexe: Multiproteinkomplexe, die jeweils mehrere Untereinheiten mit Bromodomänen enthalten. Mutationen und Überexpression von BAF- und PBAF-Proteinen sind eng mit der Entstehung maligner Erkrankungen (Karzinogenese) assoziiert. Chemische Sonden wären daher wünschenswert, um das therapeutische Potenzial der Inhibierung einer oder mehrerer Bromodomänen in diesen Komplexen zu erforschen. Die katalytischen Komponenten dieser Komplexe (BRM oder BRG1) enthalten neben der ATPase-Domäne auch eine C-terminale Bromodomäne, für die bereits ein spezifischer Inhibitor (*PFI-3*) beschrieben ist. Daneben sind in den BAF- und PBAF-Komplexen auch die strukturell verwandten Proteine BRD9 und BRD7 enthalten. Der PBAF-Komplex enthält darüber hinaus das Protein PBI, das aus sechs Bromodomänen besteht. Gleich mehrere chemischen Sonden stehen für BRD9 und BRD7 zu Verfügung (Clark et al., 2015; Theodoulou et al., 2016).¹² Zwei dieser Sonden haben eine duale Aktivität und inhibieren sowohl BRD9 als auch in abgeschwächter Form BRD7; die dritte (*I-BRD9*) ist spezifisch für BRD9. Auch die bekannten Kreuzreaktivitäten innerhalb der Bromodomänen-Familie sind verschieden, sodass sich die vorhandenen Inhibitoren sehr gut ergänzen. Eine Überexpression von BRD9 wurde beim Zervixkarzinom beschrieben (Scotto et al., 2008), wohingegen die Expression von BRD7 in Tumoren herunterreguliert ist und daher eine Funktion als Tumorsuppressor für dieses Protein postuliert worden ist (Clark et al., 2015). Ein Effekt auf Krebszellen wurde bisher für keinen dieser Inhibitoren beschrieben, aber BRD9-Inhibition hat eine Wirkung auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Clark et al., 2015). Studien mit Inhibitor kombinationen

12 Vgl. www.thesgc.org/Chemical-Probes/Bi-9564 [02.08.2016].

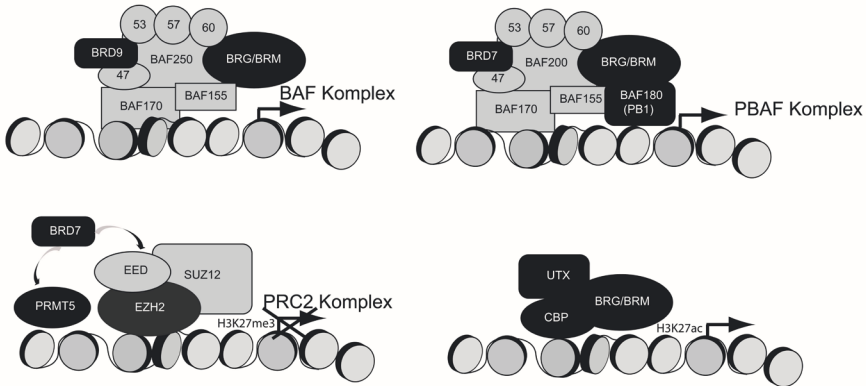
für den BAF/PBAF-Komplex sind noch nicht beschrieben, doch wäre es interessant zu verstehen, welche Rolle die einzelnen Komponenten im Komplex haben. Die zur Verfügung stehenden Inhibitoren stellen eine gute Basis für Forschungsaktivitäten zu diesen Fragen dar.

Während der Embryonalentwicklung, aber auch in der Karzinogenese, gibt es ein Gleichgewicht der Gentranskription zwischen dem repressiven PRC-Komplex („polycomb repressive complex“) und dem SWI/SNF-Komplex („switching defective/sucrose non-fermenting complex“). Der PRC-Komplex unterdrückt die Genexpression durch Markierung des Chromatins mit der repressiven H3K27me₃-Markierung, während der SWI/SNF-Komplex – zu dem auch die BAF- und PBAF-Komplexe gehören – Nucleosomen repositioniert und dadurch ultimativ Gentranskription erleichtert. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Komponenten dieser beiden Komplexe miteinander in Wechselwirkung stehen und auch funktionell synergistisch agieren. Zum Beispiel wurde eine Interaktion zwischen BRD7, der Arginin-Methyltransferase PRMT5 und dem Polycomb-Komplex PRC2 beschrieben (Tae et al., 2011). Gemeinsam inhibieren diese Proteine die Transkription von Genen, die vom PRC2-Komplex reguliert werden. Die Expression von PRC2-Komponenten ist häufig bei verschiedenen Krebsarten, zum Beispiel bei Melanomen, Lymphomen, Brust- oder Prostatakrebs, erhöht (Margueron/Reinberg, 2011). Gleich mehrere epigenetische Sonden sind für diesen Komplex verfügbar: GSK591 zur Inhibierung von PRMT5,¹³ die bereits beschriebenen Inhibitoren von BRD9 und BRD7 sowie mehrere Inhibitoren für die Methyltransferase EZH2 (Verma et al., 2012; Knutson et al., 2012; Xu et al., 2015), die als Teil des PRC2-Komplexes die repressive H3K-27Me₃-Methylierung katalysiert (Abb. 2).

Auch andere epigenetische Enzyme können der Repression von PRC entgegenwirken. Die Acetylierung der Aminosäure K27 im Histon H3 verhindert die Methylierung dieses Lysinrestes. Die katalytische Untereinheit BRM des SWI/SNF-Komplexes interagiert mit der Histon-Demethylase KDM6A (UTX) sowie der bereits erwähnten Histon-Acetylase CBP, die die Acetylierung an K27 katalysiert, und wirkt dadurch einer Repression der entsprechenden Gene entgegen (Tie et al., 2012). Für alle diese Komponenten sind Inhibitoren vorhanden, die – alleine oder in Kombination – die Erforschung des genauen Mechanismus unter physiologischen oder pathophysiologischen Verhältnissen ermöglichen können (Abb. 2).

13 Vgl. www.thesgc.org/chemical-probes/GSK591 [02.08.2016].

Abbildung 2: Beispiele für das Zusammenspiel verschiedener Proteine in Chromatinkomplexen und die Auswirkung auf die Gentranskription



Eigene Darstellung. Proteine, für die chemische Sonden zur Verfügung stehen, sind in schwarz gezeit.

Auch Kombinationen mit anderen Inhibitoren posttranslationaler Modifikationen sind denkbar. Besonders fruchtbar wären mögliche Kombinationstherapien mit bereits zugelassenen Medikamenten oder mit Inhibitoren in klinischen Studien. Ein interessanter Ansatz ist auch die Hemmung mehrerer Enzyme oder Proteine durch einen einzigen Inhibitor (Polypharmakologie), der einen Vorteil gegenüber den sehr aufwendigen klinischen Studien mit mehreren Inhibitoren darstellen könnte. Beispiele für vielversprechende Strategien sind duale Inhibitoren von Bromodomäne-Kinasen (Ciceri et al., 2014). Es ist wahrscheinlich, dass durch die gleichzeitige Inhibition verschiedener Signaltransduktionskaskaden, die zur Entstehung von Tumoren beitragen, Resistenzen vermieden oder hinausgezögert werden können, und zwar ohne die klinischen Nachteile der Kombinationstherapie, wie zum Beispiele synergistische Nebeneffekte der einzelnen Medikamente.

5.4 Der Einfluss chemischer Sonden auf die Grundlagenforschung

Die ersten Bromodomäne-Inhibitoren wurden gegen Mitglieder der BET-Familie¹⁴ (BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT) entwickelt (Filippakopoulos et al., 2010; Nicodeme et al.,

¹⁴ BET = Bromodomain and ExtraTerminal domain.

2010). Die Mitglieder der BET-Familie besitzen zwei N-terminale Bromodomänen sowie andere potenzielle Interaktionsdomänen im Bereich ihres C-Terminus. Sie enthalten jedoch keine katalytische Domäne. Die uneingeschränkte Verfügbarkeit des BET-Inhibitors (+)-*JQ1* führte bisher zu über 1000 Publikationen seit der Veröffentlichung des Inhibitors im Dezember 2010 – also mehr Publikationen, als die Summe der Publikationen, die für diese Proteinfamilie vor 2010 veröffentlicht wurden.¹⁵

BET-Proteine, insbesondere BRD4, spielen eine zentrale Rolle in der Transkriptionskontrolle. BRD4 interagiert mit dem Elongationsfaktor P-TEFb („positive transcription elongation factor“) und reguliert dadurch die Phosphorylierung und in weiterer Konsequenz den Elongationsschritt der RNA-Polymerase II an Genpromotoren. Diese Funktion ließ vermuten, dass durch die Hemmung von BRD4 die Gentranskription global negativ reguliert werden würde. Genexpressionsstudien zeigten jedoch, dass BET-Inhibitoren selektiv wirken und nur die Transkription bestimmter Gene beeinflussen. Dies wurde durch die Funktion von BRD4 in Enhancern und Super-Enhancern erklärt, wo es unter anderem auch die Transkription von nicht codierenden Enhancer-RNAs (eRNA) reguliert (Kanno et al., 2014) oder über die Regulation der Mediator Komplexe direkt auf die Transkription spezifischer Gene Einfluss nimmt (Whyte et al., 2013).

Das Zusammenspiel von zellspezifischen Transkriptionsfaktoren, Histon-Acetyltransferasen und BRD4 spielt beispielsweise eine zentrale Rolle für Signaltransduktionskaskaden bei Leukämien (Roe et al., 2015). Insbesondere regulieren BET-Proteine wichtige Gene, die für den Zellzyklus (p21), die Proliferation (Aurora) und Apoptose (*Bcl-xL*) verantwortlich sind, sowie Onkogene wie *c-Myc*. Es ist daher nicht verwunderlich, dass BET-Inhibitoren effektive Tumoringhibitoren darstellen (Mirguet et al., 2013; Filippakopoulos/Knapp, 2014). Auch unterliegen metabolische Gene (z. B. *LDHA*; Qiu et al., 2015) wie auch Gene, die an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt sind (z. B. *IEG*; Korb et al., 2015), der Regulation durch BRD4.

Gene, die an Entzündungsprozessen mitwirken, können auf zweifache Weise durch BET-Proteine reguliert werden: Zum einen beeinflussen sie wie beschrieben Promotoren und Enhancer, zum anderen interagieren sie mit ihren Bromodomänen mit Nicht-Histonproteinen wie Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise bindet BRD4 an die p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB und nimmt dadurch Einfluss auf Entzündungsgene (Xu Vakoc, 2014). Interessanterweise scheint an entzündlichen Prozessen im Gehirn überwiegend BRD2 beteiligt zu sein, und zwar über die Regulation des Gens *PAI-1* („plasminogen activator inhibitor 1“). Im Gegensatz dazu sind andere

¹⁵ Recherche in der Literatur-Datenbank MEDLINE (U.S. National Library of Medicine). Online unter: www.ncbi.nlm.nih.gov [03.08.2016].

proinflammatorische Zytokine wie *IL-6* oder *TNF- α* , die in peripheren Entzündungen aktiviert sind, nicht involviert (Choi et al., 2015). Durch Interaktion mit dem Androgenrezeptor oder dem Tumorsuppressor 53 reguliert BRD4 die Androgen- oder p53-abhängigen Gene. Entsprechend zeigten BET-Inhibitoren vielversprechende Effekte bei Prostatakrebs oder in p53-abhängigen Leukämie modellen (Asangani et al., 2014; Stewart et al., 2013).

Diese Einblicke in die physiologischen Funktionen der BET-Proteine wurden durch die Verfügbarkeit gut charakterisierter Sonden ermöglicht. Unerwünschte Nebeneffekte durch die Inhibierung anderer Proteine können durch die Verwendung mehrerer, strukturell unterschiedlicher Sonden und inaktiver Kontrollsubstanzen verhindert werden. Beispielsweise gehört der BET-Inhibitor (+)-*JQ1* chemisch zur Klasse der Benzodiazepine. Diazepine binden auch an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wie den GABA-Rezeptor und werden daher als Beruhigungs- und Schlafmittel eingesetzt. In-vitro-Screening gegen GPCRs ergab jedoch, dass (+)-*JQ1* keine nennenswerte Aktivität für GPCRs hat. Zusätzlich kann der Effekt des BET-Inhibitors (+)-*JQ1* in zellulären Assays durch die Anwendung des alternativen Tetrahydro-Quinazolin-BET-Inhibitors *PFI-1* bestätigt werden. Darüber hinaus gibt es für das aktive Enantiomer (+)-*JQ1* eine geradezu ideale Kontrollsubstanz, nämlich das inaktive Stereoisomer (-)-*JQ1*, das nicht an BET-Proteine bindet. Durch die Kombination der verfügbaren Substanzen kann so eine sichere Aussage bezüglich der beobachteten Effekte getroffen werden.

5.5 Der Einfluss chemischer Sonden für die Entwicklung neuer Pharmazeutika

Die vielversprechenden Berichte über zelluläre Experimente und Tiermodelle haben eine Flut von klinischen Studien hervorgerufen. Fünfzehn klinische Studien wurden oder werden bereits durchgeführt (Tabelle 1). Dies ist eine bemerkenswert kurze Zeit seit der Entdeckung und Publikation der Inhibitoren. Die hervorragende Validierung und Erprobung von BET-Inhibitoren in Laboren aus aller Welt hat zu diesem raschen Fortschreiten der Arzneimittelentwicklung entscheidend beigetragen. Erste Ergebnisse bei Akuter Myeloischer Leukämie (AML) und Lymphomata sind vielversprechend, jedoch wurden als Nebeneffekte auch Thrombozytopenie und Neutropenie berichtet.¹⁶

16 <http://tatcongress.org/wp-content/uploads/2015/03/07.3-Patrice-Herait.pdf> [01.08.2016].

Tabelle 1: BET-Inhibitoren in klinischen Studien

Arzneimittel-kandidat	Firma	Phase	Indikation
ABBV-075	Abbvie	I	Solide Tumoren
BAY1238097	Bayer	I	Fortgeschrittene solide Tumoren
BMS-986158	Bristol Meyer Squibb	I/IIa	Solide Tumoren
CPI-0610	Constellation	I	Progressives Lymphom
CPI-0610	Constellation	I	Multiple Myeloma
CPI-0610	Constellation	I	Akute Leukämie, Myelodysplastisches Syndrom oder Myelodysplastische/Myeloproliferative Neoplasmen
GSK525762	GSK	I	NUT Midline Karzinom (NMC) und andere Krebsarten
GSK525762	GSK	I	Refraktäre Hämatologische Tumoren
INCB054329	Incyte Corporation	I, II	Fortgeschrittene Tumoren
OTX015	Merck (Oncoethix)	I	Akute Myeloische Leukämie
OTX015	Merck (Oncoethix)	I	NUT Midline Karzinom, Solide Tumoren
OTX015	Merck (Oncoethix)	I	Akute Leukämie, andere hämatologische Krebsarten
OTX015	Merck (Oncoethix)	IIa	Glioblastom
TEN-010	Tensha	I	Akute Myeloische Leukämie und Myelodysplastisches Syndrom
TEN-010	Tensha	I	Solide Tumoren

Quelle: www.cancer.gov

Die prinzipielle pharmakologische Verträglichkeit von BET-Inhibitoren wurde in klinischen Studien mit dem Inhibitor *RVX-208/RVX000222* gezeigt. *RVX000222* wurde in einem phänotypischen Screening-Verfahren als Substanz identifiziert, die Apolipoprotein A-I und High-density Lipoprotein Cholesterol (HDL) hochreguliert und daher eine positive Wirkung bei koronaren Herzerkrankungen haben sollte. Klinische Studien bis zu Phase IIb wurden durchgeführt, ohne dass substanzielle Nebeneffekte berichtet wurden. *RVX-208* bindet jedoch bevorzugt an die zweite Bromodomäne der BET-Proteine. Dies hat andere Effekte auf die Genregulation, als die Inhibition beider oder der ersten Bromodomäne von BET wie zum Beispiel durch den BET Inhibitor (+)-*JQ1* (Picaud et al., 2013) sie erzeugt.

Präklinische Experimente bei Leukämie zeigen jedoch schon, dass sich auch Resistenzen gegen BET-Behandlung bilden können. Diese Resistenzen beeinträchtigen nicht direkt die BET-Proteine, sondern bewirken über Chromatinremodelling die Re-Expression von Tumorgenen wie zum Beispiel *c-Myc*. Dabei kommt der Aktivierung der WNT-Signaltransduktionskaskade eine entscheidende Rolle zu (Rathert et al., 2015). Interessant dabei ist, dass die Resistenz unabhängig von der chemischen Struktur des

verwendeten Inhibitors ist. So sind Zellen, die resistent gegen den BET-Inhibitor *I-BET* sind, auch resistent gegen (+)-*JQ1*, das chemisch zu einer anderen Klasse gehört (Fong et al., 2015). Erste Resistenzen haben sich auch schon in Pankreaskarzinomzellen gezeigt (Kumar et al., 2015).

5.6 Ausblick

Open Access ist ein Trend, der sich in allen Bereichen der Wissenschaft und der Medizin ausbreitet. Die zunehmend steigenden Kosten für die Medikamentenentwicklung haben die Pharmaindustrie für neue Wege geöffnet. Öffentlich-private Partnerschaften finden dabei immer häufiger ihren Platz. Insbesondere im Bereich der Epigenetik haben Open-Access-Projekte die Wissenschaft auf diesem Gebiet sprunghaft vorangetrieben. Wir denken, dass es von grundlegender Bedeutung ist, dass akademische Institute untereinander frei und unbürokratisch zusammenarbeiten. Dabei ist ein Gleichgewicht zwischen freier akademischer Forschung und zielgerichteter translationaler Projekte von Bedeutung. Die uneingeschränkte Verfügbarkeit epigenetischer Sonden hat sowohl viele neue Bereiche der Biologie als auch therapeutische Ansätze erschlossen. Es ist zu hoffen, dass für die verbleibenden epigenetischen Proteine ein ähnlicher Erfolg herbeigeführt werden kann. Noch gibt es wenige chemische Sonden für Methyl-bindende Proteine oder DNA-modifizierende Proteine. Auch für die regulatorischen RNAs, die hier nicht behandelt wurden, sowie spezifische Sonden für chromatinmodifizierende Komplexe wären wünschenswert. Open-Access-Kollaborationen können helfen, dieses Ziel schneller zu erreichen.

5.7 Literatur

- Arrowsmith, C. H. et al. (2015): The promise and peril of chemical probes. In: *Nat Chem Biol* 11(8):536–541.
- Asangani, I. A. et al. (2014): Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. In: *Nature* 510(7504):278–282.
- Brown, P. J./Muller, S. (2015): Open access chemical probes for epigenetic targets. In: *Future Med Chem* 7(14):1901–1917.
- Bunnage, M. E. (2011): Getting pharmaceutical R&D back on target. In: *Nat Chem Biol* 7(6):335–339.
- Chen, J. et al. (2010): Interplay of bromodomain and histone acetylation in the regulation of p300-dependent genes. In: *Epigenetics* 5(6):509–515.
- Choi, C. S. et al. (2015): The Epigenetic Reader BRD2 as a Specific Modulator of PAI-1 Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Primary Astrocytes. In: *Neurochem Res* 40(11):2211–2219.

- Ciceri, P. et al. (2014): Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology. In: *Nat Chem Biol* 10(4):305–312.
- Clark, P. G. et al. (2015): LP99: Discovery and synthesis of the first selective BRD7/9 bromodomain inhibitor. In: *Angew Chem* 54(21):6217–6221.
- Filippakopoulos, P./Knapp, S. (2014): Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. In: *Nat Rev Drug Discovery* 13(5):337–356.
- Filippakopoulos, P. et al. (2012): Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. In: *Cell* 149(1):214–231.
- Filippakopoulos, P. et al. (2010): Selective inhibition of BET bromodomains. In: *Nature* 468(7327):1067–1073.
- Flynn, E. M. et al. (2015): A subset of human bromodomains recognizes butyryllysine and crotonyllysine histone peptide modifications. In: *Structure* 23(10):1801–8114.
- Fong, C. Y. et al. (2015): BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. In: *Nature* 525(7570):538–542.
- Frye, S. V. (2010): The art of the chemical probe. In: *Nat Chem Biol* 6(3):159–161.
- Hammitzsch, A. et al. (2015): CBP30, a selective CBP/p300 bromodomain inhibitor, suppresses human Th17 responses. In: *PNAS* 112(34):10768–10773.
- Hashizume, R. et al. (2014): Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. In: *Nat Med* 20(12):1394–1396.
- Heinemann, B. et al. (2014): Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. In: *Nature* 514(7520):E1–2.
- Kamikawa, Y. F./Donohoe, M. E. (2015): Histone demethylation maintains prdm14 and tsix expression and represses xist in embryonic stem cells. In: *PLoS one* 10(5):e0125626.
- Kanno, T. et al. (2014): BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. In: *Nat Struct Mol Biol* 21(12):1047–1057.
- Knutson, S. K. et al. (2012): A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. In: *Nat Chem Biol* 8(11):890–896.
- Korb, E. et al. (2015): BET protein Brd4 activates transcription in neurons and BET inhibitor Jq1 blocks memory in mice. In: *Nat Neurosci* 18(10):1464–1473.
- Kruidenier, L. et al. (2012): A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. In: *Nature* 488(7411):404–408.
- Kruidenier, L. et al. (2014): Kruidenier et al. reply. In: *Nature* 514(7520):E2.
- Kumar, K. et al. (2015): GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1. In: *Sci Rep* 5:9489.
- Liu, Z. et al. (2015): The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 plays a critical role in specific regulation of Th17 cell differentiation. In: *J Mol Cell Biol* (6):505–516.
- Maes, T. et al. (2015): Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. In: *Curr Opin Pharmacol* 23:52–60.
- Margueron, R./Reinberg, D. (2011): The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. In: *Nature* 469(7330):343–349.

- Messer, H. G. et al. (2015): Inhibition of H3K27me3-specific histone demethylases JMJD3 and UTX blocks reactivation of herpes simplex virus 1 in trigeminal ganglion neurons. In: *J Virol* 89(6):3417–3420.
- Mirguet, O. et al. (2013): Discovery of epigenetic regulator I-BET762: lead optimization to afford a clinical candidate inhibitor of the BET bromodomains. In: *J Med Chem* 56(19):7501–7515.
- Muller, S./Brown, P. J. (2012): Epigenetic chemical probes. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 92(6):689–693.
- Nicodeme, E. et al. (2010): Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. In: *Nature* 468(7327):1119–1123.
- Ntziachristos, P. et al. (2014): Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. In: *Nature* 514(7523):513–517.
- Philpott, M. et al. (2014): Assessing cellular efficacy of bromodomain inhibitors using fluorescence recovery after photobleaching. In: *Epigenetics Chromatin* 7:14.
- Picaud, S. et al. (2013): RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. In: *PNAS* 110(49):19754–19759.
- Picaud, S. et al. (2015): Generation of a Selective Small Molecule Inhibitor of the CBP/p300 Bromodomain for Leukemia Therapy. In: *Cancer Research* 75(23):5106–5119.
- Qiu, H. et al. (2015): JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer. In: *Oncotarget* 6(9):6915–6930.
- Rathert, P. et al. (2015): Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition. In: *Nature* 525(7570):543–547.
- Roe, J. S. et al. (2015): BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia. In: *Mol Cell* 58(6):1028–1039.
- Scotto, L. et al. (2008): Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Droscha. In: *Mol Cancer* 7:58.
- Shi, Y. et al. (2004): Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. In: *Cell* 119(7):941–953.
- Stewart, H. J. et al. (2013): BRD4 associates with p53 in DNMT3A-mutated leukemia cells and is implicated in apoptosis by the bromodomain inhibitor JQ1. In: *Cancer Med* 2(6):826–835.
- Tae, S. et al. (2011): Bromodomain protein 7 interacts with PRMT5 and PRC2, and is involved in transcriptional repression of their target genes. In: *Nucleic Acids Res* 39(13):5424–5438.
- Theodoulou, N. H. et al. (2016): Discovery of I-BRD9, a Selective Cell Active Chemical Probe for Bromodomain Containing Protein 9 Inhibition. In: *J Med Chem* 59(4):1425–1439.
- Tie, F. et al. (2012): Histone demethylase UTX and chromatin remodeler BRM bind directly to CBP and modulate acetylation of histone H3 lysine 27. In: *Mol Cell Biol* 32(12):2323–2334.
- Verma, S. K. et al. (2012): Identification of potent, selective, cell-Active inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. In: *ACS Med Chem Lett* 3(12):1091–1096.

Vidler, L. R. et al. (2012): Druggability analysis and structural classification of bromodomain acetyl-lysine binding sites. In: *J Med Chem* 55(17):7346–7359.

Whyte, W. A. et al. (2013): Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. In: *Cell* 153(2):307–319.

Workman, P./Collins, I. (2010): Probing the probes: fitness factors for small molecule tools. In: *Chem Biol* 17(6):561–577.

Xu, B. et al. (2015): Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL-rearranged leukemia. In: *Blood* 125(2):346–357.

Xu, Y./Vakoc, C. R. (2014): Brd4 is on the move during inflammation. In: *Trends Cell Biol* 24(11):615–616.