

# Störung von Histon-Ablesern

Samuel S. Oliver und John M. Denu\*

Bromodomänen · Epigenetik · Histoncode ·  
Inhibitoren · Niedermolekulare Verbindungen

Die Forschung zu Chromatin und Epigenetik macht rasche Fortschritte und eröffnet so Wege zu neuartigen Therapeutika, die auf jüngst identifizierte Mitspieler abzielen. Obgleich das Genom des Menschen eine Blaupause des Potenzials seiner Zellen ist, bestimmt eine zusätzliche Informationsebene – das Epigenom –, ob bestimmte Gene richtig exprimiert werden.<sup>[1]</sup> Dieses Epigenom besteht aus einer komplexen Anordnung spezifischer chemischer Markierungen am Chromatin (dem chromosomalen DNA-Protein-Komplex), die die Genexpression dynamisch regulieren.<sup>[1b]</sup> Diese chromatingestützten Mechanismen werden gegenwärtig entschlüsselt, und neuere Befunde deuten darauf hin, dass es vielversprechend sein könnte, sich diesen Stoffwechselwegen im Hinblick auf therapeutische Maßnahmen bei menschlichen Krankheiten und Gebrechen zuzuwenden.

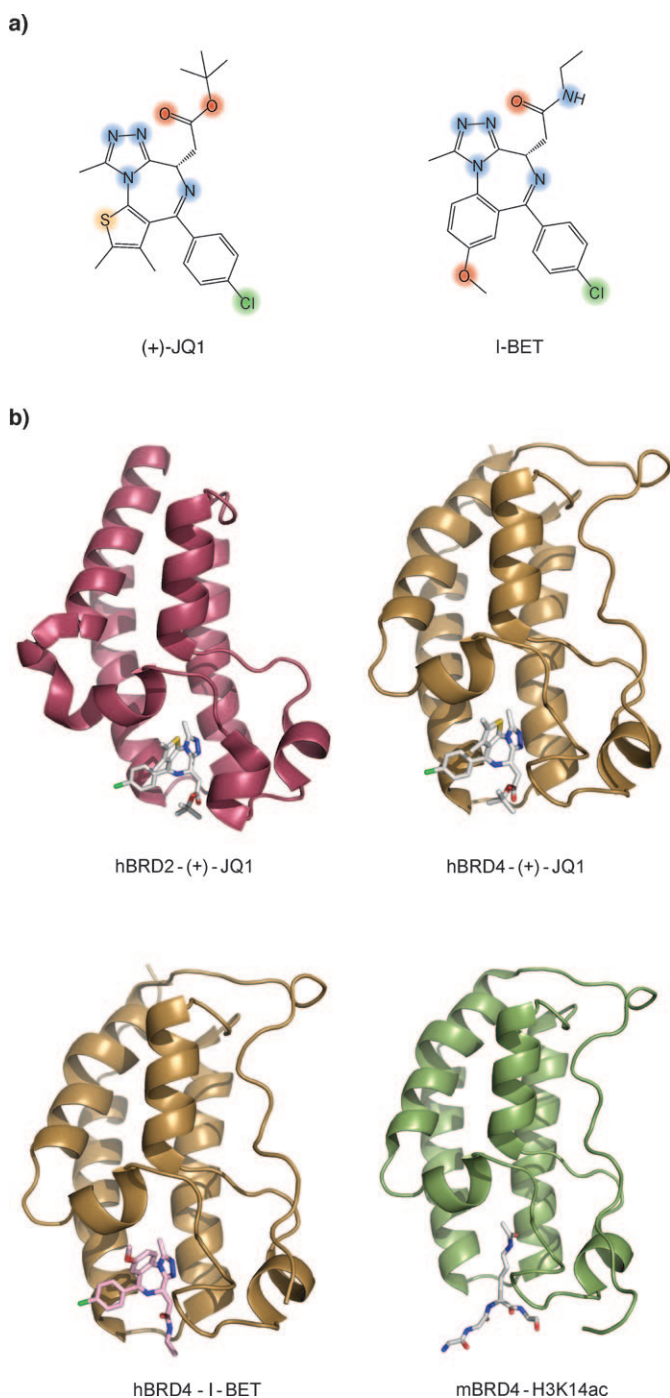
Das Chromatin besteht aus den Histonproteinen und chromosomaler DNA, die regelmäßig um sie gewickelt ist. Der Packungszustand des Chromatins kann den Zugang für die Proteinmaschinen einschränken oder ganz verhindern, die die Transkription der DNA in mRNA bewerkstelligen.<sup>[2]</sup> Posttranslationale Modifikationen (PTMs; z. B. Phosphorylierungen, Acetylierungen und Methylierungen) der Histonmoleküle regulieren den Zugang zur DNA mittels einer Reihe von Mechanismen. Die Kombination von PTMs im richtigen Kontext führt, so nimmt man an, zu einem Histoncode/einer Histonsprache, der/die von einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine interpretiert wird.<sup>[3]</sup> Diese Proteine lassen sich grob in drei Klassen einteilen: „Schreiber“, „Radierer“ und „Ableser“. Die Ableser und Radierer von Histon-PTMs sind Enzyme wie Acetyltransferasen bzw. Deacetylasen, Kinasen bzw. Phosphatasen, Methyltransferasen bzw. Demethylasen. Zu den Protein-Ablesern dieser Histonsprache gehört die Bromodomänenfamilie, die acetylierte Lysinreste in Histonen erkennt.<sup>[4]</sup> Man hat 57 Bromodomänen in 41 verschiedenen menschlichen Proteinen gefunden. Die BET-Unterfamilie (bromodomain-extraterminal) wird durch BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT repräsentiert.<sup>[5]</sup> Ihre Mitglieder haben eine ähnliche Domänenarchitektur wie zwei hochkonservierte aminoterminal Bromodomänen. In zwei jüngeren Studien wurden niedermolekulare Verbindungen vorgestellt, die in spezifischer Weise die Wechselwirkungen

dieser Bromodomänen mit acetylierten Histonmolekülschwänzen unterbrechen.<sup>[6]</sup> Diese Befunde belegen verblüffend das Konzept, dass die Störung von Histon-Ablesern eine tragfähige Strategie für die Entwicklung epigenetischer Wirkstoffe ist.

Filippakopoulos et al. beschreiben ein zellgängiges kleines Molekül, (+)-JQ1, das an Bromodomänen bindet und mit Acetyllysin-haltigen Histonpeptiden konkurriert.<sup>[6a]</sup> (+)-JQ1 ist ein neuartiges Thienotriazolo-1,4-diazepin, das eine *tert*-Butylestergruppe an C6 enthält (Abbildung 1a) und mit nanomolarer Affinität an eine Untergruppe der menschlichen Bromodomänen bindet. Ähnlich den Wechselwirkungen, die man in Acetyllysin-Bromodomänen-Komplexen beobachtet, bildet der Triazolring von (+)-JQ1 eine Wasserstoffbrücke zu einem evolutiv konservierten Asparaginrest (Asn140 bei BRD4 und Asn429 bei BRD2). Bei beiden BRD-Domänen tragen zudem konservierte BET-Reste im Bereich der ZA- und der BC-Schleife zur Ligandenbindung bei (Abbildung 1b). Sterische Wechselwirkungen mit Resten der ZA-Schleife von BRD2 haben beim Enantiomer (–)-JQ1 eine energetisch ungünstige Bindungskonformation zur Folge.

Das für BRD4 kodierende Gen ist von einer wiederkehrenden chromosomalen Translokation, t(15;19), betroffen, die mit einem aggressiven Schwammzellkarzinom des Menschen korreliert ist.<sup>[7]</sup> Diese Translokation führt zur Bildung eines Fusionsgens, das bei der Expression ein Fusionsprotein aus den N-terminalen Tandembromodomänen von BRD4 und dem testikulären Zellkernprotein NUT ergibt. Das BRD4-NUT-Onkoprotein definiert das NUT-Mittellinienkarzinom (NMC), das einen tödlichen Verlauf nimmt. Diese genetisch definierte Anlage bietet eine einzigartige Gelegenheit zu untersuchen, ob niedermolekulare Disruptoren die erwünschte Blockade eines onkogenen Chromatin-Ablesers bewerkstelligen können. Eine humane Zelllinie wurde mit (+)-JQ1 behandelt, und anhand der Fluoreszenzerholung nach dem Photobleichen (FRAP = fluorescence recovery after photobleaching) wurde die Mobilität von GFP-markiertem BRD4 ermittelt (GFP = grün fluoreszierendes Protein). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass (+)-JQ1 chromatingebundenes GFP-BRD4 verdrängt, weil in seiner Gegenwart die Fluoreszenzerholung augenblicklich einsetzte. In anderen Experimenten behandelten die Autoren eine von einem Patienten stammende NMC-Zelllinie mit (+)-JQ1 (500 nM) und beobachteten daraufhin das Verschwinden charakteristischer das NUT-Protein enthaltender Foci in den Zellkernen. In mehreren BRD4-abhängigen NMC-Zellen induzierte eine Behandlung mit (+)-JQ1 eine Differenzie-

[\*] S. S. Oliver, Prof. J. M. Denu  
University of Wisconsin, Department of Biomolecular Chemistry  
and Wisconsin Institute for Discovery  
330 North Orchard Street, Madison WI 53715 (USA)  
E-Mail: jmdenu@wisc.edu



**Abbildung 1.** Niedermolekulare Disruptoren/Inhibitoren epigenetischer Regulatoren. a) (+)-JQ1 und I-BET zielen auf die BET-Familie unter den Bromodomänen. Wichtige Merkmale der Verbindungen sind hervorgehoben. b) Kristallstrukturen der Komplexe von humanem BRD2 und BRD4 mit JQ1 oder I-BET. Zu Vergleichszwecken ist der Komplex aus mBRD4 und H3K14ac ebenfalls gezeigt (unten rechts).<sup>[13]</sup> Die kristallographischen Informationen wurden mit den PDB-ID-Zugangsnummern 3ONI, 3MXF, 3P5O bzw. 3JVK (von links nach rechts und von oben nach unten) gewonnen.

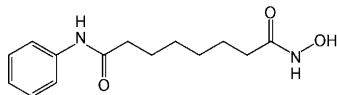
lung und einen Wachstumsstop. Diese Beobachtungen belegen überzeugend, dass (+)-JQ1 den Ableser BRD4 stört und eine onkogene Progression verhindert. Um einen In-vivo-Beleg zu erhalten, untersuchten die Autoren mehrere von

Patienten stammende Xenotransplantat-Modelle. Mäuse mit etablierten Tumoren erhielten täglich eine intraperitoneale Injektion von (+)-JQ1, wobei sich herausstellte, dass (+)-JQ1 über 18 Therapietage mit merklicher Tumorrückbildung gut vertragen wurde.

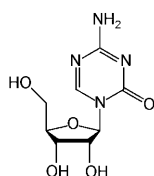
Bei einer Hochdurchsatzdurchmusterung auf Aktivatoren eines ApoA1-Luciferasereporters in HepG2-Zellen identifizierten Nicodeme et al. I-BET, ein optimiertes Derivat einer Benzodiazepinverbindung (Abbildung 1 a).<sup>[6b]</sup> Sie wiesen nach, dass I-BET bei Entzündungsvorgängen die Genexpression beeinflusst, indem es die Wechselwirkung acetylierter Histone mit Chromatin-Ablesern der BET-Familie stört. Die Verbindung bindet mit ähnlicher nanomolarer Affinität an BRD2, BRD3 und BRD4, und ihr Enantiomer bindet wie (–)-JQ1 nicht an Mitglieder der BET-Unterfamilie. Der Triazolring von I-BET imitiert im Wesentlichen die Wechselwirkungen zwischen Acetyllysine, Asn140 und Tyr97 (Abbildung 1 b). Der hydrophobe ZA-Kanal und die WPF-Fläche außerhalb der Acetyllysine-Bindungstasche legen die I-BET-Selektivität noch weiter fest, indem sie die Größe interagierender Moleküle beschränken.

Mit einem Mausmodell für Immunreaktionen kamen Nicodeme et al. zu dem Befund, dass eine I-BET-Behandlung Schutz gegen einen LPS-induzierten Schock (LPS: Lipopolysaccharid) und gegen bakterielle Sepsis verleiht.<sup>[6b]</sup> Der Einfluss von I-BET auf die LPS-induzierbare Genexpression war hochselektiv. Genexpressionsanalysen und epigenetische Profile LPS-induzierbarer Gene ergaben, dass die I-BET-empfindliche Genrepression durch niedrige basale Histon-H3- und -H4-Acetylierung, Trimethylierung von Lys4 an Histon H3 (H3K4me3) und RNA-Polymerase II sowie einen geringen CpG-Gehalt der Promotoren der LPS-induzierbaren Gene gekennzeichnet ist. Höhere basale Mengen an Histon-H3- und -H4-Acetylierung bei nicht betroffenen I-BET-Genpromotoren lassen den Schluss zu, dass diese Gene bereits vorbereitet sind oder aktiv transkribiert werden. Obgleich eine Reihe mechanistischer Fragen noch offen ist, deuten diese Ergebnisse die Möglichkeit einer neuen Generation von Wirkstoffen an, die Entzündungsreaktionen durch Störung der Ableser der Histonsprache modulieren.

Die beiden niedermolekularen Verbindungen (+)-JQ1 und I-BET sind ermutigende Kandidaten für neue therapeutische Ansätze, die unmittelbar auf Ableser von Chromatinmodifikationen zielen, denn sie belegen überzeugend, dass derartige Wirkstoffe möglich sind. Ein Zielen auf das Epigenom als tragfähige Wirkstoffstrategie wird durch die FDA-Wirkstoffe (Abbildung 2) Vorinostat (oder Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA)) und Azacitidin (oder 5-Azacitidin)<sup>[8]</sup> belegt. SAHA ist ein Inhibitor von Histon-Desacetylasen (HDACs) und wird zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms eingesetzt.<sup>[9]</sup> Azacitidin wird bei der DNA-Synthese in das Molekül eingebaut und verhindert eine Methylierung; es wird als Chemotherapeutikum bei myelodysplastischen Syndromen eingesetzt.<sup>[10]</sup> Beide Wirkstoffe wirken im Wesentlichen als Enzyminhibitoren – ein bei der Wirkstoffentwicklung wohletablierter Ansatz. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unbekannt, doch man nimmt an, dass eine Derepression von Tumorsuppressor-Genen auf der Ebene der Transkription stattfindet.<sup>[11]</sup>



SAHA



5-Azacytidin

**Abbildung 2.** Die Strukturen von SAHA und Azacitidin (5-Azacytidin).

Im Fall von SAHA ist bislang noch unklar, welche Desacetylase in Zellen gehemmt werden und welche Desacetylase-Substrate beteiligt sind. HDACs regulieren den Acetylierungszustand zahlreicher Proteine.<sup>[12]</sup> Es könnte daher sein, dass die kombinierte Wirkung auf mehrere HDACs und multiple Substrate der Schlüssel für hohe Wirksamkeit ist. Diese Möglichkeit macht die Wirkstoffverbesserung mittels gerichteter Struktur-Aktivitäts-Beziehungen problematisch. Ähnliche Bedenken könnten im Fall von I-BET zum Tragen kommen, dessen spezifischer Wirkmechanismus ebenfalls noch unklar ist. Da das BRD4-NUT-Onkoprotein genetisch definiert ist, dürfte es im Fall von auf JQ1 beruhenden Verbindungen zur Behandlung eines NMC einfacher sein, mithilfe von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu verbesserten Verbindungen zu gelangen. Die ziemlich bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit von JQ1 und I-BET (Abbildung 1a) legt die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen wahlweise genutzt werden könnten. Um eine mögliche Überlappung ihrer molekularen Ziele zu entdecken, wäre es reizvoll, sie auf ihre Wirkung sowohl als Entzündungs- als auch als NMC-Suppressoren zu untersuchen.

Die nächste Zukunft dürfte intensive Anstrengungen sehen, niedermolekulare Verbindungen zu identifizieren, die in spezifischer Weise aus den Fugen geratene Chromatinbindungsproteine, wie überexprimierte Proteine oder unphysiologische Fusionsproteine als Resultat illegitimer chromosomaler Translokationen, in ihrer Wirkung unterbrechen. Derartige Untersuchungen könnten zu neuen Therapeutika führen. Im mindesten Fall kann die Forschungsgemeinschaft diese Hilfsmittel nutzen, um zu erforschen, wie die Chromatindynamik die Genexpression reguliert. Der jüngste Erfolg mit BET-Disruptoren könnte einen möglichen Paradigmen-

wechsel hin zu einer Aufnahme der Ableser in den Pool der Schreiber und Radierer bei der Entwicklung epigenetischer Modulatoren einläuten.

Eingegangen am 25. Februar 2011

Online veröffentlicht am 25. Mai 2011

- [1] a) G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, 429, 457–463; b) A. D. Goldberg, C. D. Allis, E. Bernstein, *Cell* **2007**, 128, 635–638.
- [2] a) K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, 389, 251–260; b) K. Luger, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, 13, 127–135.
- [3] a) K. E. Gardner, C. D. Allis, B. D. Strahl, *J. Mol. Biol.* **2011**, 409, 36–46; b) S. S. Oliver, J. M. Denu, *ChemBioChem* **2011**, 12, 299–307.
- [4] a) S. Mujtaba, L. Zeng, M. M. Zhou, *Oncogene* **2007**, 26, 5521–5527; b) R. Sanchez, M. M. Zhou, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, 12, 659–665.
- [5] L. Zeng, M. M. Zhou, *FEBS Lett.* **2002**, 513, 124–128.
- [6] a) P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, J. E. Bradner, *Nature* **2010**, 468, 1067–1073; b) E. Nicodeme, K. L. Jeffrey, U. Schaefer, S. Beinke, S. Dewell, C. W. Chung, R. Chandwani, I. Marazzi, P. Wilson, H. Coste, J. White, J. Kiri-lovsky, C. M. Rice, J. M. Lora, R. K. Prinjha, K. Lee, A. Tarakhovsky, *Nature* **2010**, 468, 1119–1123.
- [7] a) C. A. French, I. Miyoshi, J. C. Aster, I. Kubonishi, T. G. Kroll, P. Dal Cin, S. O. Vargas, A. R. Perez-Atayde, J. A. Fletcher, *Am. J. Pathol.* **2001**, 159, 1987–1992; b) J. Engleson, M. Soller, I. Panagopoulos, A. Dahlen, M. Dictor, M. Jerkeman, *BMC Cancer* **2006**, 6, 69; c) C. A. French, I. Miyoshi, I. Kubonishi, H. E. Grier, A. R. Perez-Atayde, J. A. Fletcher, *Cancer Res.* **2003**, 63, 304–307.
- [8] P. A. Marks, W. S. Xu, *J. Cell. Biochem.* **2009**, 107, 600–608.
- [9] a) M. Duvic, J. Vu, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2007**, 16, 1111–1120; b) P. A. Marks, R. Breslow, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 84–90.
- [10] G. M. Keating, *Drugs* **2009**, 69, 2501–2518.
- [11] W. S. Xu, R. B. Parmigiani, P. A. Marks, *Oncogene* **2007**, 26, 5541–5552.
- [12] M. Haberland, R. L. Montgomery, E. N. Olson, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, 10, 32–42.
- [13] F. Vollmuth, W. Blankenfeldt, M. Geyer, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 36547–36556.