

Identifizierung von niedermolekularen kovalenten Bromodomäne-Bindern aus einer DNA-kodierten Bibliothek**

Jean-Pierre Daguer, Claudio Zambaldo, Daniel Abegg, Sofia Barluenga, Cynthia Tallant, Susanne Müller, Alexander Adibekian und Nicolas Winssinger*

Abstract: Die Regulierung von transkriptionellen Programmen durch epigenetische Leser (Bromodomänen) wurde mit der Entwicklung von mehreren Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Sie ist vor allem bei der Regulierung des Zellwachstums, Umgehung der Apoptose, bei Krebs sowie bei Entzündungskrankheiten beteiligt. Die Entdeckung niedermolekularer Sonden, um die Rolle der Bromodomänen zu studieren, hat daher eine große Bedeutung. Wir zeigen, dass spezifische konservierte Cysteine in den Bromodomänen kovalent abgefangen werden können. Wir berichten über die Entdeckung von zwei niedermolekularen Substanzen, die eine kovalente Bindung mit konservierten Cysteinen in der Familie von Bromodomänen eingehen, analysieren die Teilmenge an Bromodomänen die durch die kovalente Bindung angesprochen werden kann und demonstrieren Proteomanalysen durch Anreicherung von Bromodomänen aus nativen Zell-Lysaten.

Bromodomänen sind wichtige Akteure in der epigenetischen Regulierung. Bromodomänen sind kleine Domänen (etwa 110 Aminosäuren), die als epigenetische Leser an acetylierten Lysinen in Histonschwänzen von Chromatin binden und dadurch transkriptionelle Vorgänge modulieren, die dann phänotypische Veränderungen verursachen. Das menschliche Proteom kodiert 61 Bromodomänen, die trotz

niedriger Sequenzhomologie, gemeinsam eine aus vier α -Helices zusammengesetzten Tasche aufweisen (Z, A, B, C).^[1] Die Helices B-C und Z-A sind miteinander über variable Linker verbunden. Acetylierte Lysine werden durch einen großen hydrophoben Hohlraum in den Proteinen gebunden, und diese Taschen sind für die Entwicklung von niedermolekularen Inhibitoren besonders attraktiv.^[2] Nichtsdestotrotz variiert die Ansprechbarkeit gegenüber Inhibitoren innerhalb der Bromodomänenfamilie erheblich,^[3] und Inhibitoren wurden bislang nur für wenige Bromodomänen beschrieben.^[1,4–7] Proteine mit Bromodomänen sind an einer Vielzahl von biologischen Funktionen beteiligt und agieren unter anderem als Transkriptionsregulatoren oder als Bestandteile der Chromatin-Umbaukomplexe.^[8] Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Proteine an zahlreichen Krankheiten, zum Beispiel Krebs und Entzündungskrankheiten, beteiligt sind. Die Entwicklung von molekularen Wirkstoffen für pharmakologische Interventionen sowie weitere Studien zu ihren biologischen und pathophysiologischen Funktionen sind daher gerechtfertigt. Die Nützlichkeit potenter und selektiver Inhibitoren, wie des BET-selektiven Inhibitors (JQ1), in einer Vielzahl von Krebserkrankungen^[9] hat für therapeutische Strategien neue Wege eröffnet, und die ersten BET-Inhibitoren sind bereits in klinischen Studien. Diese Entdeckungen haben zugleich zu neuen Initiativen bei der Suche nach neuartigen Inhibitoren dieser interessanten Proteinfamilie geführt.^[2] Während selektive Inhibitoren für die Erforschung der Biologie einzelner Proteine von entscheidender Bedeutung sind, ist eine niedermolekulare Substanz mit größerem Selektivitätsprofil ebenfalls nützlich, um die biologische Rolle der gesamten Familie zu erkunden. Der erste Breit-spektrum-Inhibitor der Bromodomänen ist neulich beschrieben worden (<http://www.thesgc.org/chemical-probes/bromosporine>). Er stellt ein nützliches Werkzeug zur Erkundung der Biologie dieser Domänen sowie zur Etablierung von funktionellen In-vitro- und Zellassays dar. Angelehnt an die Erfolge des aktivitätsbasierten Protein-Profilings^[10] und auch der kovalenten Kinaseinhibitoren^[11–17] könnten Cystein-bindende und Bromodomänen-gerichtete Moleküle auch einen generellen Zugang zu kovalenten Sonden für Bromodomänen bieten. Hier berichten wir über die Entdeckung von zwei niedermolekularen Substanzen mit größerem Selektivitätsprofil, die kovalent an Bromodomänen binden. Wir analysieren die Verteilung von Cysteinen innerhalb der Familie der Bromodomänen und demonstrieren den Nutzen dieser Sonden zur Anreicherung von Bromodomänen für Proteomanalysen.

Als Ausgangspunkt für die Entdeckung von neuen Bromodomäne-Sonden führten wir ein Affinitätscreening

[*] Dr. J.-P. Daguer, C. Zambaldo, D. Abegg, Dr. S. Barluenga, Prof. A. Adibekian, Prof. N. Winssinger
School of Chemistry and Biochemistry, NCCR Chemical Biology, University of Geneva
30 quai Ernest-Ansermet, Geneva (Schweiz)
E-Mail: nicolas.winssinger@unige.ch
Dr. C. Tallant, Dr. S. Müller
Structural Genomics Consortium, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford
Old Road Campus Research Building
Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ (Großbritannien)
und
Target Discovery Institute, University of Oxford
NDM Research Building
Roosevelt Drive, Headington, Oxford OX3 7FZ (Großbritannien)s

[**] Diese Arbeit wurde vom NCCR Chemical Biology und vom SNF gefördert. Wir danken P. Morieux und M. Ciobanu für technische Unterstützung. Das SGC ist eine gemeinnützige Einrichtung (Nummer 1097737), finanziert von AbbVie, Bayer Pharma AG, Boehringer Ingelheim, der Canada Foundation for Innovation, Genome Canada, GlaxoSmithKline, Janssen, Lilly Canada, der Novartis Research Foundation, dem Ontario Ministry of Economic Development and Innovation, Pfizer, Takeda und dem Wellcome Trust [092809/Z/10/Z].

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201412276> zu finden.

mit PCAF („P300/CBP-associated Factor“) durch. Dabei setzten wir eine Bibliothek von PNA-kodierten Molekülfragmenten ein, die auf einem DNA-Mikrochip kombinatorisch präsentiert sind.^[18–21] Wir identifizierten 25 Fragmente, die dann über Zusammenschluss mit 25 unterschiedlichen Synthonen für die Synthese einer fokussierten Bibliothek mit 625 Substanzen verwendet wurden (siehe die Hintergrundinformationen für Details zur Synthese).^[22,23] Wie in der Abbildung 1 gezeigt, wurde die Bibliothek gegen PCAF gescreent und dies führte zur Identifizierung von Verbindungen **8a1b** und **19a1b**. Das **1b**-kodierte Fragment ist Etacrynsäure, ein durch die FDA zugelassenes Medikament zur Behandlung von Bluthochdruck, das als Bindepartner von Glutathion-S-Transferase (GST) bereits bekannt ist.^[24] Die mit **8a** und **19a** kodierten Fragmente sind Serine mit einer Alkylkette bzw. einem Thiazepin. Interessanterweise zeigt die Kombination von **8a** und **1b** strukturelle Ähnlichkeiten mit einigen bereits beschriebenen PCAF-Inhibitoren, in denen ein funktionalisierter Phenylring mit einer Alkylkette substituiert ist.^[25,26] Zusätzlich beinhalten mehrere identifizierte Bromodomäne-Liganden das Diazepin-Motiv, ähnlich zum Fragment **19a**.^[2] In Anbetracht einer möglichen kovalenten Bindung zu PCAF, wurden beide Substanzen auch als Biotin-Konjugate (**8a1b**-Biotin, **19a1b**-Biotin) synthetisiert, um die Art der Wechselwirkung mit PCAF und anderen Bromodomänen zu bestimmen.

Inkubation von **8a1b**-Biotin mit aufgereinigtem PCAF gefolgt von SDS-PAGE Analyse belegte die Bildung eines kovalenten Komplexes. Um den Grad der Selektivität der Bindung zu PCAF zu beurteilen, wurde die gleiche Reaktion in mehreren Verdünnungen von PCAF (2.8 bis 0.15 μM) in Zell-Lysaten durchgeführt (Abbildung 2A). PCAF wurde sogar bei der niedrigsten getesteten Konzentration (150 nM) eindeutig markiert. Ein zeitlicher Verlauf der Reaktion zwischen **8a1b**-Biotin und PCAF unter den identischen Bedingungen zeigte eine vollständige Umsetzung nach 30 min (Abbildung 2B). MALDI-Analyse des Reaktionsproduktes zeigte die korrekte Masse für das erwartete Addukt (Abbildung 2C). Auf der Grundlage der bekannten Reaktion zwischen Etacrynsäure und GST führten wir eine kompetitive Markierung zwischen PCAF und GST durch. Als beide Proteine in gleicher Konzentration (400 nM) mit einem Überschuss an **8a1b**-Biotin inkubiert wurden, konnte PCAF mit einem Verhältnis > 10:1 markiert werden (Abbildung 2D). Darüber hinaus wurde die Markierung von PCAF durch **8a1b**-Biotin trotz der Zugabe eines fünffachen molaren Überschusses an Etacrynsäure nicht aufgehoben (Abbildung SI-1).

Als nächstes verglichen wir die Reaktivität von **8a1b**-Biotin und **19a1b**-Biotin gegenüber einer Serie von 32 verschiedenen Bromodomänen (Abbildung 3) und analysierten die Positionierung der Cysteine in menschlichen Bromodomänen mithilfe eines bekannten Programms^[1] für struktur-basiertes Sequenz-Alignment (Abbildung 4). Von 61 Bromodomänen, enthalten 55 einen oder mehrere Cystein-Reste in der Nähe der Substratbindetasche, die durch kovalente Wechselwirkungen angezielt werden könnten (Abbildung 4; siehe Tabelle SI-1 für die vollständige Sequenzanalyse). Diese sind auf drei Bereiche verteilt: die Schleife zwi-

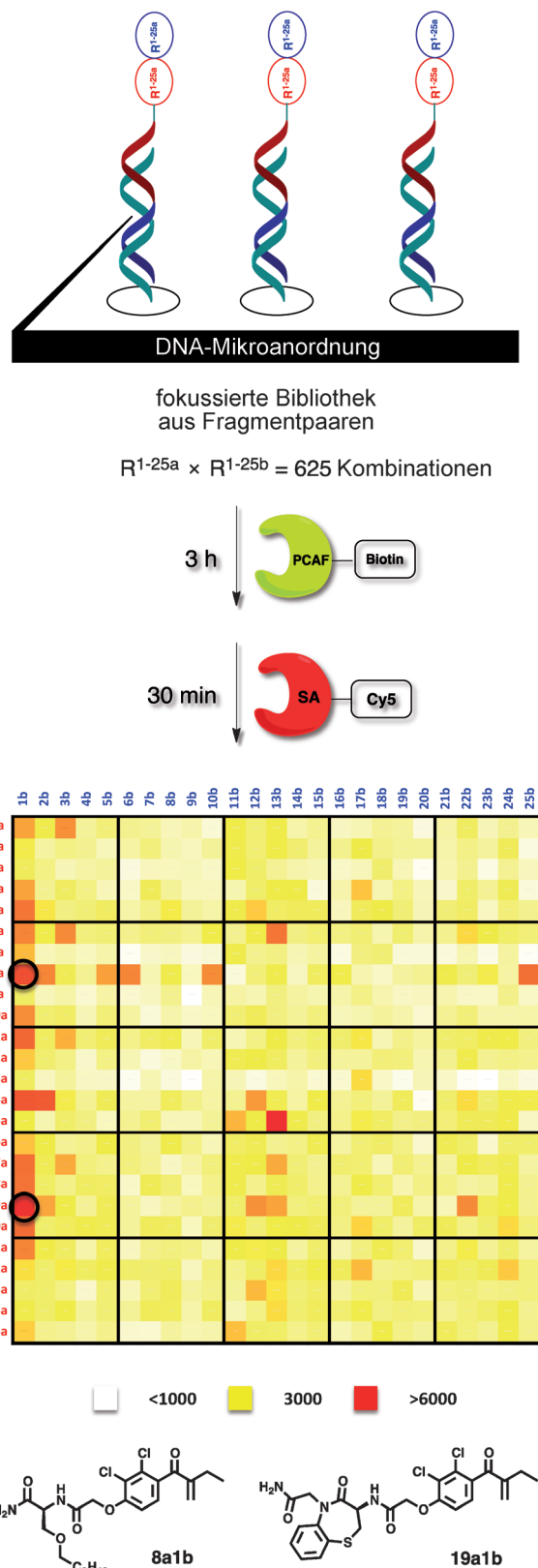
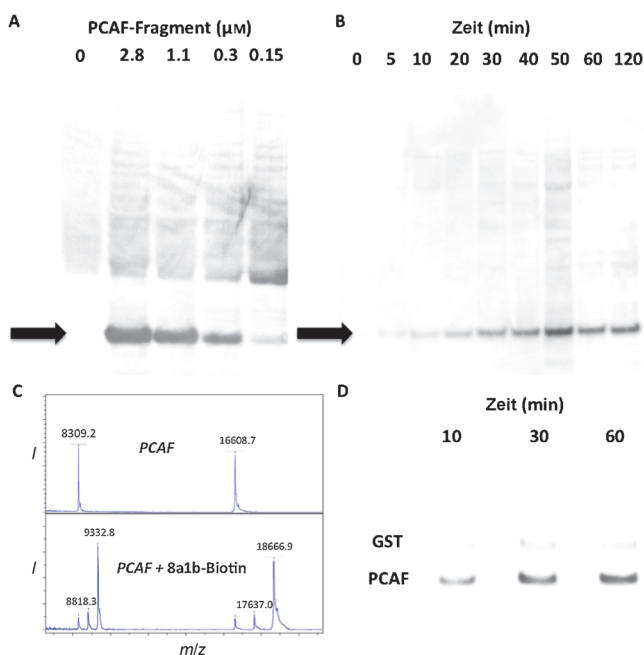
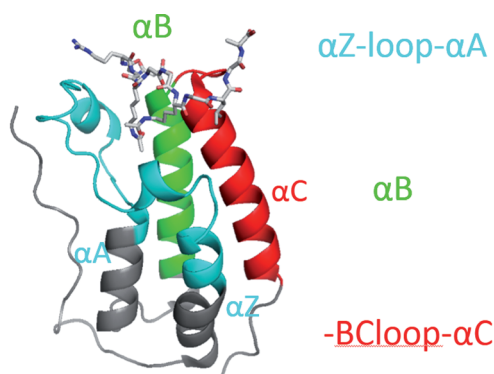


Abbildung 1. Screening von 100 nM PCAF gegen eine fokussierte Bibliothek mit 625 Substanzen (siehe die Hintergrundinformationen für die Strukturen der Fragmente). Punkte repräsentieren die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 24 Messungen für jede Verbindung (Standardabweichung < 5 %). Verbindungen in jeder Reihe haben den gleichen ersten Baustein und Verbindungen in jeder Spalte den zweiten.





BRD4 (2); PHIP (2); WDR9 (2); LOC933349 (1); SP140 (1); SP100 (1); SP110C (1); TIF1 (1); TRIM33A (1); TRIM33B (1); TRIM66 (1); TRIM28 (1); BRWD3 (1); PHIP (1); WDR9 (1); ASH1L (1); PB1 (1); PB1 (3); PB1 (4); SMARCA2A (1); PB1 (6)

CECR2 (1); FALZ (1); GCN5L2 (1); PCAF (1); BRD2 (1); BRD3 (1); BRD4 (1); BRDT (1); BRD2 (2); BRD3 (2); BRD4 (2); BRDT (2); BAZ1 (1); PHIP (2); WDR9 (2); ATAD2 (1); KIAA1240 (1); BRD1 (1); BRPF1A (1); BRPF1B (1); BRPF3 (1); BRD7 (1); BRD9 (1); TIF1 (1); TRIM33A (1); TRIM33B (1); TRIM66 (1); BAZ2A (1); BAZ2B (1); PRKCBP1 (1); PB1 (3); PB1 (5); SMARCA2A (1); SMARCA2B (1); SMARCA4 (1)

CECR2 (1); FALZ (1); GCN5L2 (1); PCAF (1); BAZ1B (1); CREBBP (1); EP300 (1); TRIM66 (1); PRKCBP1 (1); TAF1 (1); TAF1L (1); TAF1 (2); TAF1L (2); MYND11 (1); BRWD3 (1); PHIP (1); WDR9 (1); ASH1L (1); PB1 (1); PB1 (6)

Abbildung 4. Positionierung der Cysteine innerhalb der drei Schleifen der Bromodomänen (cyan, grün und rot). Links: Struktur der BRD4 (1) im Komplex mit einem Peptid mit zwei acetylierten Lysinresten (PDB-ID: 3UVW) als repräsentative Bromodomänenstruktur mit Schleifen zwischen den α Z- und α A-Helices (cyan – Die Länge und die Struktur dieser Schleifen unterscheidet sich innerhalb der Familie der Bromodomänen); die α B-Helix (grün) und BCloop- α C-Helix (rot – Die Länge der BC-Schleife unterscheidet sich innerhalb der Familie der Bromodomänen).

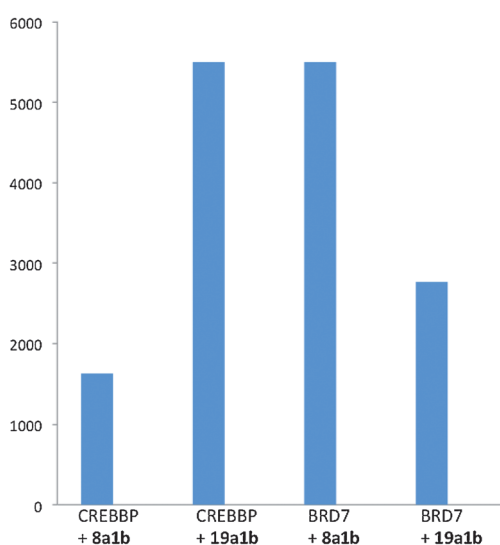


Abbildung 5. Quantifizierung der CREBBP- und BRD7-Markierung durch **8a1b** und **19a1b**. Die Markierungen wurden parallel und unter gleichen Bedingungen wie in Abbildung 3 durchgeführt.

angereichert (Tabelle SI-2). Als nächstes haben wir die Fähigkeiten der Sonden **8a1b**-Biotin und **19a1b**-Biotin zur Anreicherung von Bromodomänen aus MV4-11-Zellen verglichen, basierend auf der Tatsache, dass das Wachstum dieser Zellen durch den BRD4-Liganden JQ1 gehemmt wird.^[9,28] BRD4 wurde zusammen mit neun anderen Bromodomänen (TRIM28, TRIM33, SMARCA2, SMARCA4, ATAD2, BAZ1A, BAZ1B, PHIP, PB1, GCN5L2) durch die beiden aktiven Sonden angereichert, aber nicht durch das reduzierte Analogon von **8a1b**-Biotin (Tabelle SI-2). Darüber hinaus wurde eine andere Bromodomäne (BRWD3) ausschließlich durch **19a1b**-Biotin angereichert, was wiederum das Potenzial für selektive Markierung der einzelnen Bromodomänen durch unterschiedliche Pharmakophoren zeigt. Kleine Moleküle, die GCN5L2 binden, könnten Anwendung in der Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL)^[29] finden, und **19a1b** stellt einen hervorragenden Ausgangspunkt für die Entwicklung selektiver GCN5L2-

Inhibitoren dar. Außerdem führte die Vorbehandlung der MV4-11-Zell-Lysaten mit JQ1 verglichen mit den anderen Bromodomänen zu einer Reduktion der BRD4-Anreicherung durch **8a1b**-Biotin. Diese Beobachtung entsprach auch den Ergebnissen aus den Konkurrenzexperimenten mit dem aufgereinigten Protein (Abbildung SI-4). Abschließend ist festzustellen, dass auch verschiedene andere Proteine durch die Sonden angereichert wurden, die keine Bromodomänen enthalten, z. B. ANAPC7, ACOT7, TK1, ZAK, MAP2K7 und ALDH1A3. Diese Proteine enthalten in der Regel funktionelle Cysteine^[30] und sind auch bekannte Ziele von Michael-Akzeptor-basierten Kinaseinhibitoren.^[31]

Zusammenfassend, haben wir mittels einer DNA-basierenden Kleinmolekülbibliothek Etacrynsäure-Derivate identifiziert, die kovalent an Cysteine von Bromodomänen binden. Wir haben festgestellt, dass Cysteine in mindestens fünf unterschiedlichen Positionen in den menschlichen Bromodomänen (C133–C136, C137, C151, C157) kovalent gebunden werden können. Dies deutet darauf hin, dass mindestens 40 der 61 Bromodomänen mit kovalenten Inhibitoren angezielt werden könnten. Obwohl die identifizierten Verbindungen gegenüber der einzelnen Bromodomänen relativ unselektiv waren, zeigte es sich, dass die Selektivität durch unterschiedliche Pharmakophoren beeinflusst werden kann. Unseres Wissens ist dies der erste Bericht über kovalente Bromodomänen-Inhibitoren. Wir haben dargelegt, dass **8a1b**-Biotin und **19a1b**-Biotin zur Anreicherung von Bromodomänen aus Zell-Lysaten für Proteomanalysen geeignet sind. Da Bromodomänen häufig Teile eines größeren Komplexes sind (z. B. SMARCA2/4 als Teil des BAF- oder PCAF-Komplexes), sind diese molekularen Sonden auch nützlich für das Studium der biologischen Rolle dieser wichtigen Proteine mithilfe von Proteomanalysen. Es sollte auch erwähnt werden, dass die vorgestellten Moleküle komplementär zu den anderen Breitspektrum-Bromodomänen-Liganden, z. B. Bromosporin, sind. Wir gehen davon aus, dass unsere Ergebnisse eine Inspiration für weitere Entwicklungen von kovalenten Inhibitoren sind, die Pharmakophore mit Michael-Akzeptoren oder anderen pharmakologisch geeigneten Cystein-Fallen verbinden. Es ist auch erwähnenswert, dass die Etacrynsäure vor kurzem in einem Hoch-

durchsatzscreening für EP300-Inhibitoren identifiziert worden ist^[32] und auch dass das Butylester-Derivat der Etacrynsäure Apoptose in Leukämiezellen durch einen von GST unabhängigen Mechanismus induzierte.^[33]

Stichwörter: Aktivitätsbasiertes Protein-Profilierung · Bromodomäne · Kovalente Inhibitoren · Mikrochips

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6057–6061
Angew. Chem. **2015**, *127*, 6155–6159

- [1] P. Filippakopoulos et al., *Cell* **2012**, *149*, 214–231.
- [2] P. Filippakopoulos, S. Knapp, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 339–358.
- [3] L. R. Vidler, N. Brown, S. Knapp, S. Hoelder, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7346–7359.
- [4] S. Picaud, D. Da Costa, A. Thanasopoulou, P. Filippakopoulos, P. V. Fish, M. Philpott, O. Fedorov, P. Brennan, M. E. Bunnage, D. R. Owen, J. E. Bradner, P. Taniere, B. O'Sullivan, S. Muller, J. Schwaller, T. Stankovic, S. Knapp, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3336–3346.
- [5] D. A. Hay, O. Fedorov, S. Martin, D. C. Singleton, C. Tallant, C. Wells, S. Picaud, M. Philpott, O. P. Monteiro, C. M. Rogers, S. J. Conway, T. P. C. Rooney, A. Tumber, C. Yapp, P. Filippakopoulos, M. E. Bunnage, S. Mueller, S. Knapp, C. J. Schofield, P. E. Brennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9308–9319.
- [6] P. Ciceri, S. Mueller, A. O'Mahony, O. Fedorov, P. Filippakopoulos, J. P. Hunt, E. A. Lasater, G. Pallares, S. Picaud, C. Wells, S. Martin, L. M. Wodicka, N. P. Shah, D. K. Treiber, S. Knapp, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 305.
- [7] E. H. Demont, P. Bamborough, C. W. Chung, P. D. Craggs, D. Fallon, L. J. Gordon, P. Grandi, C. I. Hobbs, J. Hussain, E. J. Jones, A. Le Gall, A. M. Michon, D. J. Mitchell, R. K. Prinjha, A. D. Roberts, R. J. Sheppard, R. J. Watson, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1190–1195.
- [8] S. Muller, P. Filippakopoulos, S. Knapp, *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, *13*, e29.
- [9] P. Filippakopoulos et al., *Nature* **2010**, *468*, 1067–1073.
- [10] D. K. Nomura, M. M. Dix, B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 630–638.
- [11] M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, *Science* **2005**, *308*, 1318–1321.
- [12] E. Leproult, S. Barluenga, D. Moras, J. M. Wurtz, N. Winssinger, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1347–1355.
- [13] L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. Sirisawad, E. Verner, D. Lory, B. Chang, S. Li, Z. Y. Pan, D. H. Thamm, R. A. Miller, J. J. Buggy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13075–13080.
- [14] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, K. K. Wong, *Oncogene* **2008**, *27*, 4702–4711.
- [15] Q. S. Liu, Y. Sabnis, Z. Zhao, T. H. Zhang, S. J. Buhrlage, L. H. Jones, N. S. Gray, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 146–159.
- [16] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, *Nature* **2013**, *503*, 548–551.
- [17] W. J. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. N. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Iacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne, *Nature* **2009**, *462*, 1070–1074.
- [18] C. Zambaldo, S. Barluenga, N. Winssinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 8–15; J. L. Harris, N. Winssinger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6792–6801.
- [19] J. P. Daguer, M. Ciobanu, S. Alvarez, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 625–632; J.-P. Daguer, M. Ciobanu, S. Barluenga, N. Winssinger, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1502–1505.
- [20] N. Winssinger, K. Gorska, M. Ciobanu, J. P. Daguer, S. Barluenga, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1050*, 95–110.
- [21] C. J. Zhang, C. Y. J. Tan, J. Y. Ge, Z. K. Na, G. Y. J. Chen, M. Uttamchandani, H. Y. Sun, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14060–14064; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14310–14314.
- [22] D. Chouikhi, M. Ciobanu, C. Zambaldo, V. Duplan, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 12698–12704.
- [23] H. D. Urbina, F. Debaene, B. Jost, C. Bole-Feysot, D. E. Mason, P. Kuzmic, J. L. Harris, N. Winssinger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1790–1797; A. Novoa, T. Eierhoff, J. Topin, A. Varrot, S. Barluenga, A. Imbert, W. Roemer, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8885–8889; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 9031–9035; J. P. Daguer, C. Zambaldo, M. Ciobanu, P. Morieux, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 739–744.
- [24] J. C. Somberg, J. Molnar, *Am. J. Ther.* **2009**, *16*, 102–104.
- [25] L. Zeng, J. M. Li, M. Muller, S. Yan, S. Mujtaba, C. F. Pan, Z. Y. Wang, M. M. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2376–2377.
- [26] K. Balasubramanyam, V. Swaminathan, A. Ranganathan, T. K. Kundu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19134–19140.
- [27] N. Nagaraj, J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Paeebo, M. Mann, *Mol. Sys. Biol.* **2011**, *7*, 548.
- [28] J. A. Mertz, A. R. Conery, B. M. Bryant, P. Sandy, S. Balasubramanian, D. A. Mele, L. Bergeron, R. J. Sims, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16669–16674.
- [29] T. Holmlund, M. J. Lindberg, D. Grander, A. E. Wallberg, *Leukemia* **2013**, *27*, 578–585.
- [30] E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. D. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, *468*, 790–U779.
- [31] B. R. Lanning, L. R. Whitby, M. M. Dix, J. Douhan, A. M. Gilbert, E. C. Hett, T. Johnson, C. Joslyn, J. C. Kath, S. Niessen, L. R. Roberts, M. E. Schnute, C. Wang, J. J. Hulce, B. X. Wei, L. O. Whiteley, M. M. Hayward, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 760–767.
- [32] Y. R. Na, K. C. Han, H. Park, E. G. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *434*, 879–884.
- [33] R. Wang, C. Li, D. Song, G. Zhao, L. Zhao, Y. Jing, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7856–7864.

Eingegangen am 22. Dezember 2014
Online veröffentlicht am 13. März 2015