

Identifizierung potenzieller Taspase1 Inhibitoren für die Behandlung von t(4,11) akuter Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

von

Vanessa Luciano
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main

(D30)

vom Fachbereich 14 der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek, Institut für Pharmazeutische Biologie
Fachbereich 14
2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Fürst, Institut für Pharmazeutische Biologie
Fachbereich 14

Datum der Disputation: 18.01.2022

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Die Blutkrankheit Leukämie.....	2
1.2 Das Wildtypprotein MLL (mixed-lineage leukemia).....	5
1.2.1 Chromosomale Translokation.....	5
1.2.2 T(4,11) Translokation.....	7
1.2.3 Aufbau und Funktionen des MLL-Proteins.....	8
1.2.4 Behandlungsstrategien bei t(4,11) Translokation.....	12
1.3 Die Threonin-Aspartase 1 (Taspase1).....	13
1.3.1 Die Signifikanz von Taspase1 in Krebsforschung.....	13
1.3.2 Struktur und Funktion von Taspase1.....	16
1.4 Die Methode Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF).....	19
1.5 Closantel sodium.....	21
1.6 Ziel dieser Arbeit.....	23
2 Material.....	24
2.1 Laborausüstung.....	24
2.2 Chromatographie.....	25
2.3 Membranen (Ultrafiltration, Dialyse und Western Blot).....	25
2.4 Kits.....	25
2.5 DNA- und Proteinlängenstandards.....	25
2.6 Fluorophore zur Markierung von Proteinen.....	26
2.7 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten.....	26
2.8 Plasmide.....	26
2.9 Bakterienstämme.....	27
2.10 Zelllinie.....	27
2.11 Getestete Substanzbibliothek.....	28
2.12 Chemikalien.....	28
2.13 Medien, Puffer, Lösungen.....	29
2.13.1 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	29
2.13.2 Nährmedien für <i>E.coli</i>	29
2.13.3 Agarosegelelektrophorese.....	30
2.13.4 Antibiotika und Antikörper.....	30
2.13.5 Tricin-SDS-Polyacrylamidelektrophores.....	31
2.13.6 Induktionsmittel für die Proteinexpression.....	32

2.13.7	Stammlösungen für die Lyse von Zellpellets	32
2.13.8	Arbeiten mit Proteinen	32
2.13.9	Puffer.....	32
2.14	Software.....	34
3	Methoden.....	35
3.1	Standardmethoden.....	35
3.1.1	Gerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten.....	35
3.1.2	Gibson Assembly.....	36
3.1.3	DNA-Sequenzierung.....	36
3.1.4	Mikrobiologische Methoden	37
3.1.5	Zellaufschluss von E. coli	37
3.1.6	Entsorgung von Mikroorganismen	37
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.2.1	Heterologe Proteinexpression in E.coli.....	37
3.2.2	Zellfreie Proteinexpression.....	38
3.2.3	Metallchelataffinitätschromatographie.....	38
3.2.4	Einkonzentrieren von Proteinlösungen.....	39
3.2.5	Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	39
3.2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
3.2.7	Markierung der SNAP-CS1/CS2-sGFP mit Fluorophoren.....	40
3.3	Analytische Methoden.....	40
3.3.1	Tricin-SDS-Polyacrylamidelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE)	40
3.3.2	Färbung von Polyacrylamidgelen mit InstantBlue™	40
3.3.3	Analyse von Polyacrylamidgelen durch Fluoreszenz	40
3.3.4	Western Blotting.....	41
3.3.5	HTRF-Assay	41
3.3.6	Screening der FDA- Library (& Dose-Response)	43
3.3.7	Isothermale Titrationskalorimetrie (Affinity - ITC)	44
3.3.8	MALDI-TOF	44
3.3.9	Kristallisation (Sitting-Drop Methode).....	45
3.4	Zellbiologische Methoden.....	45
3.4.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	45
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl.....	46
3.4.3	Transfektion mit <i>Sleeping beauty</i>	46
3.4.4	Herstellung des Zelllysats	46

3.4.5	Closantel sodium Behandlung	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Vorarbeiten zu diesem Thema - Entwickeltes Testsystem	48
4.2	Erweiterung der HTRF Screening Assays	50
4.3	Codon-optimierte Taspase1.....	57
4.4	Finale Version des HTRF Screening Assays mit integriertem zellfreiem System.....	61
4.5	Screening der FDA zugelassenen Medikamente	63
4.6	Dosis-Wirkungs-Beziehung (Dose Reponse) von Primaquine bisphosphate und Closantel sodium.....	66
4.7	MALDI-TOF	69
4.8	Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC).....	71
4.9	Closantel sodium Behandlung in HEK293T	73
4.10	Kristallisation von wtTaspase1 und Closantel sodium.....	75
4.11	Strukturuntersuchung der wtTaspase1 während des Substratbindens	77
5	Diskussion.....	82
5.1	Erweiterung des HTRF Screening Assays	83
5.2	Vielversprechender Inhibitor Closantel sodium.....	85
5.3	Charakterisierung der Interaktion von Closantel sodium und Taspase1.....	86
6	Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis.....	89
7	Abkürzungsverzeichnis	91
8	Literaturverzeichnis.....	93
9	Anhang	102
9.1	Plasmidkarten.....	102
9.2	Chemische/physikalische Eigenschaften Closantel sodium & Primaquine bisphosphate	107
9.3	ITC Graphen	108
9.4	Getestete FDA Library.....	110
9.5	Getesteten PPI Fragment-Library.....	141
10	Danksagung.....	146
11	Eidesstaatliche Erklärung.....	147
12	Persönliche Daten	148

Zusammenfassung

Leukämie ist die häufigste bösartige Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter. Bei einem Kind von 1120 Kindern wird Leukämie diagnostiziert, dabei trifft diese Diagnose Jungen 30 % häufiger als Mädchen. Die Krankheitssymptome treten bei den Kindern noch vor dem Schulalter auf und am häufigsten haben die Kinder mit der akuten Form zu kämpfen. Bei einer Diagnose mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) haben die Kinder meist eine gute Prognose, während bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine deutlich schlechtere.¹

Die t(4;11)(q21;q23) Translokation ist aufgrund ihres häufigen Auftretens und der damit schlechten verbundenen Prognose eines der bekanntesten strukturellen Chromosomenanomalien bei akuten Leukämien. Diese Translokation wurde das erste Mal 1977 von *Oshimura et al.* beschrieben.² Bei einer t(4;11)-Translokation ist das Chromosom 4 und das Chromosom 11 involviert. Auf Chromosom 4 ist das AF4-Gen lokalisiert (AFF1) und auf dem Chromosom 11 liegt das MLL-Gen (ALL-1, HRX, hTRX, KMT2A).

Taspase1 wurde als ein proteolytisch prozessierendes Enzym identifiziert, das sich in Wirbellosen und Vertebraten zusammen mit Mitgliedern der Trithorax/MLL/KMT2A-Proteinfamilie koevolviert hat. Taspase1 prozessiert nicht nur das MLL und MLL2, deren Fusionsproteine AF4-MLL, sondern auch den Transkriptionsfaktor IIA (TFIIA) sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.³

Die Dimerisierung von Taspase1 löst eine intrinsische Serinproteasefunktion aus, die zum katalytischen Rest Thr234 führt, der die Konsensussequenz Q⁻³X⁻²D⁻¹•G¹X²D³D⁴ katalysiert, die in Mitgliedern der MLL-Familie sowie im Transkriptionsfaktor TFIIA vorhanden ist. Taspase1 ist kein klassisches Enzym, da es seine Zielproteine stöchiometrisch hydrolysiert. Diese Eigenschaft macht es nahezu unmöglich, in einem klassischen Screening-Setup nach potenziellen Inhibitoren zu screenen.

In dieser Arbeit wurde ein *Homogeneous time-resolved fluorescence* HTRF-Reporter-Assays etabliert. Das etablierte Testsystem ermöglicht erstmalig die Untersuchung von Substanzen zusammen mit Taspase1 Monomere, die in einem zellfreien System (cfs) hergestellt wurden. Durch die Expression non monomeren Taspase1 Proteinen sollten Inhibitoren durch das etablierte Screening-Verfahren gefunden werden, die sowohl (1) Dimerisierung, (2) Autoaktivierung oder (3) Substratbindung selektiv blockieren können. Die durchgeführten Experimente führten zur Identifikation eines ersten Taspase1-Inhibitors, Closantel sodium. Closantel sodium ist ein *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenes Medikament, das Taspase1 auf nicht-kovalente Weise bindet. Die erzielten Daten zeigen, dass Closantel sodium den Dimerisierungsschritt und/oder die intrinsische Serinproteasefunktion blockiert. Closantel sodium hemmte die Spaltung des eingesetzten CS2-Substratproteins mit einem IC₅₀ zwischen 1,6 und 3,9 µM, je nachdem, welches Taspase1-Präparat in dem HTRF Screening Assay verwendeten (cfs- oder E.coli-produziert). Die Daten weisen darauf hin, dass Closantel sodium als allosterischer Inhibitor gegen die Taspase1 fungiert. Taspase1 wird zur Aktivierung der AF4-MLL-Onkofusionsproteine benötigt und wird auch in mehreren soliden Tumoren überexprimiert. Daher könnte dieser neue Inhibitor für die weitere Validierung von Taspase1 als Ziel für die Krebstherapie und für das Design potenterer Liganden für zukünftige klinische Anwendungen nützlich sein.

1 Einleitung

1.1 Die Blutkrankheit Leukämie

„Alle 12 Minuten erhält in Deutschland ein Mensch die niederschmetternde Diagnose Blutkrebs, weltweit alle 27 Sekunden. Blutkrebs ist nach wie vor die häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle bei Kindern.“⁴ Im Volksmund ist der Begriff Blutkrebs eine Erkrankung der weißen Blutkörperchen (Leukozyten), doch wenigen ist bewusst, dass es viele verschiedene Arten von Blutkrebs mit unterschiedlichen Verläufen gibt. Der Begriff Blutkrebs fasst verschiedene bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems zusammen, dazu gehören Leukämien, Lymphome und Myelome. Leukämie setzt sich aus den griechischen Wörtern „leukós“ und „háima“ zusammen, zu Deutsch „weiß“ und „Blut“.

Recherchen in der Literatur nach dem Entdecker der Leukämie ergaben, dass zwei Ärzte - John Bennett und Rudolf Virchow - einen Großteil dazu beigetragen haben, die Blutkrankheit zu Erkennen und zu Definieren. Jedoch entdeckten Ärzte wie Alfred Velpeau und Alfred Donné weitaus früher die Krankheit und berichteten über Patienten, die charakteristische Symptome aufwiesen, die in unsere Zeit auf Leukämie hindeuten. Alle Ärzte beschrieben die Veränderung des Blutes als: milchig, mit Eiter gemischt, mit Eiter gefüllt, eitrige Kügelchen, Kügelchen aus eitriger Materie. Sie bezeichneten die veränderte Zusammensetzung des Blutes als charakteristisches Erscheinungsbild von Leukämie.⁵ Heute weiß man, dass Leukämie durch eine gestörte Entwicklung der Stammzellen im Knochenmark verursacht wird. Dabei vermehren sich unkontrolliert funktionsunfähige Leukozyten, sodass die roten Erythrozyten überwuchert und verdrängt werden. Die entarteten Leukozyten können sich auch in Organen wie der Leber, der Milz, den Lymphknoten, der Nieren oder dem Gehirn einlagern.⁶

Wie funktioniert die gesunde Hämatopoese?

Der Prozess der Hämatopoese findet im Knochenmark statt und täglich werden Milliarden Blutzellen neu gebildet. Die neu gereiften Blutzellen ersetzen dabei die gealterten oder zerstörten Erythrozyten und Leukozyten. Hämatopoetischen Stammzellen sind deshalb hauptsächlich im Knochenmark vorzufinden, besonders in den Röhrenknochen (Arm und Bein), sowie im Schädelknochen als auch in Rippen, Becken und Brustbein.

Im Inneren des Knochens ist rotes (in den Hohlräumen der Spongiosa) und gelbes Knochenmark (in der Diaphyse) vorzufinden, nur im roten Knochenmark findet die Blutzellbildung statt. Das rote Knochenmark kommt bei Erwachsenen nur im Inneren der kurzen Knochen vor, während bei Neugeborenen und Kinder im gesamten Knochenmarksraum einschließlich Röhrenknochen rotes Knochenmark vorhanden ist. Mit zunehmendem Alter wird das rote Knochenmark durch das fetthaltige gelbe Knochenmark ersetzt.⁷

Im roten Knochenmark befinden sich Blutsinusoide; diese sind eine direkte Verbindung zu den zahlreichen Blutgefäßen im Körper. Die Wände der Sinusoide besitzen keine Basalmembran, sodass die gebildeten Blutzellen aus dem Knochenmark in die Blutgefäße übertreten können.⁷

Bevor die gebildeten Blutzellen in den Blutkreislauf gelangen, müssen diese Zellen einen fortlaufenden Prozess der Differenzierung und Proliferation durchlaufen. Nachdem das rote Knochenmark die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet hat, entwickeln sich diese zu undifferenzierten Progenitorzellen. Aus diesen Progenitorzellen können sich

nun zwei Linien des hämatopoetischen Blutbildungssystems generieren: die myeloide und die lymphatische Linie.

Aus der myeloiden Linie entstehen die Erythrozyten, Megakaryozyten (bilden die Blutplättchen) und ein Großteil der kernhaltigen Blutzellen, die das angeborene Immunsystem repräsentieren, darunter die eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten, sowie Mastzellen, konventionelle und spezialisierte dendritische Zellen und die Monozyten (Weiterentwicklung zu Makrophagen).

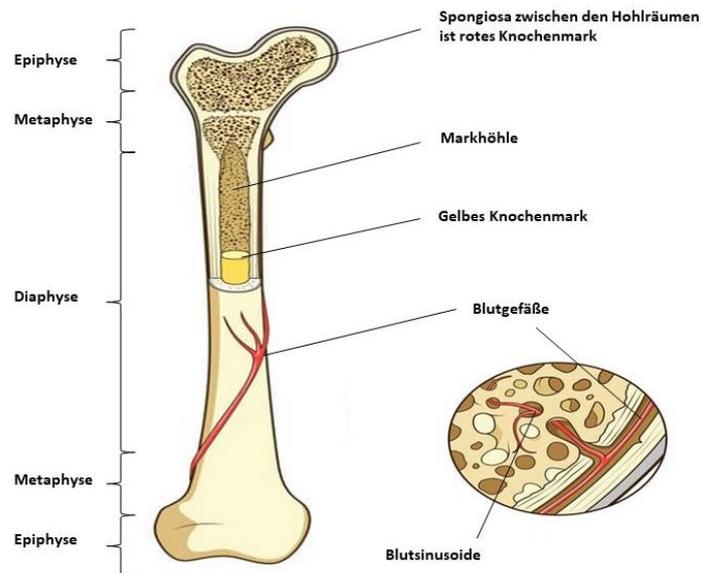


Abbildung 1 Aufbau eines Röhrenknochens. Modifiziert nach ⁸

Aus den lymphoiden Zellen entwickeln sich die natürlichen Killerzellen (NK), sowie die T- und B-Lymphozyten. Bis auf die T-Lymphozyten sind alle Zellen weitestgehend ausgereift, wenn sie in den Blutkreislauf gelangen, dagegen wandern die T-Progenitorzellen in den Thymus und werden dort zu immunkompetenten Zellen ausgebildet.^{7,9}

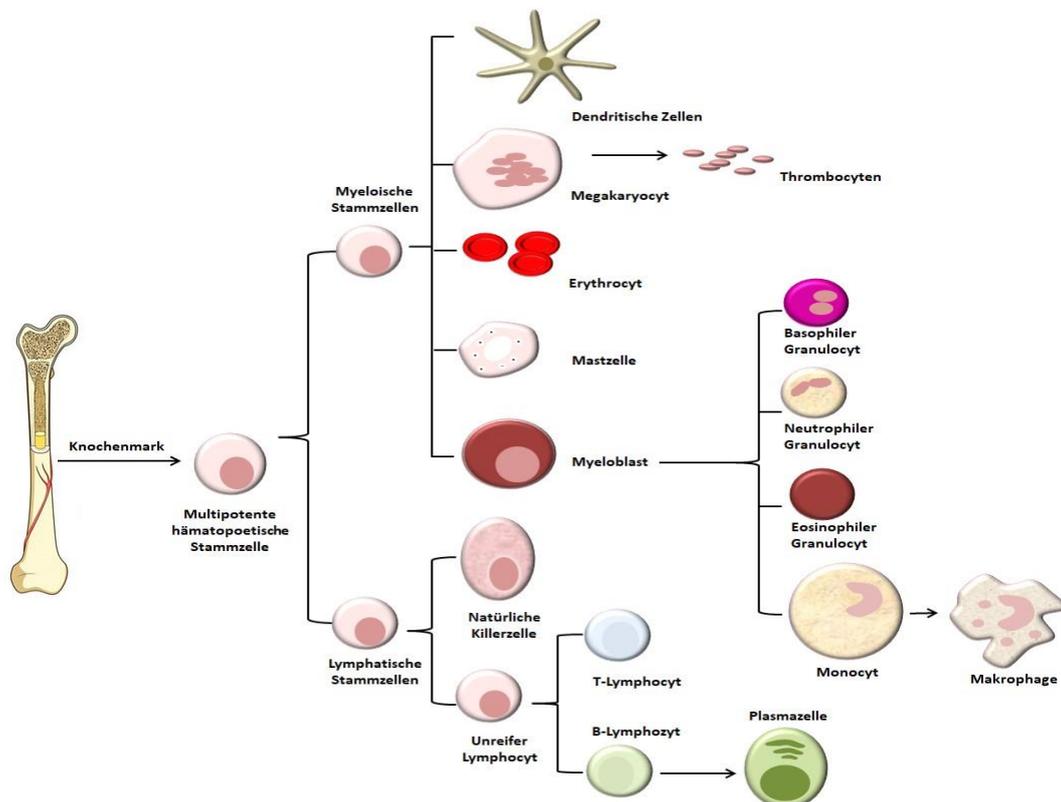


Abbildung 2 Hämatopoetisches System

Aus den Progenitorzellen können sich zwei Zelllinien des hämatopoetischen Blutbildungssystems generieren, die Myeloide und die Lymphatische. Aus der myeloiden Zellreihe entstehen die Erythrozyten, Megakaryocyten und ein Großteil der Blutzellen, die das angeborene Immunsystem zusammensetzen, darunter zählen: eosinophile (2-4% im Blut), basophile (0-1% im Blut) und neutrophile Granulozyten (55-75% im Blut), Mastzellen, konventionell dendritische Zellen und Monozyten (Weiterentwicklung zu Makrophagen). Aus den lymphoiden Zellen entwickeln sich wiederum natürliche Killerzellen, T- und B-Lymphocyten.

Die Hämatopoese ist ein Prozess, der schnell und kontrolliert ablaufen muss, um bei möglichen Infektionen oder Blutverlust entgegenwirken zu können. Damit die Hämatopoese einen geregelten und kontrollierten Verlauf durchlebt, ist ein kompliziertes Netzwerk von Wachstumsfaktoren, Botenstoffen, Chemokinen und vielfach auch ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig.⁷

Genetische Defekte oder Fehlfunktionen (Differenzierungsarrest) können zu schweren Erkrankungen wie Anämie und Leukämie führen.

Leukämien werden in verschiedene Gruppen unterteilt. Während der Hämatopoese entstehen aus Progenitorzellen durch Differenzierung sowohl myeloische als auch lymphatische Zellen. Je nachdem wo die maligne Transformation während der Hämatopoese reifung auftritt, unterscheidet man deshalb akute (frühe Differenzierung) oder chronische (späte Differenzierung) Leukämien, und je nach Linie lymphatische oder myeloische Leukämien. Somit ergeben sich vier Haupttypen der Leukämie: die Akute Lymphatische Leukämie (ALL), die Akute Myeloische Leukämie (AML), die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) und die Chronisch Myeloische Leukämie (CML).

Die akute Leukämie kann entsprechend der morphologischen Merkmale nach einem Konzept der *French-American-British Working Group for Leukemia Classification (FAB)* in weitere Untergruppen gegliedert werden (7 myeloische, 3 lymphatische).¹⁰ Eine Leukämie mit Eigenschaften beider Linien wird auch *mixed lineage leukemia* genannt und war namensgebend für das *MLL*-Gen.¹¹ Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens verursachen hoch-aggressive Leukämien, und können sich - je nach Translokationspartner des *MLL*-Gens - sowohl als lymphoide als myeloide Leukämie ausprägen.

Bei einer akuten Leukämie verdrängen die dysfunktionalen Zellen die gesunden Zellen im Knochenmark und verursachen dadurch das rasche Auftreten von Anämie und Thrombozytopenie. Daraus entstehen dann weitere Symptome wie z.B. Schwäche, Fieber, Blutungen, sowie Hepatosplenomegalie und Lymphadenopathie. Wird die Krankheit nicht umgehend behandelt, kann dies innerhalb weniger Wochen zum Tod führen.

Im Kindes- und Säuglingsalter ist die häufigste Krebsform eine Akute Leukämien (ca. 30%).¹ Die ALL tritt am häufigsten auf (80% der Fälle), während die AML eher bei jungen Menschen diagnostiziert wird.

Bei der chronischen Leukämie hingegen entwickelt sich ihr Krankheitsbild viel langsamer und es kann Jahre dauern, bis Symptome auftreten. Die meisten Patienten werden asymptomatisch diagnostiziert. Chronische Leukämien sowie CLL wird meist bei Menschen im Alter zwischen 60 und 70 Jahren diagnostiziert, während die CML im Alter zwischen 25 und 60 auftritt.¹²⁻¹⁴

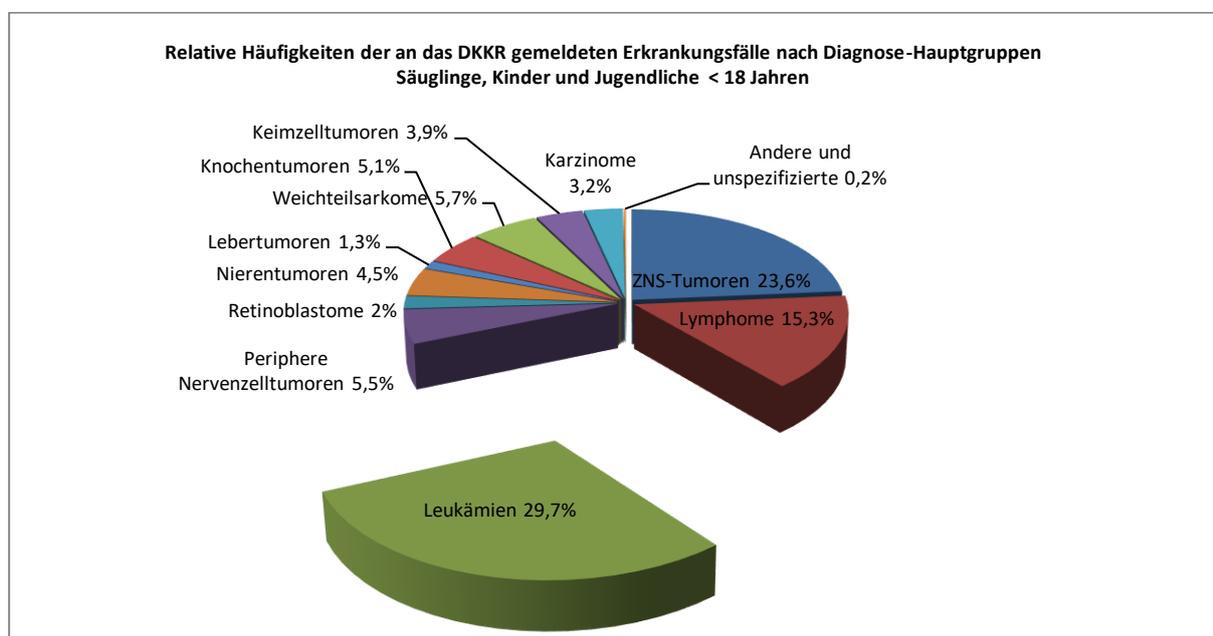


Abbildung 3 Relative Häufigkeiten der an das DKKR gemeldeten Erkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen Säuglinge, Kinder und Jugendliche < 18 Jahren, Daten aus dem Jahresbericht¹

1.2 Das Wildtypprotein MLL (mixed-lineage leukemia)

1.2.1 Chromosomale Translokation

Im Jahr 1959 identifizierten Peter Nowell und David Hungerford zum ersten Mal eine Chromosomenanomalie bei einem Leukämie-Patienten. Im darauffolgenden Jahr berichteten sie, dass in dieser Krankheit zwar die Chromosomenanzahl unverändert war, aber die Größe eines Chromosoms zu klein sei. Vermutet wurde eine Deletion in diesem Chromosomen, die einen DNA-Verlust zur Folge hätte und dadurch Leukämie induzieren werden könnte.^{15,16} Diese postulierte Annahme hielt sich bis 1972 als Janet Rowley und Mitarbeiter entdeckten, dass die Größenveränderung des Chromosoms nicht an einer Deletion lag, sondern durch einen Austausch zwischen dem Ende des Chromosomarms 9 und dem Chromosomarm 22. Sie zeigten, dass ein Teil des Chromosoms 22 an das Chromosom 9 angelagert war.¹⁷ Diese Annahme wurde Jahre später von niederländischen Forschern bestätigt. Sie wiesen durch

Klonierung die chromosomale Translokation von t(9;22) molekular nach und zeigten, dass diese Translokation mit dem Krankheitsbild einer CML assoziiert werden kann.¹⁸

Leukämie wird in fast allen Fällen durch eine reziproke, chromosomale Translokation verursacht. Tritt eine reziproke Translokation auf, wird ein Abschnitt eines Chromosoms auf ein nicht-homologes Chromosom übertragen und verursacht dadurch eine neue Anordnung des Erbguts (balancierten Translokation). Dieser Prozess wird in der Regel durch DNA-Doppelstrangbrüche auf beiden Chromosomen induziert. Beim nachfolgenden Reparaturprozess durch das NHEJ (*non-homologous end joining*) werden die vier offenen Enden der beiden Chromosomen über Kreuz miteinander fusioniert. Bei diesem Prozess werden in der Regel wenige Nukleotide entweder deletiert, invertiert oder dupliziert.^{19,20}

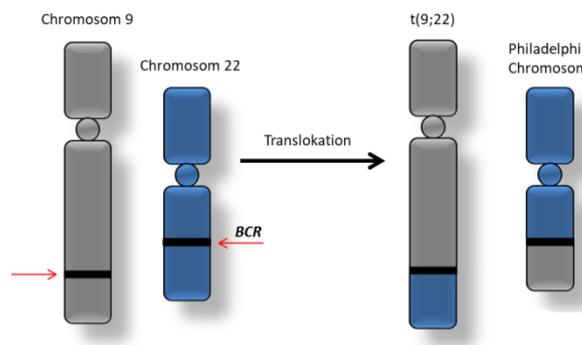


Abbildung 4 Chromosomale Translokation t(9;22) alias Philadelphia Chromosom

Bei der reziproken Translokation wird ein Abschnitt eines Chromosoms auf ein nichthomologes Chromosom übertragen, hier findet ein Austausch zwischen die Fragmente aus dem Chromosom 22 mit dem Fragment aus dem Chromosom 9. Die t(9,11) Translokation ist die erste Translokation, die jemals in der Forschung gefunden und beschrieben wurde, auch bekannt unter dem Namen Philadelphia Chromosom.

Tabelle 1 Auftretende Chromosomenmutationen

Chromosomenmutationen	Erklärung
Deletion	Verlust von Chromosomenbereichen
Translokation	<p>Nichtreziproke: Chromosomsegment wird in neuer Lage in demselben/ anderen Chromosom eingebaut</p> <p>Reziproke: Austausch aus homologen und inhomologen Chromosomen</p>
Duplikation	Zweimaliges Auftreten desselben Chromosomensegments im haploiden Chromosomensatz
Inversion	Drehung eines Chromosomensegments um 180°

Der genaue Auslöser der Erkrankung ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt, jedoch beobachtet man eine erhöhte Inzidenz bei Patienten, wenn diese bestimmten Chemikalien, wie z.B. Benzenverbindungen, oder ionisierende/radioaktive Strahlungen exponiert waren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Patienten mit krankheitsbedingten Vorbelastungen wie Down- oder Klinefelter-Syndrom oder Fanconi-Anämie dazu neigen an akuten Leukämien zu erkranken.²¹ Bei Leukämieerkrankten vermutet man, dass sich im Knochenmark dieser Patienten bereits *in utero* prä-leukämische Zellen entwickeln und dadurch nach der Geburt eine Krebserkrankung rasch ausgelöst werden kann.^{22,23}

1.2.2 T(4,11) Translokation

Die chromosomale Translokation $t(4;11)(q21;q23)$ ist aufgrund ihres häufigen Auftretens im Kleinkindalter und der damit schlechten verbundenen Prognose, eins der bekanntesten strukturellen Chromosomenanomalien bei akuter Leukämie. Diese Translokation wurde das erste Mal 1977 von *Oshimura et al.* beschrieben.² Bei einer $t(4;11)$ -Translokation ist das Chromosom 4 und das Chromosom 11 involviert. Auf Chromosom 4 ist das *AF4*-Gen lokalisiert und auf dem Chromosom 11 liegt das *MLL*-Gen (s. Abb 5).

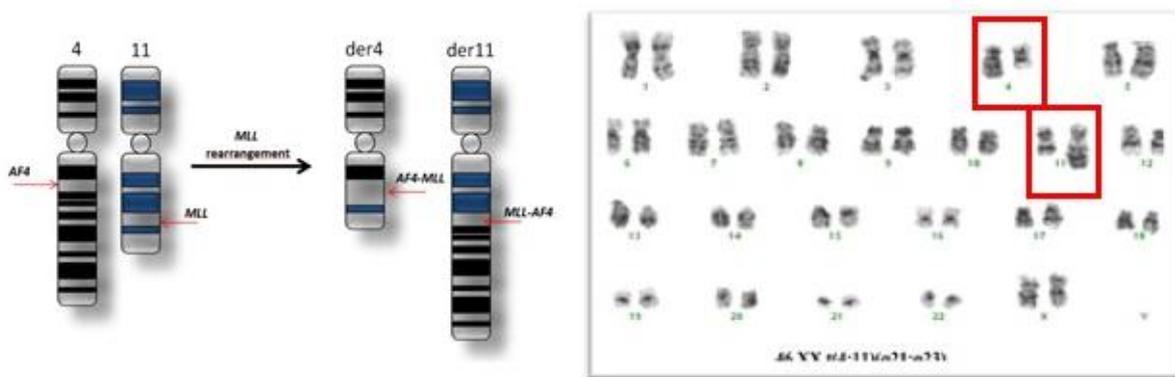


Abbildung 5 Schemata der $t(4;11)$ Translokation mit entsprechendem Karyogramm

Links: Bei einer $t(4;11)$ -Translokation kommt es zum Austausch zweier Chromosomenarme der Chromosomen 4 und Chromosom 11, wodurch diese im späteren Reparaturprozess miteinander fusioniert werden. Rechts: Karyogramm: $t(4;11)(q21;23)$, Hayne et al²⁴

Diese Fusion findet an den Loci 11q23 und 4q21 statt, dabei entstehen die Derivatchromosomen 11 und 4. Bei der Proteinbiosynthese wird das chimäre MLL-AF4 und das reziproke AF4-MLL produziert.

Das Fusionsprotein MLL-AF4 wurde von einigen Wissenschaftlern als Ursache der Initiierung und Aufrechterhaltung der Malignität postuliert. *Montes et al.* zeigte, dass die erzwungene Expression von MLL-AF4 in hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut eine Erhöhung des klonogenen Potenzials von $CD34^+$ -Vorläufern verursachte und die Proliferation förderte, konnte jedoch nicht nachweisen, dass das Fusionsprotein die Leukämie induziert.²⁵

Bursen et al. zeigte hingegen, dass das Einführen des reziproken Fusionsproteins AF4-MLL in murine hämatopoetische Stammzellen allein dazu fähig war eine ALL in Mäusen auszulösen (proB-ALL). In den Mäusen, in denen das MLL-AF4 eingeführt wurden, stellte man fest, dass diese zwar das Fusionsallel MLL-AF4 transkribierten, jedoch keine Leukämie ausgelöst wurde.²⁶ Diese und andere Publikationen lassen darauf schließen, dass das AF4-MLL-Fusionsprotein im frühen Transformationsprozess durchaus als wichtig und essenziell zu sein scheint, während das MLL-AF4 für die Aufrechterhaltung der Leukämie erforderlich ist.^{25,26}

Die *MLL*-Translokationen werden besonders häufig bei Säuglingen und kleinen Kinder diagnostiziert. Aus Studien geht hervor, dass prä-leukämische Zellen bereits *in utero* entstehen.^{23,27} Die $t(4;11)$ -Translokation zeichnet sich durch eine rasche Verbreitung der Hyperleukozytose und ist mit einer schlechten Prognose gekennzeichnet.^{28,29} Bei Erwachsenen tritt diese Form häufig als sekundärtherapeutische Leukämie auf und hat ebenfalls eine schlechte klinische Prognose. Es ist bekannt das Erwachsene, die mit DNA-

Topoisomerase-II-Inhibitoren behandelt wurden, häufig eine aggressive Form der AML entwickeln.^{30–32}

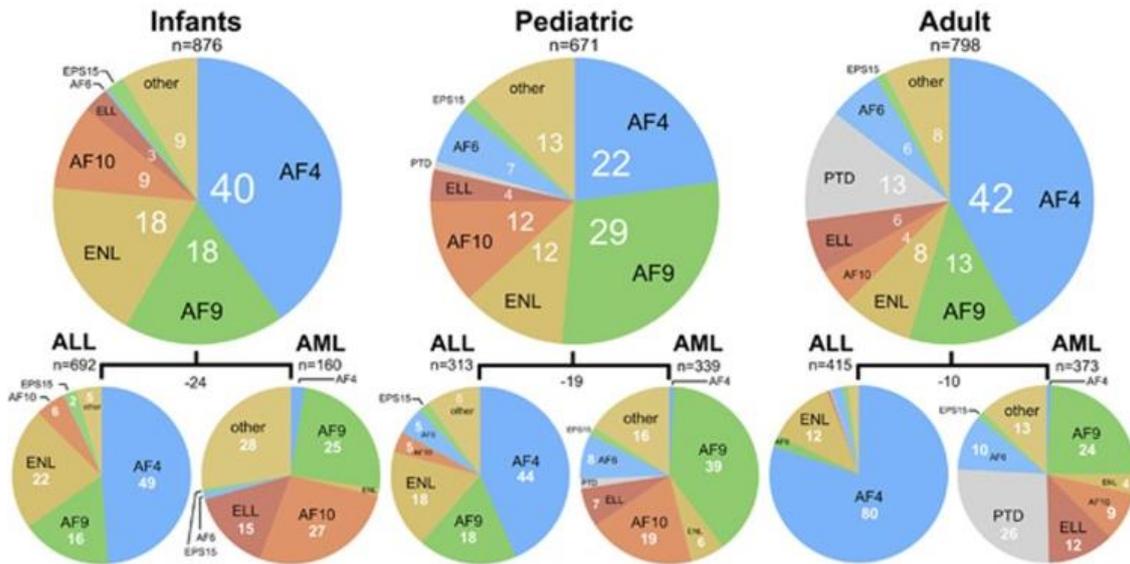


Abbildung 6 Verteilung der MLL-Translokationen in Säuglingen, Kindern und Erwachsenen

Einteilung der Patienten nach Altersklassen und Krankheitstyp: Genamen sind schwarz geschrieben, Prozentsätze sind als weiße Zahlen angegeben. In der oberen Hälfte: Translokationspartnergene-Frequenzen für die Patientengruppe von Säuglingen, Kindern und Erwachsenen. Unteren Hälfte: Unterteilung aller drei Altersgruppen in ALL- und AML-Patienten. Modifiziert nach Meyer et al.³³

Unter allen ALL-Fällen im Kleinkindalter ist die t(4;11)-Translokation mit 40% die häufigste Translokationsart.³⁴ Das *MLL*-Gen transloziert meistens in der *breakpoint cluster region* (BCR), einem 8.3 kb großen Bereich zwischen den Exon 9 und Intron 11, dies tritt bei etwa 93,5% aller Patienten auf.³⁵ Die Bruchpunktsregion des Partnergens *AF4* liegt in einem größeren genomischen Bereich von ca. 44 kb und zeigt Bruchpunkte in den Exons 3 und Exon 6.^{36,37} In 10% aller Fälle ist das *MLL*-Gen an der chromosomalen Translokation beteiligt und rekombiniert dabei mit vielen anderen Genen. Bisher wurden vom *Diagnostic Center of Acute Leukemia* (DCAL) ca. 103 *in-frame* Fusionspartner gefunden (unpublizierte Daten des DCALs). Die häufigsten Fusionspartner sind AF4, AF9, AF6, ENL und AF10.³³

Das Erforschen der jeweiligen Translokationstypen ist äußerst wichtig, da anhand dessen die Krankheitsprognose und die zukünftige Behandlung des Patienten entschieden werden kann.³⁸ Die analytische Auswertung der chromosomalen Translokation im Patienten erfolgt mittels LDI-PCR (*long Distance Inverse PCR*).³⁹ Von klinischer Bedeutung sind besonders die Translokationen t(4;11), t(9;11), t(10;11) und t(11;19), die insgesamt mehr als 80% der *MLL*-translozierten Leukämien ausmachen.³³

1.2.3 Aufbau und Funktionen des MLL-Proteins

Das *MLL*-Gen, *mixed lineage leukemia*-Gen, (auch bekannt unter *ALL-1*, *MLL1* oder *KMT2A*) kodiert eine Histone H3 Lysin-4 spezifische-Methyltransferase und ist damit ein wichtiger Regulator der Gentranskription. Der *MLL* Komplex bindet an tausende Genpromotoren und kann die Expression dieser Gene regulieren. Unter anderem spielt der *MLL* Komplex eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulierung der *HOX*-Gene während der Entwicklung der Säugetiere.^{40–42} Mazo et al. fand im *MLL* Regionen, die Homologien zu dem *Trithorax*-Gen aus

der Drosophila aufwies.⁴³ Das *Trithorax*-Protein ist dafür bekannt die Transkription von *Hox*-Genen aufrechtzuerhalten, dieses wiederum ist an der Körperentwicklung in der Embryogenese beteiligt. Zudem sind die *HOX*-Gene besonders in der normalen hämatopoetischen Entwicklung von großer Bedeutung. AML-Erkrankungen mit *MLL*-Fusionsgenen zeigen fast immer erhöhte Expression bestimmter *HOXA*-Gene.²¹

Das *MLL*-Gen hat eine Länge von 92 kb und wird durch 37 Exons kodiert. Das MLL Protein hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 450 kDa und ein apparentes Molekulargewicht von ca. 500 kDa.^{44,45} In vielen Publikationen - auch in einigen Datenbanken - wird nur von 36 Exons berichtet; das liegt an dem Exon 2, das eine Größe von 99 Nukleotiden aufweist, jedoch in 66% aller Fälle herausgespleißt ist.⁴⁶ Die Breakpoint-Cluster-Region liegt deshalb zwischen den *MLL*-Exons 9 bis 14. Aufgrund des alternativen Spleißens im Exon 2 oder Exon 15 & 16 gibt es acht verschiedene Transkripte mit entweder 3.958, 3.961, 3.969 und 3.972 oder 3.991, 3.994, 4.002 und 4.005 Aminosäuren.⁴⁷ Die entstehenden Spleißvarianten zwischen *MLL*-Exon 15 und 16 führen zu Veränderungen in der PHD3-Domäne mit Konsequenzen für die MLL-Proteinfunktionen.⁴⁸

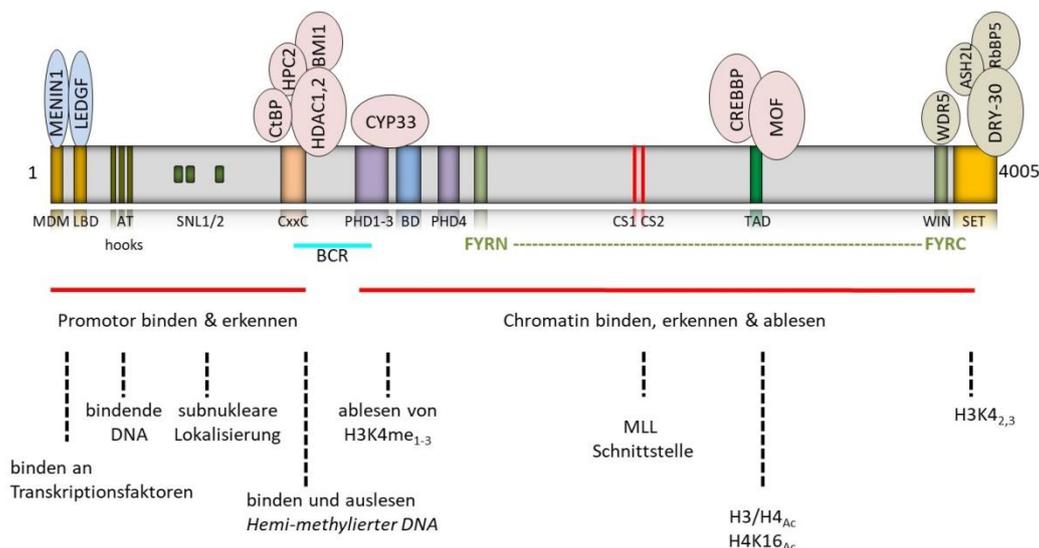


Abbildung 7 Aufbau des MLL-Proteins mit den Schnittstellen CS1 und CS2 und der Breakpoint Cluster Region

Die Abbildung zeigt das MLL-Protein mit seinen charakteristischen funktionellen Domänen: Menin Bindungsmotiv (MDM), LEDGF-Bindungsdomäne (LBD), AT-Haken (AT), speckled nuclear localization side (SNL1/2), Methyl-DNA Bindemotiv (MBM), CxxC Domäne, Bromodomäne (BD), Zinkfinger (PHD1-4), Schnittstellen der Taspase1 (CS1/2), Transaktivierungsdomäne (TAD), WDR5 interaction domain (WIN), Histonmethyltransferase-vermittelnde SET (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*)-Domäne. Die breakpoint-cluster region (BCR) definiert den Bereich mit den häufigsten Doppelstrangbrüchen des *MLL*-Gens.

In Abbildung 7 ist das *MLL*-Gen mit all ihren Domänen schematisch dargestellt. Der MLL N-Terminus enthält die Domänen von MBM (Menin-Bindungsmotiv), LBD (LEDGF-Bindung (*lens epithelium-derived growth factor*) Domäne)⁴⁹, ATH (AT-Hooks)⁴¹, SNL1 und 2 (*speckled nuclear localization 1 und 2*)^{50,51}, CxxC Domäne⁵², PHD1-4 (*plant homology domains 1–4*)⁵³, BD (Bromo-domäne) und FYRN (*phenylalanin(F)-tyrosin(Y)-rich region n-terminal*)⁵⁴, während der C-terminus die Taspase1 Schnittstellen CS1/2 (*cleavage site 1 / 2*) trägt, die TAD (Transaktivierungsdomäne), FYRC Domäne (FYR C-terminal), WIN (WDR5 interaction domain) und zum Schluss die SET-Domäne (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax*).⁵⁵

Die Domänen MBM und LBD können Menin und LEDGF rekrutieren und bilden ein MLL1-Menin-LEDGF-Komplex, der wiederum mit DNA/Chromatin mittels LEDGF interagiert.⁵⁶ Die AT Haken binden an die kleine Furche von AT-reichen DNA-Regionen, während CxxC reich an Cysteinen ist und mit hemi-methylierter CpG-DNA wechselwirkt.⁵⁷ Die CxxC Domäne

interagiert zudem mit der PAFc (*polymerase-associated factor complex*). PAFc wiederum sorgt dafür, dass das MLL sowie auch MLL-Fusionsprotein die Zielgene erkennt und die Transkription aktiviert, zum Beispiel bei *HOXA9*.⁵²

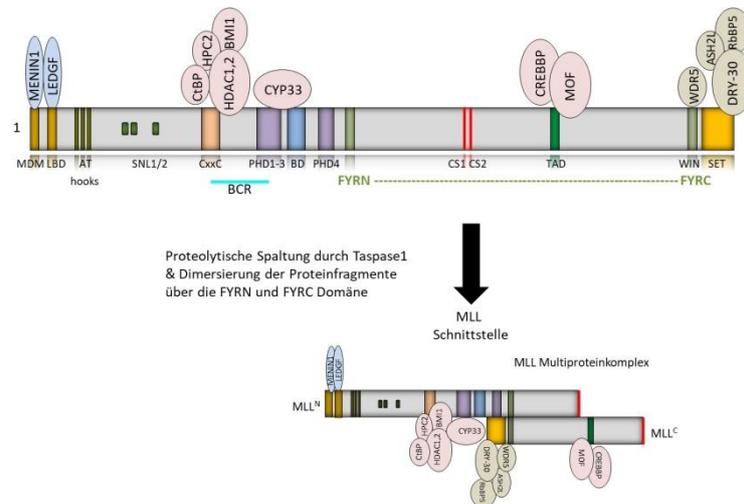


Abbildung 8 Proteolytische Spaltung des MLL-Proteins

Abgebildet ist die proteolytische Spaltung des MLL-Proteins durch die Taspase1. Über die FYRN und FYRC Domänen dimerisieren die Proteinfragmente MLLN(p300) und MLLC (p180) miteinander, dadurch kann das MLL für die weitere Komplexbildung mit seinen Bindungspartnern bereit sein. Der MLL-Komplex hat epigenetische Lese- und Schreibfunktionen und bindet vorwiegend in den Promotorregionen aktiv transkribierender Gene.

Die BD ist dysfunktional und erkennt keine acetylierten Lysinreste, während die vierte PHD-Domäne für die Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Die dritte PHD-Domäne interagiert spezifisch mit H3K4me2/3 und ist für die MLL-abhängige Gentranskription erforderlich.⁵⁸ MLL wird von der Protease Taspase1 an der Erkennungs- und Schnittstelle CS1 und CS2 prozessiert⁵⁹ in ein N-terminales Fragment p320 (MLL^N/N320) und C-terminales Fragment p180 (MLL^C/C180). Diese beiden Fragmente wechselwirken über die Domänen FYRN (Phe/ Tyr-reicher N-Terminus) und FYRC (Phe/Tyr-reicher C-Terminus) und bilden einen stabilen Proteinkomplex, dieser wiederum interagiert mit vielen weiteren Proteinen.⁵⁴ Wird das MLL nicht von der Taspase1 prozessiert, führt dies jedoch nicht zu einem Funktionsverlusts des Proteins.⁵⁹

Am C-terminalen Ende befindet sich neben der Transaktivierungsdomäne (TAD), die die transkriptionellen Coregulatoren CBP (*CREB-binding protein*) und MOF (*Males Absent of the First*) rekrutiert, um Histonlysine (z.B. H3K27 oder H3K9) zu acetylieren.⁶⁰ Die SET-Domäne, welche eine H3K4-Methyltransferase-Aktivität aufweist, zeigt jedoch katalytisch keine Aktivität.⁶¹⁻⁶³ Die Komplexierung mit drei anderen Proteinen, WDR5, RbBP5 (*retinoblastoma binding protein 5*) und ASH2L (*Set1/Ash2-HMT-complex subunit ASH2-like*), ist erforderlich um H3K4 effizient zu methylieren.⁶⁴

Das *MLL*-Gen ist statistisch gesehen eines der häufigsten Gene, die als Fusionspartner bei AML identifiziert worden sind. Mit circa 6% tritt bei den Erwachsenen eine *11q23*-Aberrationen auf, während es die Kinder zu 50% betrifft.⁶⁵ Als eine potenzielle pathogenetische Ursache werden bei Neugeborenen *in utero* übertragene Bioflavonoide diskutiert⁶⁶.

In einer Studie von *Yu et al.* beobachtete man, dass eine partielle Deletion des *Mll*-Gens bei Mäusen zu embryonaler Letalität führt⁶⁷, wohingegen Mäuse mit einer homozygoten Deletion der SET-Domäne (*Mll1SET*) überlebten und bis ins Erwachsenenalter eine relativ normale Hämatopoese aufwiesen.⁶⁸ Zudem vermutet *Mishra et al.*, dass das MLL nicht die dominante H3K4-Methyltransferase ist, die die *HOXA*-Genexpression kontrolliert.⁶⁸ In Säugetieren wurden fünf weitere Mitglieder der MLL-Familie von H3K4-Methyltransferasen (MLL2, MLL3,

MLL4, SETD1A und SETD1B) gefunden. Sie alle bilden mit anderen Proteinen größere makromolekulare Komplexe, z.B. COMPASS.^{60,69,70} *Chen et al.* führte eine Untersuchung durch, bei der das MLL2, ein Homolog von MLL1 ist und anscheinend eine wichtigere Rolle bei der Aufrechterhaltung der *MLL-r*-Leukämie spielt als das *MLL* Gen.⁷¹

Das MLL-Protein ist nicht nur in der Embryonalentwicklung oder anderer Differenzierungsprozesse (Organogenese) relevant, sondern auch für die Hämatopoese. Eine Studie analysierte die Verteilung und Lokalisierung von MLL-Proteinen in Zelllinien und menschlichen Geweben und konnte nachweisen, dass das MLL in vielen Organen vorhanden ist, einschließlich in hämatopoetischen Zellen.⁷² Weitere Untersuchungen in *Mill*-defizienten und haplo-insuffizienten Mäuseembryonen zeigten, dass Föten eine fehlerhafte Hämatopoese aufwiesen.⁷³ *Ernst et al.* konnte zeigen, dass bei der hämatopoetischen Differenzierung, das MLL Protein für die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen und Vorläuferzellen notwendig ist.⁷⁴ *McMahon et al.* hingegen demonstrierte in *Mill*-Knockout Mäuse, dass die Abwesenheit von Mll Protein in den Föten schon in einem frühen Entwicklungsstadium zu einer gestörten Leberhämatopoese führt. Zudem fanden sie in Erwachsenen Mäusen, dass das Fehlen von Mll die homöotische Hämatopoese unberührt lässt, jedoch fand man in den Knochenmarkzellen tiefgreifende Rekonstitutionsdefekte.⁷⁵ *Yagi et al.* erzeugten ein Mausmodell mit einem mutierten *Mill*-Locus, um die Funktion des Mll Proteins aufzuklären. Aus diesen Daten geht hervor, dass in den mutierten Mäusen die hämatopoetischen Vorläuferzellen reduziert waren und somit die Vermutung aufkam, dass Mll als Regulator für das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen fungiert.⁷⁶ Darüber hinaus spielt das MLL Protein eine generelle Rolle bei der Regulierung der Transkriptionsinitiierung durch RNA-Polymerase II (Pol II). Dabei fanden Forscher heraus, dass die MLL-Chimäre mit bestimmten Proteinpartnern zu einem Proteinkomplex interagieren, darunter sind AF4, AF9, ENL und DOT1L, ein Enzym, das die Histon-H3-Lysin79-Methylierung katalysiert.⁷⁷⁻⁷⁹ In weiteren Untersuchungen stellte man fest, dass viele MLL Fusionspartner ein Teil dieses Proteinkomplexes sind. Ganz besonders hervorzuheben ist das AF4 Protein, das zusammen mit AF9/ENL, AF10, den Elongationsfaktoren ELL1-3, EAF1 und P-TEFb den sog. Super-Elongationskomplexes (SEC) bildet.⁸⁰ *Shilatifard et al.* konnte nachweisen, dass humanes ELL ein Pol II-Elongationsfaktor ist und dieser die katalytische Geschwindigkeit der RNA-Polymerase II Transkription erhöhen kann, indem vorübergehenden Pause der Polymerase unterdrückt wird.⁸¹ Durch das Unterdrücken der Pause kann eine stetige Transkription der Zielgene gesichert werden.^{81,82}

P-TEFb besteht aus zwei Untereinheiten, zum einen aus der Kinase Cdk9 und zum anderen aus ihrer regulatorischen Untereinheit, Cyclin T1 oder Cyclin T2. P-TEFb stimuliert die Transkriptionselongation durch Phosphorylierung der RNA Pol II CTD sowie durch Phosphorylierung von NELF und DSIF, die sich dadurch von der RNA Pol-II ablösen und dadurch die Elongation einleiten. DSIF/NELF spielen eine essenzielle Rolle bei der Pausierung von Pol II an Genen. Außerdem wird angenommen, dass die Phosphorylierung von DSIF/NELF durch P-TEFb als regulatorischer Schritt zur Initiierung der Pol II angesehen wird.^{83,84} AF4 ist ein zentraler Faktor, der zur SEC-Integrität beisteuert, zudem hat man durch einen knockdown in MLL-Translokation tragenden Leukämiezellen zeigen können, dass es zum Verlust der *HOXA9*-Genexpression führt.⁸⁰ Die Tatsache, dass so viele MLL-Fusionsproteine mit dem *Super-Elongation-Complex* assoziieren, lässt zur Vermutung, dass die Regulation der Transkriptionselongation in *MLL*-rearrangierten Leukämien gestört sein muss.⁸⁵

1.2.4 Behandlungsstrategien bei t(4,11) Translokation

Die Diagnostik bei MLL chromosomaler Translokation wird im Blut des Leukämie-Patienten über verschiedene Standardtechniken analysiert. Untersucht wird dabei der komplette Chromosomensatz des Patienten als auch die DNA und RNA. Das *Diagnostic Center of Acute Leukemia (DCAL) in Frankfurt am Main* untersucht pädiatrische und erwachsene Patientenfälle mit akuter Leukämie (AML und ALL), die mit einer chromosomalen Aberration im menschlichen MLL-Gen assoziiert ist.⁸⁶ Die analytische Auswertung der chromosomalen Translokation im Patienten erfolgt mittels LDI-PCR (*long Distance Inverse PCR*), *multiplex PCR* und *Next-Generation Sequencing (NGS)*.^{39,86} Bei diesen Analysen werden patienten-spezifische Biomarkersequenzen erhalten, die eine präzise Behandlungsstrategie für jeden einzelnen Leukämiepatienten ermöglichen. Diese molekularen Biomarker helfen dabei, die Behandlung und das *Outcome* von Patienten mit akuter Leukämie zu optimieren.^{87–89}

Patienten mit *MLL*-rearrangierter ALL (*MLL*-r-ALL) sind mit einer schlechten Prognose gekennzeichnet, liegt zum Teil an der Therapieresistenz der leukämischen Zellen. *MLL*-r-ALL sind relativ resistent gegen Kortikosteroide und L-Asparaginase-Chemotherapien, jedoch empfindlich gegenüber Cytosin-Arabinosid (Ara-C) und anderen Nukleosidanaloga.^{90–92} Die Wirksamkeit von Ara-C wird durch die erhöhte Expression des *human equilibrative nucleoside transporter 1* (hENT1) in *MLL*-r-ALL angenommen, da das Ara-C das hENT1 benötigt, um die Zellmembran zu durchdringen.^{91,93,94} Obwohl Ara-C in den meisten ALL-basierten Chemotherapien enthalten sind, haben die Patienten trotzdem eine schlechte Prognose. Forscher vermuten, dass die SRC-Kinase-induzierte Phosphorylierung von Annexin A2 zu einer Glukokortikoidresistenz führt.⁹⁵ Leider sind für die betroffenen Personen meistens die Chemo- und Strahlentherapie sowie die Stammzelltransplantation die einzige Behandlungstherapie, vorausgesetzt ein passender Spender wurde gefunden.⁹⁶

Weitere potenzielle Therapiestrategien sind zum einen die **Hemmung von FLT3**. Die FMS-ähnliche Tyrosinkinase 3 (FLT3) ist ein Protoonkogen, dass auf der Oberfläche vieler hämatopoetischer Vorläuferzellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen, dem Überleben, der Proliferation und der Differenzierung von Zellen spielt.⁹⁷ Treten Mutationen in dem FLT3-Rezeptor auf, kann dies zu einer Leukämie führen.⁹⁸ FLT3 ist besonders bei Säuglingen und Kindern mit *MLL*-r-ALL überexprimiert.⁹⁹ Studien zeigten, dass die Zugabe von FLT3-Inhibitoren der ersten Generation keinen großen Effekt zeigen würde.^{100,101} Jedoch ist anscheinend der Zeitpunkt der Verabreichung der FLT3-Inhibitoren von großer therapeutischer Bedeutung. CEP-701/Lestaurtinib zeigte nur dann eine synergistische Aktivität, wenn es nach einer zytotoxischen Chemotherapie verabreicht wurde, wohingegen die Zugabe vor der Chemotherapie eine antagonistische Wirkung aufwies.¹⁰²

RAS-Mutationen (*NRAS* und *KRAS*) wurden häufig in *MLL*-r-ALL beschrieben und leider haben auch hier die Patienten ein schlechtes *Outcome*.^{103,104} In einer Kohorte von 144 pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit *MLL*-r-Leukämien wurden bei 16 Patienten (11%) *NRAS*- oder *KRAS*-Mutationen gefunden.¹⁰³ Gegen diese RAS-Mutationen erweisen sich MEK-Inhibitoren, die eine selektive Aktivität gegen *MLL*-r-ALL zeigten, als eine vielversprechende therapeutische Strategie für *MLL*-r-ALL.¹⁰⁵

Eine weitere therapeutische Strategie, die untersucht wird, sind **Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi)**. HDACi zeigen *in vitro* eine anti-leukämische Wirkung gegen *MLL*-r-ALL. Bei Zugabe von Valproinsäure wird *p21* hochreguliert, während bei Panobinostat der RNF20

/RNF40/WAC E3-Ligasekomplexes unterdrückt wird und eine Depletion der H2B-Ubiquitinierung auftritt; ein zentraler Weg für die Aufrechterhaltung der *MLL*-r-Leukämie.^{106,107} Andere HDACi zeigten ebenfalls eine inhibitorische Aktivität in t(4;11) ALL-Zelllinien.¹⁰⁸ Darüber hinaus zeigte Vorinostat eine synergistische Aktivität zusammen mit Prednisolon- und Cytarabin-Chemotherapie.¹⁰⁹

Das *MLL*-r-ALL ist durch eine umfassende Promotorhypermethylierung und Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen gekennzeichnet, was zu einem höheren Rückfallrisiko führt.^{110,111} **Hypomethylierungsmittel** haben die Fähigkeit, eine aberrante DNA-Methylierung umzukehren und Apoptose in Leukämiezellen zu induzieren. Da Decitabin und 5-Azacytidin zur Behandlung von AML verwendet werden, werden diese Arzneimittel für die Behandlung von *MLL*-r-ALL in Betracht gezogen. Diese Strategie wird derzeit in Kombination mit einer Chemotherapie zur Behandlung von Säuglingen mit *MLL*-rearrangierter ALL getestet (ClinicalTrials.gov NCT02828358).¹¹²

DOT1L ist eine Protein-Methyltransferase, die für die Methylierung von Lysin auf Histon H3 (H3K79) verantwortlich ist, zudem induziert DOT1L die Überexpression von *MLL*-r-Zielgenen, einschließlich *HOXA9* und *MEIS1*.¹¹³ Pinometosta, ein Dot1L-Inhibitor, inhibierte die H3K79-Methylierung und die Expression des *MLL*-Fusionszielgens und zeigte eine starke selektive Abtötung akuter Leukämiezellen, besonders mit *MLL*-Translokationen.¹¹⁴ Es wurde jedoch bereits ein Resistenzmechanismus gegen Pinometostat beschrieben, der seine klinische Nützlichkeit infrage stellt.¹¹⁵

Cyclin-dependent-kinase (CDK) wird als therapeutische Behandlungsstrategie ebenfalls in Betracht gezogen. CDK beeinflusst den Zellzyklus und induziert zelluläre klonale Proliferation und Chromosomeninstabilität.¹¹⁶ In Untersuchungen wurde gezeigt, dass Cdk6-Locus an *MLL*-Fusionsproteinen gebunden ist und zur *MLL*-vermittelten Leukämogenese beiträgt.¹¹⁷ Die Hemmung von CDK6 könnte eine mögliche therapeutische Wirksamkeit eröffnen. Palbociclib, ein CDK4/CDK6-Inhibitor, wird in einer offenen Phase-Ib/IIa-Studie an Patienten mit neu diagnostiziertem *MLL*-r-ALL getestet, die nicht für eine intensive Erstlinientherapie oder in rezidivierten und refraktären Situationen infrage kommen (ClinicalTrials.gov NCT02310243).¹¹² Andere CDK-Inhibitoren haben ebenfalls Wirksamkeit in präklinischen Modellen von *MLL*-r-ALL gezeigt.¹¹⁸

1.3 Die Threonin-Aspartase 1 (Taspase1)

1.3.1 Die Signifikanz von Taspase1 in Krebsforschung

Krebs ist eine genetisch bedingte Krankheit, die sich über Jahre hinweg mit akkumulierenden genetischen und epigenetischen Anomalien entwickelt. Diese Anomalien verursachen eine erhöhte Fähigkeit zur Proliferation und Deregulierung der Apoptose, was dazu führt, dass in Menschen Tumore wachsen.¹¹⁹ Tumore werden erst dann für den Menschen gefährlich, wenn diese Geschwüre anfangen invasiv zu werden oder zu metastasieren (maligne Tumore).¹²⁰ Die unkontrollierte Vermehrung von malignen Zellen wird oft von Proteasen unterstützt. Proteasen sind praktisch unentbehrlich für alle biologischen Prozesse, einschließlich Proliferation, Zelltod, Migration und vieles mehr. Wenn diese Enzyme jedoch dysreguliert sind, tragen sie zum Fortschreiten mehrerer Krankheiten bei, wie beispielsweise Krebs oder neurodegenerative Störungen.¹²¹ Threonin-Aspartase 1 (Taspase1) wurde als sequenzspezifische Protease identifiziert, die ausschließlich für die Spaltung und Aktivierung des *MLL*-Proteins zuständig ist. Taspase1 lokalisiert und funktioniert sowohl im Zellkern als auch im

Zytoplasma.^{122,123} Durch die Spaltung werden die Histonmethyltransferasen MLL1 (KMT2A) und MLL2 (KMT2B) aktiviert, diese induzieren wiederum die *HOX*- und *Cyclin*-Genexpression.¹²⁴ Die proteolytische Spaltung von MLL ist ein essenzieller Schritt für die Funktionalität des MLLs, dadurch wird die Bildung des Multiproteinkomplexes initiiert und die Regulation von vielen Genen.^{124–126} Taspase1 prozessiert nicht nur das MLL1 und MLL2, sondern auch das onkogene Fusionsprotein AF4-MLL und den Transkriptionsfaktor IIA (TFIIA) (*in vitro* und *in vivo*).³ Die proteolytische Spaltungsaktivierung von TFIIA ist für die männliche Spermatogenese¹²⁷, die kraniofaziale Entwicklung¹²⁸ und die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen der fetalen Leber wesentlich.^{3,129} *Takeda et al.* untersuchte in Wildtyp-Mäusen und Taspase1^{-/-}-Mäuse die Morphogenese des Schädels, dabei beobachteten sie, dass während der Mauskopfbildung in Wildtyp-Mäusen der Taspase1-vermittelte Verdau an TFIIA die Zellproliferation und Morphogenese reguliert und dadurch die Transkription der negativen Zellzyklusregulatoren wie CDKN1A und CDKN2A begrenzt bleibt. Wohingegen bei TASP1-Mangel es bei den Mäusen zu mehreren kraniofazialen Missbildungen führte, die mit einer unzureichenden Zellproliferation verbunden war. Zudem wurde eine Hochregulation von *p16Ink4a* (CDKI) und *p19Arf* (*Alternative Reading Frame*), welches p53-abhängige Apoptose und Zellzyklusstillstand induziert, gefunden. Interessanterweise wurde bei einem Mangel an CDKN2A in mutierten Mäusen mit TASP1-Deletion keine kraniofazialen Missbildung nachgewiesen.¹²⁸ Sequenzierungen von TFIIA zeigen, dass die prozessierte Schnittstelle in TFIIA, ein ähnliches Schnittmotiv trägt wie das im MLL-Protein.³ In einer *in silico* Studie wurden zu dem noch 27 weitere, potenzielle Zielproteine von Taspase1 gefunden, einige dieser potenziellen Zielproteine sind in der Regulierung des Zellzykluses, in Transkription oder in Entwicklungsprozessen involviert.¹³⁰

Takeda et al. untersuchte die Rolle von Taspase1 in Mäusen, dabei generierten sie ein Taspase1^{-/-} Mausmodell. Eine Taspase1-Deletion führte zu einem unprozessierten MLL und MLL2-Protein und zu homöotischen Transformationen. In Abwesenheit von Taspase1 wurde ein embryonaler Entwicklungsnachteil in Mäusen festgestellt. Der Mangel an Taspase1 sorgte für schwere skelettale Fehlbildungen, hämatopoetische Transformation und bei der Geburt der Mäuse waren diese weitaus kleiner als der Durchschnitt. Zudem wiesen die Mäuse eine beeinträchtigte Proliferation von embryonaler Maus Fibroblasten (MEF) auf und zu einer deutlichen Reduktion von Thymozyten. Weiterhin führte die Deletion zu einer Herunterregulierung von Cyclinen, darunter Cyclin E, A und B und zu einer Hochregulierung von p16^{Ink4a} (CDKI, Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor). Weiterhin wurde gezeigt, dass das MLL und das MLL2 direkt mit E2Fs interagieren und somit die Cyclinexpression beeinflussen. Das unprozessierte MLL zeigte *in vitro* eine verringerte Histon-H3-Methyltransferase-Aktivität, demzufolge zeigten Chromatin-Immünpräzipitationstests eine deutlich verringerte Histon-H3-K4-Trimethylierung an Cyclin E1- und E2-Genen in Taspase1^{-/-}-Zellen. Wichtig hierbei ist, dass eine akute Deletion von Taspase1 bei Mäusen keine letalen Folgen hatte.¹²⁵ Zudem konnten Forscher herausfinden, dass Taspase1 in vielen soliden Tumoren überexprimiert ist.^{125,131}

Um die Rolle von Taspase1 bei der Tumorentstehung weiter zu definieren, wurde untersucht, ob Taspase1 als konditionales Protoonkogen fungiert. Dabei fanden *Chen et al.* heraus, dass Taspase1 allein oder in Verbindung mit MYC, RAS oder E1A keine primäre MEFs transformieren konnten, jedoch spielt Taspase1 eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung und -erhaltung. Da Taspase1 alleine keine Zellen transformieren kann, wird sie daher als „*non-oncogene addiction protease*“ klassifiziert.¹³²

Threonin-Aspartase 1 wurde das erste Mal im Zusammenhang mit Leukämie-Entstehung beschrieben, bei der die Taspase1 eine proteolytische Spaltung an dem reziproken onkogenen

MLL-Fusionsprotein durchführt.¹³³ Das *MLL*-Gen ist statistisch gesehen eines der häufigsten Gene, die als Fusionspartner bei AML identifiziert worden sind. Mit circa 6% tritt bei den Erwachsenen eine *11q23*-Aberration auf, während es Säuglinge und Kinder zu 50% betrifft und hier meistens mit einer schlechten Prognose gekennzeichnet ist.⁶⁵ Die onkologische Relevanz der Taspase1 konnte auch für verschiedene solide Tumorentitäten nachgewiesen werden, insbesondere für Brust- und Hirntumoren.^{123,132,134,135} Die neuesten Forschungsergebnisse demonstrieren eine wichtige Rolle von Taspase1 bei der HER2/neu-Brusttumorentstehung. Zu diesem Zweck wurden transgene MMTV-neu; *MLL*^{nc/nc}-Mäuse erzeugt, die homozygote nicht spaltbare *MLL*-Allele tragen. Erstaunlicherweise sind diese Mäuse vor HER2/neu-induzierter Brusttumorentstehung geschützt. Die Spaltung von *MLL* durch die Taspase1 fördert die Cyclin E Expression und impliziert, dass diese Taspase1-*MLL*-Cyclin-E-Achse für die HER2/neu-induzierte Brusttumorentstehung erforderlich ist.^{125,134}

2018 berichtete *Suleiman et al.* das erste Mal, in den gesamten Jahrzehnten, in denen Forschung dokumentiert wird, von vier nicht verwandten Kindern mit homozygoten Funktionsverlustvarianten in *TASP1*. Die Kinder wiesen überlappende Symptome auf darunter Entwicklungsverzögerung mit Hypotonie und Mikrozephalie, Ernährungsschwierigkeiten mit Gedeihstörungen, wiederkehrenden Infektionen der Atemwege, kardiovaskulären Missbildungen, Kryptorchismus, fröhlichem Verhalten (*Happy demeanor*) und charakteristischen Gesichtszügen. Bei zwei Kindern umfasste die Deletion die Exons 5–11 von *TASP1*, das dritte Kind hatte eine homozygote Missense-Variante, c.701 C> T (p.Thr234Met), die das aktive Zentrum des codierten Enzyms beeinflusste und das vierte Kind hatte eine homozygote Nonsense-Variante, c.199 C> T (S.Arg67 *).^{136,137} *Balkin et al.* beobachtete ein Jahr später Anomalien an einem weiblichen Säugling, bei dem schwere kraniofaziale Anomalien, Dysgenese des vorderen und hinteren Segments, Immunschwäche und makrozytischer Anämie diagnostiziert wurde. Exome Sequenzierungen zeigten, dass das Säugling eine heterozygote *de-novo*-Missense-Variante, c.1027G> A, die p. (Val343Met) im *TASP1*-Gen aufzeigte.¹³⁸

All diese Forschungsergebnisse untermauern nicht nur die Relevanz der proteolytischen Funktion von Taspase1 während der Embryonalentwicklung und -differenzierung, sondern dass die Inhibierung von Taspase1 eine potentielle Antikrebsstrategie ohne schwerwiegende Nebenwirkungen bieten könnte.^{125,128} Da Taspase1 eine Protease ist, wurden folgerichtig als erstes Proteaseinhibitoren getestet, jedoch wurde die Aktivität der Taspase1 nicht beeinflusst.⁵⁹ Verschiedene Inhibitionsstrategien wurden verfolgt, um in das onkogene Potenzial von Taspase1 einzugreifen.

Lee et al. untersuchte 2009 als einer der ersten Forschungsgruppen mögliche Inhibitoren für die Taspase1, getestet wurden Vinylsulfon- und Vinylketon-Verbindungen. Diese Studie demonstrierte, dass Taspase1 in der Lage ist Inhibitoren zu binden, die eine reaktive funktionelle Gruppe entweder am Hauptpeptidrückgrat oder an der P1-Seitenkette besitzen.

Die Verbindungen entpuppten sich als nicht hochwirksam, dienen jedoch als Ausgangspunkt für das Design von weiteren Inhibitoren.¹³⁹

Chen et al. publizierte 2012 einen potenziellen Inhibitor für Taspase1, dabei handelt es sich um (4-[(4-arsenophenyl)methyl]phenyl) Arsensäure (NSC48300). Kinetische Untersuchungen charakterisierten NSC48300 als einen reversiblen, nicht kompetitiven Inhibitor, mit einem K_i -Wert von 4,22 μ M. In einem MMTV-neu-Mausmodell für Brustkrebs und im U251-Xenotransplantationsmodell für Hirntumor erzeugte NSC48300 eine wirksame Hemmung des Tumorstwachstums.¹³⁵ Getestet wurde ebenfalls eine erzwungene Expression inaktiver Taspase1-Mutanten, dessen Ziel es ist, die Bildung aktiver Taspase1-Dimere zu hemmen, jedoch erwies sich diese Strategie nicht als Inhibitionsmöglichkeit.¹⁴⁰ *Van den Boom et al.*

Veröffentlichte Taspase1-Inhibitoren, die auf einem Peptidylsuccinimidylpeptidmotiv basieren. Diese Inhibitoren wurden an die Substratspaltungssequenz des MLLs angepasst, bei der die aktivste Verbindung Taspase1 im submikromolaren Bereich hemmte.¹⁴¹ *Van den Boom et al.* zeigten kürzlich, dass amorphe Silica-Nanopartikel die Taspase1 nicht nur binden, sondern auch die proteolytische Aktivität inhibieren. Bemerkenswert ist die Bindung und Hemmung von Taspase1 im nanomolaren Konzentrationsbereich, was darauf deutet, dass jedes Taspase1-Molekül an ein Nanopartikel gebunden ist und in seiner biologischen Aktivität stark beeinträchtigt ist.¹⁴²

Aufgrund ihrer Rolle bei der Prozessierung der onkogenen *MLL*-Fusionsproteine, ist die Taspase1 von hoher medizinischer Bedeutung und ein potenzielles Ziel bei der Behandlung der *MLL*-induzierten Leukämie als auch in vielen soliden Tumoren.

1.3.2 Struktur und Funktion von Taspase1

Hsieh et al. beschrieben erstmals 2003 die Prozessierung des *MLL*-Proteins an den hochkonservierten Erkennungssequenzen CS1 (D/GADD) und CS2 (D/GVDD), welche Protease für diese Spaltung verantwortlich gewesen ist, war zu dem Zeitpunkt noch ungeklärt. Die Schnittstellen befinden sich innerhalb des C-terminalen Fragments des *MLL*-Proteins. Die CS1 und CS2 Schnittstellen sind in den *MLL*-Homologen von Fliegen bis Säugetiere eine hochkonservierte Sequenz. *MLL* wird an der Erkennungs- und Schnittstelle CS1 und CS2 prozessiert und in ein N-terminales Fragment p320 ($MLL^N/N320$) und C-terminales Fragment p180 ($MLL^C/C180$) aufgeteilt.¹⁴³ Diese beiden Fragmente wechselwirken über die Domänen FYRN (N-Terminus) und FYRC (C-Terminus) und bilden einen stabilen Proteinkomplex, dieser wiederum interagiert mit vielen weiteren Proteinen und formen einen Multiproteinkomplex.⁵⁴

Hsieh et al. selbst, fand im selben Jahr nach der ersten Veröffentlichung 2003, dass das *MLL* von einer Protease namens Taspase1 an den Schnittstellen CS1 und CS2 prozessiert wird. Die Taspase1 zeigt dabei gegenüber der Schnittstelle CS2 eine höhere Affinität als im Vergleich zu CS1, die deutlich langsamer verdaut wird.^{59,143} Das *Taspase1* Gen ist auf Chromosom 20p12.1 lokalisiert. Es umfasst 550 kb, kodiert 420 Aminosäuren mit einem MW von 50 kDa. Bei der Aufreinigung von rekombinanter Taspase1 wurde neben der zu erwarteten 50 kDa Bande, zusätzlich noch 2 Proteinbanden der Größe 28 kDa und 22 kDa gefunden. Anhand einer Edman-Abbau-Analyse wurde die 22 kDa Bande als N-terminaler Teil der Taspase1 identifiziert. Daraufhin wurde die Vermutung aufgestellt, dass Taspase1 einer intramolekularen Proteolyse zwischen Aspartat 233 und Threonin 234 unterläuft. Eingefügte Mutationen an den Aminosäuren 233 und 234 zeigten anschliessend, dass diese Aminosäuren essenziell für die Aktivität der Taspase1 sind. Bemerkenswert an Taspase1 ist die Homologie zur I-Asparaginase-2-Familie von Hydrolyasen, die jedoch im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie eine Endopeptidase-Aktivität aufweist.⁵⁹

2005 veröffentlichte *Khan et al.* die erste Kristallstruktur von Taspase1.¹⁴⁴ Das Proenzym und die aktivierte Taspase1 sind Dimere. Der Unterschied liegt darin, dass das Proenzym ein Dimer ist, bestehend aus zwei Monomeren, während die aktivierte Taspase1 ein Dimer ist, das aus einer α - und β -Untereinheiten eines jeweiligen Monomers (=Heterotetramer) besteht. Das Hetero-Tetramer ($\alpha\beta\beta\alpha$) ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiv.¹⁴⁴ In neusten Untersuchungen zeigten *Nagaratnam et al.*, dass ein oligomerer Zustand von Taspase1 konzentrationsabhängig ist und in Lösung bei höheren Proteinkonzentrationen höhere oligomere Zustände - plausibel Tetramere und Hexamere - bildet. Mit ihren gewonnen Kristallstrukturen

bestätigen sie den aktiven Zustand der aktiven Taspase1 als Hetero-Tetramer ($\alpha\beta\beta\alpha$). Außerdem vermuten sie, dass die aktive Taspase1 sich selbst oligomerisiert, um eine höhere oligomere Anordnung in Form eines Trimers von $\alpha\beta\beta\alpha$ -Heterotetrameren zu bilden.¹⁴⁵ Die Struktur der aktivierten Taspase1 enthält 14 β -Stränge und 7 α -Helices. Die β -Stränge befinden sich in einem meist antiparallelen β -Sandwich und die Helices befinden sich auf den beiden äußeren Seiten dieses Sandwichs.

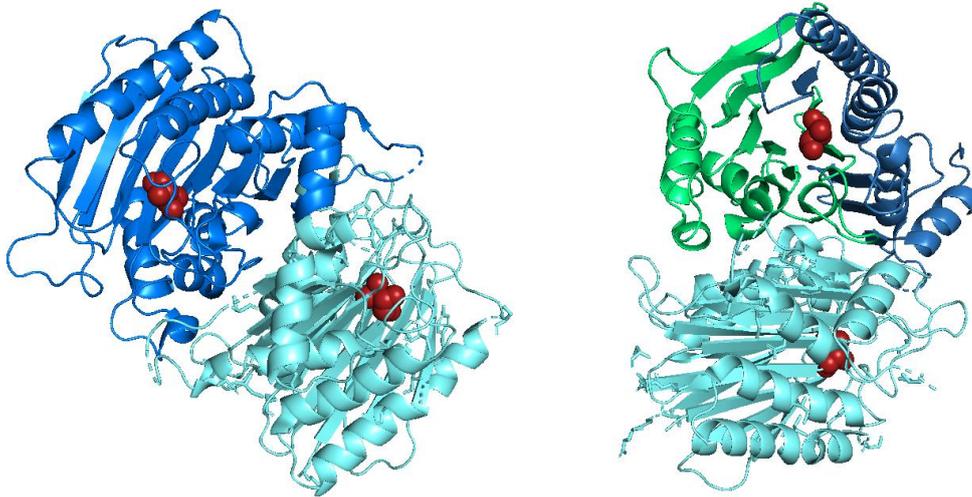


Abbildung 9 Taspase1 Heterotetramer

Taspase1 besteht aus zwei Dimeren, autoproteolytisch aktiviert wird und dann eine $\alpha\beta\beta\alpha$ -Struktur aufweist. Die Struktur der aktivierten Taspase1 enthält 14 β -Stränge und 7 α -Helices. Linkes Monomer in Blau dargestellt und rechtes Monomer in Cyan, das in Rot markierte im Inneren des Monomers ist das aktive Zentrum (linkes Bild). Rechtes Bild verdeutlicht im oberen Monomer die α -Untereinheit (28 kDa, blau) und die β -Untereinheit (22 kDa, grün). In Rot wieder das aktive Zentrum. (Struktur aus der Datenbank PDB 2A8j)

Das aktive Zentrum von Taspase1 befindet sich oben auf dem β -Sandwich und wird durch Reste von beiden Untereinheiten der Monomere gebildet. Das katalytische Nucleophil des Enzyms Thr234 befindet sich am N-terminalen Ende der β -Untereinheit. Die Kristallstruktur der menschlichen Taspase1 zeigte zudem signifikante Konformationsunterschiede zwischen dem Proenzym und dem aktiven Konformer. Genauere Betrachtungen der Kristallstruktur ließen zur Offenbarung einer offenen und einer geschlossenen Struktur zu. Leider ist die Kristallstruktur nicht komplett gelöst, sodass einige der Aminosäuren in der Auflösung fehlen.^{144,145} Computergestützte Modellierung von Taspase1 basierend auf der verfügbaren Kristallstruktur, geben eine neue Sicht auf die mögliche Konformationsänderung. Die fehlenden Aminosäurereste 206–229 und 352–362 sowie eines Strukturelements, das aus Aminosäureresten 164–180, wurden modelliert. Unterschiede zwischen der veröffentlichten Kristallstruktur und der *in silico* modellierten Taspase1-Struktur werden in Rot angezeigt (s. Abb. 10). Die katalytischen Zentren sind orange dargestellt.¹⁴⁶

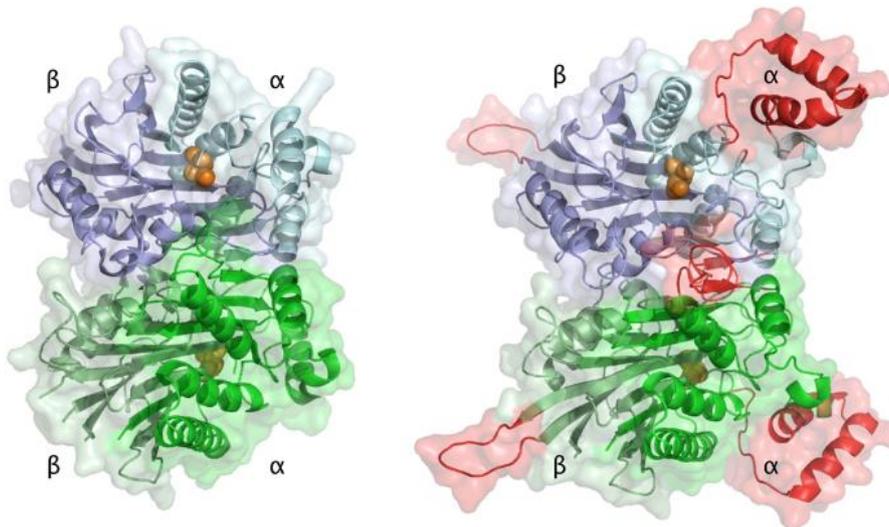


Abbildung 10 Konformationsänderung der Taspase1 auf Basis der Kristallstruktur nach Khan et al. (2005)

Taspase1 besteht aus zwei Dimeren, autoproteolytisch aktiviert wird und dann eine $\alpha\beta\alpha$ -Struktur aufweist. Aus den Kristallstrukturen von Khan et al.¹⁴⁴ können 2 Kristallstrukturen entnommen werden (Protein Datenbank PDB 2A8J (aktive Form) und 2A8I (inaktive Form)). Links: Kristallstruktur der menschlichen Taspase1 (Khan et al., 2005). Die PDB-Struktur 2A8J wird angezeigt. Rechts: Computergestützte Modellierung von Taspase1 basierend auf der verfügbaren Kristallstruktur. Die fehlenden Aminosäurereste 206–229 und 352–362 sowie eines Strukturelements, das aus Aminosäureresten 164–180 wurden modelliert. Unterschiede zwischen der veröffentlichten Kristallstruktur und der *in silico* modellierten Taspase1-Struktur werden in Rot angezeigt. Das katalytische Zentrum ist in orange dargestellt.¹⁴⁶

Van den Boom et al. untersuchten die ungelösten Strukturelemente, die in der Kristallstruktur nicht zu sehen bzw. nicht aufgelöst sind. Aus den Daten geht hervor, dass die ungelöste Struktur eine α -Helixschleife mit einer definierten *Helix-Turn-Helix* Sekundärstruktur aufweist, die sich unabhängig zum katalytischen Zentrum bewegt. Sie stellten die Hypothese auf, dass diese Helixschleife im geschlossenen Zustand an dem katalytischen Zentrum liegt, dann eine Konformationsänderung stattfindet, die Helixschleife flexibler wird und ein offener Zustand entsteht. Es wird angenommen, dass das Öffnen der katalytischen Tasche durch positive Ladungsabstoßung seitens der geladenen Schleife und das des aktiven Zentrums gefördert wird.¹⁴⁷ Aus der Kristallstruktur von *Khan et al.* ging ebenfalls hervor, dass ein Chlorid-Ion am aktiven Zentrum gebunden ist und wahrscheinlich die Taspase1 in ihrer Aktivität hemmt, in einem Dosis-Wirkungsversuch ergab sich ein IC_{50} -Wert von 26 mM.¹⁴⁴ Untersuchungen bezüglich der Aktivität der Taspase1 ergaben, dass diese Protease einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik folgt und erzielt einen K_M -Wert von etwa 12 μ M.¹⁴⁴

Basierend auf Daten von *Sabiani et al.* scheint die Dimerisierung von zwei Taspase1-Monomeren ein Schlüsselfaktor zur Aktivierung der intrinsischen autoproteolytischen Funktion zu sein. In ihren Untersuchungen kamen mehrere wichtige Aminosäuren zum Vorschein, darunter S291 und D233, die anscheinend eine entscheidend Rolle für die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den Resten D233 und T234 einnehmen.¹⁴⁶ Mutationsstudien an Taspase1 offenbarten, dass zwei Taspase1-Proenzyme (p50) Monomere zunächst einen Homodimer (p50/p50) bilden. Die dimerisierte Taspase1 wird dann autokatalytisch durch das Serin291 zwischen den Aminosäuren Aspartat-233 und Threonin-234 hydrolysiert. Dieser Schritt führt zur Freisetzung der notwendigen Hydroxylgruppe am Threonin-234 und damit zur Aktivierung der eigentlichen enzymatischen Eigenschaft, nämlich die sequenzspezifische Prozessierung am *MLL*, *MLL4* oder *TFIIA*.¹⁴⁶ Das Homodimer weist eine *cis/trans*-Aktivität auf. Hierbei findet die Autokatalyse vermutlich in *cis*-Form statt und das Spalten von Zielproteinen

in *trans*.¹⁴⁴ Einige Publikationen zeigen, dass die direkte Mutation an Thr234 zur vollständigen Inaktivierung der Taspase1-Autokatalyse führt, jedoch die Aktivität in *trans*-Form beibehält. Die übrigen Mutanten zeigten eine stark verminderte, proteolytische Aktivität.^{59,146,148} *Sabiani et al.* entwickelte 2015 eine autokatalytisch inaktive Mutante der Taspase1, genannt dominant-negative Taspase1 (dn-Taspase1). Diese Mutante dimerisiert, jedoch autoprozessiert sie nicht und hydrolysiert sein Zielprotein nicht. In der dn-Taspase1 wurden die Stellen C163E und S291A mutiert, welche sich strategisch nah am katalytischen Zentrum befinden und die Autoprozessierung unterbinden.¹⁴⁶ Ebenfalls wurde von *Sabiani et al.* ein Reaktionsmechanismus postuliert.

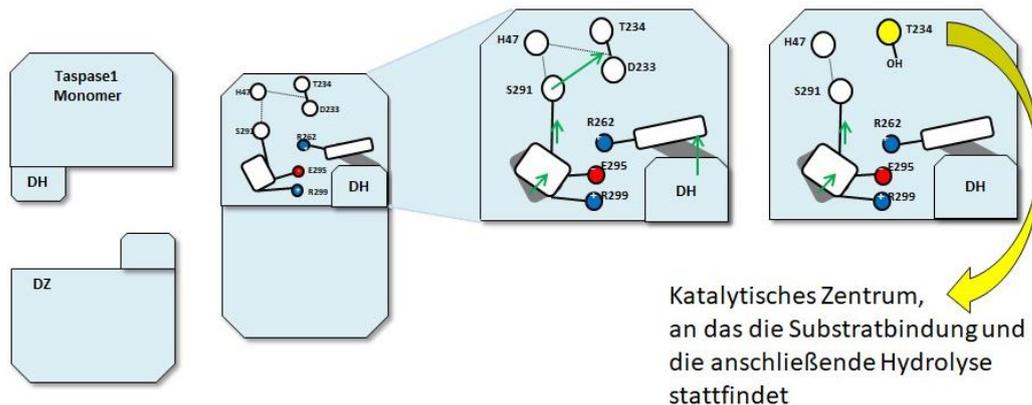


Abbildung 11 Die Dimerisierung als Schlüsselereignis für den Aktivierungsmechanismus

Das „dock and click“-System beschreibt eine Umlagerung im entgegengesetzten Monomer während der Dimerisierung. Diese Umlagerung verursacht, dass das Arginin R262 in Richtung der Glutaminsäure E295 verschoben wird, dabei wird eine Salzbrücke gebrochen. Die Umlagerung führt zur Neupositionierung von E295, folglich verschiebt sich das Serin S291. Diese Strukturverschiebung von E295 erlaubt die korrekte Positionierung von S291 und somit die Initiierung der Autoproteolyse.

Wenn zwei Taspase1-Monomere zueinander finden, dabei binden die beiden *docking heads* (DH) in die Nähe des katalytischen Zentrums des gegenüberliegenden Monomers, der sogenannten „*docking zone*“ (DZ). In der Veröffentlichung wird ein „*dock and click*“-System beschrieben, bei der eine Umlagerung im entgegengesetzten Monomer, während der Dimerisierung stattfindet. Diese Umlagerung verursacht, dass das Arginin R262 in Richtung der Glutaminsäure E295 verschoben wird, während gleichzeitig die bestehende Salzbrücke zwischen den Aminosäuren E295 und R299 gebrochen wird. Die Umlagerung führt zu einer Neupositionierung von Glutaminsäure E295, folglich verschiebt sich das Serin S291. Diese Strukturverschiebung von E295 erlaubt die korrekte Positionierung von S291 und somit die Initiierung der Autoproteolyse. Die Spaltung der D233-T234-Peptidbindung, aktiviert das reaktive Zentrum der Taspase1. Nun erfolgt die Bindung des Substrats und die anschließende Hydrolyse des gebundenen Substratproteins (s. Abb. 11).¹⁴⁶

1.4 Die Methode Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF)

In den frühen 80er war bereits bekannt, dass seltene Erdelemente wie zum Beispiel Terbium oder Europium lang-lebende Tracer sind, die schon damals für die zeitauflösende Fluoreszenz verwendet wurden.¹⁴⁹ In den 90er Jahren erfand das Unternehmen Cisbio Bioassays, das auf Immunoassays spezialisiert ist, den homogenen zeitaufgelösten Fluoreszenzassay (HTRF). Die HTRF-Methode kombiniert Fluoreszenzresonanzenergie Transfer (FRET)-Technologie mit zeitaufgelöster (time-resolved - TR) Messung, die zu einer idealen Plattform für das Untersuchen von Wirkstoffen in Studien nach der Hochdurchsatzmethoden ermöglicht.^{150,151} Die

FRET-Methode nutzt den Effekt des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren, einem Donor und einem Akzeptor, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe befinden. Dieser Prozess tritt dann auf, wenn das Emissionsspektrum des Donor mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Die Energieübertragung vom Donor zum Akzeptor erfolgt durch eine Anregung des Donors, die durch eine Energiequelle (z. B. eine Blitzlampe) bei einer bestimmten Wellenlänge induziert wird. Durch elektrische Dipol-Dipol Wechselwirkung findet ein Energietransfer auf den Akzeptor statt, der dann anschließend bei einer spezifischen Wellenlänge emittiert.¹⁵² Die Energieübertragung wird durch den Abstand zwischen Donor und Akzeptor und die spektralen Überlappung bestimmt. Die spektrale Überlappung wird durch den Förster-Abstand (R_0) beschrieben.¹⁵²

$$\begin{aligned} \text{Energietransferrate} & k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \\ \text{Energieeffizienz} & E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \end{aligned}$$

Formel 1 Berechnung der Energietransferrate und Energieeffizienz

Legende: r ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, τ_D ist die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Energietransfers, R_0 ist der Wert des Energietransfers

Durch die Kombination wird in der HTRF-Methode durch die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz, die kurzlebige Hintergrundfluoreszenz nicht mitdetektiert. Durch das Einführen einer Zeitverzögerung (50-150 Mikrosekunden) zwischen der anfänglichen Lichtanregung und der Fluoreszenzmessung, wird der Beitrag aller unspezifischen kurzlebigen Fluoreszenzemissionen minimiert. Voraussetzung hierfür ist eine hohe Halbwertszeit des FRET-Donors.¹⁵³ Für dieses Verfahren sind spezifische Fluorophore notwendig, besonders seltene Lanthanoide wie Europium (Eu^{3+}) oder Terbium (Tb^{3+}) werden hierfür eingesetzt.^{154,155} Die Fluoreszenz von Europium- und Terbiumionen resultiert aus elektronischen Übergängen zwischen f-Orbitalen. F-Orbitale werden von höheren besetzten Orbitalen abgeschirmt, dadurch zeigen sie kein polaritätsabhängiges Spektralbild und sie wird nicht durch Sauerstoff gequenchet. Die Lanthanoide weisen aufgrund dieser Abschirmung lange Zerfallszeiten und aufgrund ihrer kleinen Extinktionskoeffizienten niedrige Emissionsraten auf.¹⁵²

Es ist bekannt, dass Lanthanoide je nach Liganden längere Zerfallszeiten von 0.6–2.5 ms aufweisen. Es ist auch üblich, Lanthanoidchelate anstelle von Lanthanoiden allein zu verwenden. Dies liegt daran, dass die Lanthanoide extrem schwache Absorber sind, mit einem Extinktionskoeffizienten von $0,1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁵² Der Chelatkomplex dient als Antenne, er ermöglicht die Absorption des Lichtes und die Übertragung der Energie auf die Ionen. Ein großer Vorteil dieser Lanthanoid-Komplexe ist, dass diese nicht empfindlich gegenüber *Photobleaching* sind, zudem erweisen sich die Komplexe als äußerst stabil.¹⁵³

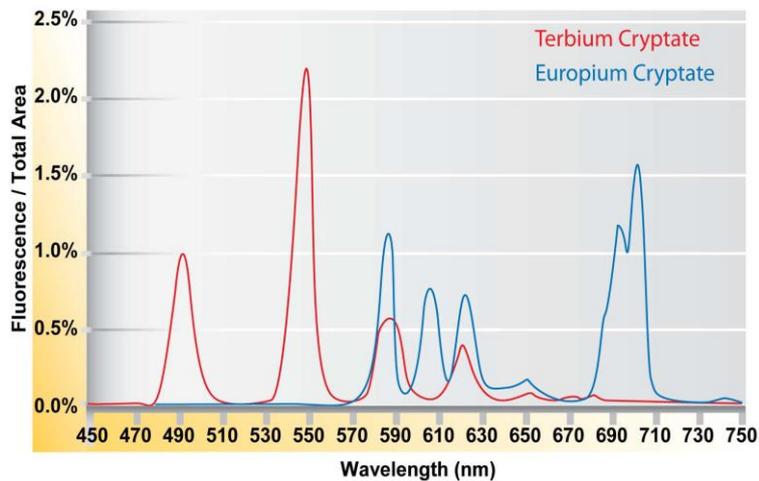


Abbildung 12 Absorptionsspektrum von Terbium und Europium Cryptat¹⁵¹

Absorptionsmaxima bei Terbium: 490 nm, 520 nm, 550 nm und 620 nm. Maxima bei Europium: 580 nm, 600 nm, 620 nm und 700 nm. Als Referenzsignal für die Datenanalyse kann bei beiden eine Wellenlänge von 620 nm gewählt werden.

Die HTRF Technologie wurde zunächst nur mit Europium Cryptat eingeführt¹⁵⁵, erst Jahre später wurde ein 2. Generation Donor, Terbium-Cryptat (Lumi4-Tb), eingeführt.¹⁵¹ Terbium-Cryptat besitzt im Vergleich zu Europium unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften (s. Abb. 12), zudem eine höhere Quantenausbeute und einen höheren molaren Extinktionskoeffizienten. Das Terbium ist mit den gleichen Akzeptor-Fluorophoren des Europiums kompatibel. Außerdem kann das Terbium auch als Donorfluorophor mit grün emittierenden Fluorophoren als FRET-Akzeptor kombiniert werden, was mit dem Europium nicht möglich ist. Da das Terbium mehrere Emissionspeaks einschließlich eines bei 490 nm aufweist (s. Abb. 12), ist eine Überlappung mit dem Absorptionsspektrum der grün-emittierenden Fluorophore möglich. Darüber hinaus können alle Terbium HTRF Assays auf den gleichen HTRF-kompatiblen Instrumenten wie die des Europium HTRF Assays gemessen werden.¹⁵¹

1.5 Closantel sodium

Closantel ist ein von der FDA zugelassenes Anthelminthikum (Salicylsäureanilid), das anti-parasitäre Medikament wirkt gegen mehrere adulte und in verschiedenen Entwicklungsstadien von Trematoden, Nematoden und Arthropoden. Ihr Einsatz findet es in der Bekämpfung von *Fascioliasis* (Leberegel) bei Schafen und Rindern.¹⁵⁶

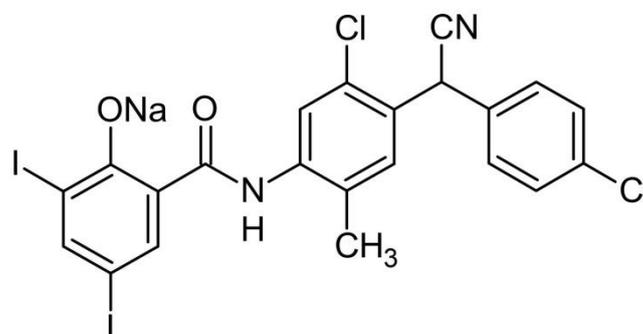


Abbildung 13 Strukturformel Closantel sodium

Closantel wirkt über den Energiestoffwechselweg, indem es die oxidative Phosphorylierung in Leberegeln entkoppelt.¹⁵⁷ Nach oraler Aufnahme bei Tieren wird die maximale Plasmakonzentration in 8–48 Stunden erreicht und hat in etwa eine Eliminationshalbwertszeit von 2–3 Wochen. Closantel wird schlecht metabolisiert und seine Gewebeverteilung ist durch seine starke Proteinbindung begrenzt.¹⁵⁸ Seine Pharmakokinetik beim Menschen ist unbekannt.¹⁵⁹ Bei der Closantel-Toxizität umfassen die bei Tieren beschriebenen pathologischen Läsionen eine Verengung des intrakanalikulären Sehnervs und eine Papillenatrophie.^{157,160} Zu den histopathologischen Veränderungen zählen schwere myelinische Ödeme, Vakuolenbildung, Wallersche Degeneration, reaktive Astrozytose und spongiforme Degeneration im Gehirn sowie Verlust der Photorezeptorschicht und Schädigung der äußeren und inneren Kernschicht der Netzhaut.¹⁶⁰

Closantel wurde als potenter und spezifischer Inhibitor der Chitinase von *Onchocerca volvulus* (OvCHT1) und anderen Filarien-Chitinasen identifiziert. Onchozerkiasis ist eine Krankheit bei Menschen, die durch die Filarien *Onchocerca volvulus* verursacht wird und zu Erblindung des Infizierten führen kann. Eine *in silico* Studie wurde durchgeführt, um den Bindungsmodus und die Spezifität von Closantel gegenüber OvCHT1 herauszufinden, jedoch geben die Ergebnisse nur begrenzte Einblicke in den Bindungsverlauf.¹⁶¹ Andere Forscher berichteten, dass die antihelminthische Wirkungsweise von Closantel auf seiner Rolle als Protonen-Ionophor beruht.^{162,163}

Vor kurzem wurde überraschenderweise eine antibakterielle Wirkung von Closantel in einem Screen identifiziert. In weiteren Untersuchungen wurde die Anti-*Staphylokokken*-Aktivität von Closantel gegen Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*-Isolate und andere Gram-positive Bakterien bestätigt.¹⁶⁴

Da Schilddrüsenhormone eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung spielen, ist es wichtig chemische Verbindungen zu identifizieren, die in der Lage sind, die endokrine Homöostase der Schilddrüsenhormone zu stören. In einer Studie von *Matsudara et al.* wurden Schilddrüsenhormon-ähnliche Verbindungen getestet, darunter auch Closantel. Dabei konnten sie zeigen, dass Closantel Schilddrüsenhormon-ähnliche Aktivität aufzeigte und zudem die Fähigkeit zur Induktion von BCL3-mRNA aufwies.¹⁶⁵ Es ist bekannt, dass BCL3 in der Hypophyse auf mRNA-Expression von Schilddrüsenhormone reguliert wird^{166,167}, zudem gehört BCL3 zu der Familie der I κ B Proteine, die die Transkription durch NF κ B moduliert.¹⁶⁸

In einer Studie wurden die Prozesse der Vaskulogenese und Angiogenese bei Zebrafischen unter Einfluss von Closantel untersucht. Während der frühen Embryogenese ist die angiogene Gefäßmusterung bei Zebrafischen einfach und tritt hauptsächlich im Kopf, in den intersegmentalen Gefäßen und in den subintestinalen Gefäßen auf. 2016 fanden *Zhu et al.*, dass Closantel die Angiogenese in Zebrafischen mit einem IC₅₀ von 1,69 μ M bei intersegmentalen und bei subintestinal Gefäße mit 1,45 μ M inhibiert. Zudem erwies sich Closantel in der Studie als Antikrebsmittel. Um das Antikrebspotenzial von Closantel durch Antiangiogenese im Prozess des Krebswachstums und der Metastasierung zu untersuchen, wurden Zebrafisch-Xenotransplantate mit menschlichen Ramos-, Hela-, PANC-1- oder HepG2-Krebszellen verwendet. Anhand der Behandlung mit Closantel konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu der Kontrollgruppe die Zellen mit Closantelbehandlung kleinere Metastasierungsbereiche zeigten. Alle xenotransplantierten Krebszellen, die behandelt worden sind, hatten eine offensichtlich verringerte Fluoreszenzintensität, was darauf hinweist, dass Closantel die Migration, Proliferation oder Metastasierung von menschlichen Ramos-, Hela-, PANC-1- und HepG2-Krebszellen in Zebrafisch-Xenotransplantaten abtöten oder unterdrücken kann.¹⁶⁹

Es gab mehrere Berichte, dass eine Überdosierung von Closantel eine Netzhautdegeneration bei Menschen und verschiedenen Tierspezies induziert.^{157,159,170,171} 2019 publizierte *Kumar et al.* einen Fall, bei dem ein 25-jähriger Bauer fälschlicherweise insgesamt 2250 mg Closantel über einige Tage zu sich genommen hatte und nach einigen Tagen über schmerzlosen Sichtverlust klagte. Im *Case Report* wurde dem Patienten intravenös mit Methylprednisolon 1 g (einmal) täglich über 3 Tage behandelt, gefolgt von oralem Prednisolon 40 mg (einmal täglich). Nach einem Monat erlangte der Patient sein Sehvermögen wieder. Dies ist der erste *Case Report* über eine erfolgreiche Behandlung mit systemischen Steroiden bei Closantel-bedingter reversibler Blindheit, die eine sonst schlechten Prognose hat. In den Bericht wurde beschrieben, dass eine sofortige Behandlung mit systemischen Steroiden bei frühzeitig auftretenden Fällen von Vorteil sein kann.¹⁷²

1.6 Ziel dieser Arbeit

Aus dem Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters (DKKR) 2019 geht hervor, dass Leukämie eines der häufigsten bösartigen Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen ist.¹ Leukämie ist die häufigste bösartige Krebserkrankung im Kindes- und Jugendalter. Bei einem Kind von 1120 Kindern wird Leukämie diagnostiziert, dabei trifft diese Diagnose Jungen 30 % häufiger als Mädchen. Die Krankheitssymptome treten bei den Kindern noch vor dem Schulalter auf und am häufigsten haben die Kinder mit der akuten Form zu kämpfen. Bei einer Diagnose mit einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) haben die Kinder meist eine gute Prognose, während bei der akuten myeloische Leukämien (AML) eine deutlich schlechtere.¹

Die Suche nach Wirkstoffen gegen diese meist sehr aggressive Erkrankung ist von hohem Interesse. Taspase1 wurde als ein proteolytisch prozessierendes MLL-Enzym identifiziert, das sich in Wirbellosen und Vertebraten zusammen mit Mitgliedern der Trithorax/MLL/KMT2A-Proteinfamilie entwickelt hat. Taspase1 prozessiert nicht nur das MLL1 und MLL2, deren Fusionsproteine AF4-MLL, sondern auch den Transkriptionsfaktor IIA (TFIIA) sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.³ Die Entwicklung eines spezifischen Hemmmechanismus oder ein potenzieller Arzneistoff bzw. Inhibitor rückt somit immer weiter in den Fokus.

Bis heute konnten einige spezifische Taspase1-Inhibitoren erzielt werden, diese zeigten jedoch in den jeweiligen Studien eine schwache Hemmung bzw. wurden für die klinische Forschung nicht weiter berücksichtigt.^{135,139,142,146,147}

Ziel dieser Arbeit ist das Etablieren eines Testsystems in dem die Taspase1 sowohl im Dimerisierungs-, Autoaktivierungs- und/oder Substratbindungsschritt inhibiert werden könnte. Umgesetzt soll der Plan anhand der bereits in der Masterarbeit entwickelten *Homogeneous time resolved fluorescence* (HTRF) basierten Screening Assay in dem die Monomere Taspase1 getestet wird. Es sollen verschiedene Verbindungen getestet werden, darunter FDA zugelassene Medikamente, die freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Knapp zur Verfügung gestellt werden.

2 Material

2.1 Laborausüstung

Geräte	Hersteller
384-Well Platte NUNC 264706	Thermo Fisher Scientific GmbH
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
ÄKTApurifier	GE Healthcare Europe GmbH
Amicon Stirred cell Model 8050, 50 ml	EMD Millipore
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck KGaA
Analysenwaage TE124S-OCE	Sartorius
Autoklav	biomedis
Blotting-Apparatur Trans-Blot® Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH
Brand™ accu-jet™ pro	VWR
Brutschränke	Hereaus
CO2-Inkubator HERAccl 240	Thermo Fisher Scientific GmbH
Dampfsterilisator	Getinge
E1-ClipTip Pipette	Thermo Fisher Scientific GmbH
Eismaschine	Ziegler
Geldokumentation c200	Azure Biosystems
Inkubationsshaker Max Q 4000	Thermo Fisher Scientific GmbH
Inkubationsshaker Multitron Standard	Infors GmbH
Magnetisches Separations-Rack	New England Biolabs
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Mikroskop	Nikon
Milli-Q Wassersystem	ELGA LabWater
Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini PROTEAN® Comb, 15 Well 1.0 mm	
Mini PROTEAN® Gel releasers	
Mini PROTEAN® Short plates	
Mini PROTEAN® Glass plates 1.0 mm	
Molecular Imager Chemi DOC™XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH
NanoDrop 2000c UV/Vis Spektrometer	Thermo Fisher Scientific GmbH
Nanophotometer P330	Implen
Nitril Handschuhe M	VWR
NucleoCounter NC-3000	Chemometec
PCR-Gerät	Applied Biosystems
PCR-Gefäße	Greiner bio-one
Peristaltische Pumpe Reglo Analog	ISMATEC
pH-Meter Level1	Inolab
Pipetten Research und Research Plus	Eppendorf AG
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
PowePac™ Basic Powersupply	Bio-Rad Laboratories GmbH
PowerPac™ 300 Powersupply	Bio-Rad Laboratories GmbH
Rollmischer SRT6D	Stuart
SeqStudio Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
Steril-Gard Hood (LaminAir HB2427)	Hereaus

Thermomixer compact	Eppendorf AG
Tecan Infinite F200 Pro	Tecan Deutschland GmbH
Tecan Spark 10M	Tecan Deutschland GmbH
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Tischzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG
trUView Cuvette	Bio-Rad Laboratories GmbH
UV-Tisch	Fröbel Laborgeräte
Vakuumpumpe VAC-MAN®	Promega Corporation
VarioSkan (Flash Multimode Reader)	Thermo Fisher Scientific GmbH
Vortex Minishaker	VWR International GmbH
Zellhomogenizer	APV Systems
Zentrifugen	Eppendorf (5415D, 5424) Beckman (J2-HS, J6-HC) VWR (Galaxy Mini Star)

2.2 Chromatographie

Superdex 75 10/300 Säule	GE Healthcare Europe GmbH
Superdex 200 16/600 Säule	GE Healthcare Europe GmbH
HisTrap™ FF Säule - 5ml	GE Healthcare Europe GmbH
His Mag Sepharose™ Ni Magnetic Beads	GE Healthcare Europe GmbH

2.3 Membranen (Ultrafiltration, Dialyse und Western Blot)

Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filter	Millipore GmbH
Rotilabo®-Spritzenfilter Durchmesser 0,45 µm, steril	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Spectra/Por®Dialysemembran MWCO 6000 – 8000 Da	Spectrum Europe B. V.
Ultracel 10 kDA Ultrafiltration Disk	Millipore GmbH
Low Fluorescence Western Membrane (PVDF) (9x7cm)	Abcam
Slide-A-Lyzer® Mini Dialysis Devices	Pierce, Thermo Scientific

2.4 Kits

Big Dye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega Corporation
Technical Manual	
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	Promega Corporation

2.5 DNA- und Proteinlängenstandards

Λ-DNA (für λ-Marker mit <i>Clal</i> geschnitten)	Thermo Fisher Scientific GmbH
100bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs GmbH
Color Protein Standard Broad Range Precision Plus	New England Biolabs GmbH
Protein™ Unstained Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH

2.6 Fluorophore zur Markierung von Proteinen

SNAP-Lumi4 Terbium Cryptate	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich Lot. Num. 09
SNAP-Vista® Green	New England Biolabs GmbH, Deutschland

2.7 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

DNase I aus Kuh-Pankreas, Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dpn I Endonuklease	New England Biolabs GmbH
Lysozym aus Hühnereiweiß (40000 U/mg) Produktnummer: 12650-33-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH
RNAse A aus Kuh-Pankreas, Typ I-AS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH
TEV-Protease	bereitgestellt von Dr. Jan Heering, aus eigener Produktion
<i>Xho</i> I Restriktionsendonuklease	New England Biolabs GmbH
<i>Nde</i> I Restriktionsendonuklease	New England Biolabs GmbH

2.8 Plasmide

pBH4	pET15-Derivat, N-terminaler His ₆ -Tag und einer TEV-Schnittstelle, Resistenz gegenüber Ampicillin, Expression durch IPTG induzierbar, T7 Promotor, Replikationsursprung: pBR322/ColE1
pET29	N-terminaler His ₁₀ -Tag gefolgt von einer TEV-Schnittstelle, Resistenz gegenüber Kanamycin, Expression durch IPTG induzierbar, T7 Promotor, Replikationsursprung: pBR322
pET29BH4	N-terminaler His ₁₀ -Tag gefolgt von einer TEV-Schnittstelle, Resistenz gegenüber Kanamycin, Expression durch IPTG induzierbar, T7 Promotor, Replikationsursprung: pBR322

pRARE	pACYC-Derivat, liefert t-RNAs für Codons mit geringerer Häufigkeit in <i>E.coli</i> mRNA, Resistenz gegenüber Chloramphenicol, Expression durch IPTG induzierbar, Replikationsursprung: p15A, kompatibel mit pET-Vektoren
pET22b(+)	N-terminaler pelB Signal Sequenz, trägt einen C-terminalen His ₆ -Tag, Resistenz gegenüber Ampicillin, Expression durch IPTG induzierbar, trägt T7 Promoter
pCR Blunt II-TOPO	ccdB Gen für positive Selektion, EcoRI Schnittstelle, Kanamycin und Invitrogen Zeocin Resistenz, M13 Forward & Reverse, pUC Origin, SP6 & T7 Promotor, geeignet für Blunt ends
pCR 2.1-TOPO	EcoRI Schnittstelle, Kanamycin und Ampicillin Resistenz, M13 Forward & Reverse, pUC Origin, T7 Promotor, geeignet für TA-Überhänge

2.9 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> NEB® 5-alpha Competent (New England Biolabs GmbH, Deutschland)	K12-Stamm, DH5α™-Derivat Genotyp: <i>fhuA2 Δ(argF-lacZ) U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>
<i>E.coli</i> T7 Express Competent (New England Biolabs GmbH, Deutschland)	B-Stamm, BL21-Derivat, T1-Phagenresistent, besitzt keine Lon- und OmpT-Protease Genotyp: <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 Δ(mcrC-mrr) 114::IS10</i>
<i>E.coli</i> T7 Express Competent + pRARE-Plasmid	besitzt die gleichen Eigenschaften wie die T7 Express Zellen zusätzlich mit einer Resistenz gegen Chloramphenicol

2.10 Zelllinie

HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen. Derivat der Zelllinie 293 und tragen zusätzlich ein Plasmid mit einer Mutante des temperatursensitiven Gens des SV40 T-Antigens und
-----------------	---

einer Neomycinresistenz. Klassifiziert als Sicherheitsstufe S1.
DSMZ ACC 635

2.11 Getestete Substanzbibliothek

FDA Library

Fettsäure-Derivate

PPI Fragment Library

Erworben von *Selleck Chemicals GmbH* und gestellt von Prof. Dr. Stefan Knapp
Synthetisiert und gestellt von Prof. Dr. Eugen Proschak
Erworben bei Enamine und gestellt von Prof. Dr. Stefan Knapp

2.12 Chemikalien

Agar

Agarose

Ammoniumperoxid Sulfat (APS)

Ammoniumchlorid

Ampicillin

Acrylamid

Bacto Trypton

Bovine Serum Albumin (BSA)

Brilliantblau R-250

Bromphenolblau

CaCl₂

Chloramphenicol

Closantel

Closantel sodium

Complete Protease Inhibitor Cocktail
(EDTA-frei)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Doxycycline HCl

1,4-Dithiotreitol (DTT)

Essigsäure

Ethanol

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Glycerol, 99% p.a.

Glycin

Guanidiniumhydrochlorid

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)

Hi-Di™ Formamid

Imidazol

InstantBlue™ Protein Stain

Isopropanol

Bernd Euler Biotech.

Invitrogen

Carl-Roth GmbH & Co. KG

Oxoid

Carl-Roth GmbH & Co. KG

Carl-Roth GmbH & Co. KG

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Merck KGaA

Carl-Roth GmbH & Co. KG

Sigma Aldrich Chemie GmbH

Abcam

Roche Diagnostics GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Invitrogen

Carl-Roth GmbH & Co. KG

Applied Biosystems

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

C.B.S. Scientific

Carl-Roth GmbH & Co. KG

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Kaliumfluorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Kanamycinsulfat	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Lysozym	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Magnesiumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Mecocycline Sulfosalicylate	Sigma Aldrich GmbH
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Methacycline HCl	Sigma Aldrich GmbH
Milchpulver	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol
Natriumhydroxid	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Natriumphosphat	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Nickel(II)Sulfat Hexahydrat	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Oligonukleotide	Eurofines, Germany
Primaquine bisphosphate	Sigma Aldrich Chemie GmbH
RNase-Free-Water	Qiagen
Spectinomycin	Carl-Roth GmbH & Co. KG
TEMED	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tetracycline HCl	AppliChem GmbH
Tris	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tween®20	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Yeast Extract	Oxoid

2.13 Medien, Puffer, Lösungen

2.13.1 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Accutase	Capricorn Scientific
DMEM Low Glucose	Capricorn Scientific
FBS	Capricorn Scientific
L-Glutamin (200 mM)	Capricorn Scientific
PBS	Capricorn Scientific
Penicillin/ Streptomycin	Merck
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Gibco

2.13.2 Nährmedien für *E.coli*

LB (<i>lysogeny broth</i>)-Vollmedium (1L)	5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 10 g Tripton in 1 L Wasser. Autoklaviert 15 min bei 121°C. Zugabe von Antibiotika im Verhältnis 1:1000.
SOC Medium (1L)	20 g Peptone, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl bei einem pH von 7.2 – 7.4 (NaOH) und sterilisiert. 20 mM Glucose-Lösung, 25 mM KCl und 10 mM MgCl ₂ Restvolumen mit Wasser auf 1L aufgefüllt, dann steril filtriert.

YT-Agar 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 10 g Agar in 1 L Wasser. Autoklaviert 15 min bei 121°C. Die Zugabe von Antibiotika (1:1000) erfolgte nach dem Abkühlen auf ca. 55°C.

YT-Medium 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl in 1 L Wasser. Autoklaviert bei 121°C. Zugabe von Antibiotikum (1:1000).

2.13.3 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele Für beispielsweise ein 0,5 %iges Agarosegel wurde 0,5% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 60°C, wurde 0,1% (v/v) Ethidiumbromid-Stamm-lösung untergemischt, die Lösung in die Gießkammer gegeben und das Abkühlen abgewartet.

Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

TBE-Puffer 100 mM Tris, 500 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA; Lagerung bei Raumtemperatur.

10x DNA-Ladepuffer 50 % Saccharose, 100 mM EDTA, 0,1 % Brom-Phenol-Blau und 0,1 % Xylen-Cyanol-FF. Lagerung bei 4°C.

2.13.4 Antibiotika und Antikörper

Ampicillin-Stammlösung (1000-fach) 100 mg/mL Ampicillin (Natriumsalz) in 50% (v/v) Ethanol gelöst und steril filtriert

Kanamycin-Stammlösung (1000-fach) 35 mg/mL Kanamycin in Wasser gelöst und steril filtriert

Chloramphenicol-Stammlösung (1000-fach) 34 mg/mL Chloramphenicol in Ethanol gelöst und steril filtriert

Spectinomycin-Stammlösung (1000-fach) 25 mg/mL Spectinomycin in Wasser gelöst und steril filtriert

Die Lagerung der Antibiotika-Stammlösungen erfolgte Lagerung bei -20°C.

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung	Hersteller
Anti-GFP	1:1000	Hase polyklonal IgG, all variants of <i>Aequorea victoria</i> GFP such as S65T-GFP, RS-GFP and EGFP	Abcam ab290
α -His-Tag	1:1000	Maus monoklonales IgG1	Cell signaling 2366S
Taspase1	1:500	Maus monoklonales IgA, bindet zwischen den Aminosäuren 89-130	Santa cruz Sc-390934
Taspase1	1:500	D-6 ist ein Maus monoklonales IgG1, Aminosäuresequenz 289-420 lokalisiert am C-terminus	Santa Cruz Sc-514677
Anti-Mouse	1:10000	Hase polyklonal gegen Maus-IgG mit Meerrettichperoxidaseaktivität	GE Healthcare (NA931v)
Anti-Rabbit	1:10000	Ziege polyklonal gegen Hase-IgG mit Meerrettichperoxidaseaktivität	Bio-Rad

2.13.5 Tricin-SDS-Polyacrylamidelektrophores

2xLämmli-Puffer	100 mM Tris pH 6,8, 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau. Lagerung bei 4°C.
SDS-Laufpuffer	3.03g (w/v) Tris, 14.4g (w/v) Glycin, 1g SDS auf 1L Wasser. Lagerung bei RT
Ammoniumpersulfat(APS)-Stammlösung (10%)	10 % (w/v) APS in Wasser gelöst und steril filtriert, bei -20°C gelagert
10%-ige SDS-Lösung	10 g SDS in 100 mL MQ-Wasser lösen. Lagerung bei RT.
Sammelgelpuffer pH 6,8	1M Tris mit HCl auf pH 6.8 einstellen. Lagerung bei RT.
Trenngelpuffer pH 8,8	1M Tris mit HCl auf pH 8.8 einstellen. Lagerung bei RT.

Tabelle 2 Zusammensetzung von Tricin-SDS Trenngel (12%) und Sammelgel (für 4 Gele)

	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O (ml)	10,9	5,6
Sammelgelpuffer (ml)	2	-
Trenngelpuffer (ml)	-	9,6
Polyacrylamid (ml)	2	9,9
10%-ige SDS-Lösung (μ l)	148,5	247,5
(APS)-Stammlösung (μ l)	75,9	125,4
TEMED (μ l)	16,5	13,2

2.13.6 Induktionsmittel für die Proteinexpression

IPTG-Stammlösung (1000-fach) 1 M, 11,9 mg/50 mL H₂O, steril filtriert

2.13.7 Stammlösungen für die Lyse von Zellpellets

Desoxyribonuklease I (Dnase I) 3000 Kunitz/mL DNase I aus Kuh-Pankreas, Typ IV. Zusatz 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM MgSO₄. Lagerung bei -20°C

Ribonuklease A (Rnase A) 500 Kunitz/mL RNase A aus Kuh-Pankreas, Typ I-AS. Zusatz 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM MgSO₄. Lagerung bei -20°C

Protease Inhibitor Cocktail Zwei EDTA-freie *cOmplete™* Protease Inhibitor Tabletten gelöst in 1 mL H₂O; entspricht einer 100x Stammlösung.

2.13.8 Arbeiten mit Proteinen

Lysepuffer bei *E.coli*
(für 45 mL Zellsuspension) 5 mL Puffer A (1-fach), 20 mM β-Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol (5 M), eine Protease Inhibitor Cocktail Tablette, 250 µL DNase, 500 µL RNase, eine Spatelspitze Lysozym, 10% (w/v) Glycerol, 2 mM MgSO₄

Lysepuffer für *HEK 293T* Zellen 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1mM EDTA, 1mM EGTA (pH 8), 1% Triton-X und 0,5% NP-40. Lagerung bei 4°C.

2.13.9 Puffer

Puffer für HisTrap™ FF Säulen

Ni-IDA Stripping-Puffer 500 mM NaCl, 100 mM EDTA, 20 mM Tris (pH 8,0), entgast. Lagerung bei 4°C.

Ni (II)-Lösung 100 mM NiSO₄ in MQ-Wasser gelöst, gefiltert und entgast. Lagerung bei 4°C.

Äquilibrierungspuffer 400 mM NaCl, 100 mM Imidazol, 20 mM Tris (pH 7,8), gefiltert und entgast. Lagerung bei 4°C.

Puffer A 400 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ (pH 7,8), 10 % (w/v) Glycerol, 20 mM β-Mercaptoethanol, gefiltert und entgast. Lagerung bei 4°C.

Puffer B 400 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ (pH 7,8), 10 % (w/v) Glycerol, 20 mM β-Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol, gefiltert und entgast. Lagerung bei 4°C.

Puffer für His Mag Sepharose™ Ni Magnetic Beads

Äquilibrierungs-/ Waschpuffer 20 mM NaH₂PO₄*2 H₂O (pH 7,8), 400 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerol, 25 mM Imidazol. Lagerung bei 4°C.

Elutionspuffer 20 mM NaH₂PO₄*2 H₂O (pH 7,8), 400 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerol, 500 mM Imidazol. Lagerung bei 4°C.

Puffer für die Größenausschlusschromatographie

Gelfiltrationspuffer 25 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KF, 10 % (w/v) Glycerol, 5 mM DTT

Puffer für den HTRF-Assay

HTRF Puffer 25 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KF, 5 % (w/v) Glycerol, mit tagesfrischer Zugabe von 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0,1% (w/v) CHAPS und 5 % (v/v) DMSO

Assaypuffer 25 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM KF, 5 % (w/v) Glycerol, 5 mM DTT

Puffer für Semi-Dry Western Blot

Anodenpuffer I (pH 10,4) 300 mM Tris
20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II (pH 10,4) 25 mM Tris
20 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer (pH 9,4) 25 mM Tris
40 mM ε-Aminocapronsäure
20 % (v/v) Methanol

Blocking-Puffer Variante 1: 5% (w/v) BSA in TBS-T gelöst und bei 4°C gelagert.

Variante 2: 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
gelöst und bei 4°C gelagert.

TBS-T

10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween® 20

Stripping – Puffer (pH 2,2/ HCl)

15 g Glycin
1g SDS
10 ml Tween® 20
Zugeben 1l H₂O

2.14 Software**AzureSpot Analysis software****GraphPad Prism 8****Image Lab Software 3.0.1****MS Office 2010****PyMOL 1.6.0.0.****SnapGene****Sequencing Analysis Software v7****NucleoView NC-3000 Software**

Azure Biosystems

GraphPad Software, San Diego, USA

Bio-Rad Laboratories GmbH

Microsoft GmbH, Germany

Schrödinger, LLC, USA

GSL Biotech, LLC, USA

Applied Biosystems, Thermo Fisher

Scientific

Chemometec

3 Methoden

3.1 Standardmethoden

In dem Sammelwerk von *Sambrook et al.*, 2001 werden molekularbiologische Standardmethode beschrieben. Die aufgelisteten Methoden wurden nach den beschriebenen Protokollen durchgeführt und dem Werk zu entnehmen.

- Gelelektrophoresen (DNA und Protein)
- Dephosphorylierung von DNA-5' Enden mit alkalischer Phosphatase (NEB)
- Phosphorylierung von DNA mittels Polynukleotidkinase (NEB)
- Annealing von Oligonukleotiden
- Fällungsmethoden für Nukleinsäuren
- Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli* (Promega)
- Minilysat Präparation von Plasmid DNA nach der ST-Präparationsmethode
- Ligations-Reaktionen (NEB)
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA)
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (NEB)
- Transformation von *E. coli* mit CaCl₂
- PCR Analysen
- Gelextraktion und Reinigung von DNA (Quiagen)

3.1.1 Gerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten

Durch die gerichtete Mutagenese können Mutationen an ortsspezifischen Stellen in der DNA eingefügt werden. Dabei wird bewusst ein Basentriplet in der Sequenz verändert, der in einer späteren Translation zu einem Aminosäureaustausch führt. Für die Mutagenese wurde eine ‚Q5 Hot Start high fidelity 2x Master Mix‘ DNA Polymerase genutzt von *New England BioLabs*. In diesem Master Mix sind dNTP und Mg²⁺-Ionen enthalten, sowie herrschen optimale Pufferbedingungen, demzufolge mussten nur die Primern und DNA-Matrize zugegeben werden. Der Vorwärts- als auch der Rückwärtsprimer wurden mit SnapGene entworfen und bei *Eurofins* bestellt. Der Ansatz hat ein Totalvolumen von 25 µl:

Tabelle 3 PCR-Ansatz bei einer gerichteten Mutagenese, sowie thermozyklische Konditionen

Komponenten	Ansatz
10 µM Vorwärtsprimer	1,25 µl
10 µM Rückwärtsprimer	1,25 µl
DNA-Matrize	< 2 ng
Master Mix	12,5 µl
Nuklease-freies Wasser	Auf 25 µl aufgefüllt

PCR-Schritte	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98°C	30 s
Annealing	98°C	10 s
25-35 Zyklen	50-72°C	30s
	72°C	30s/kb
Elongation	72°C	2 min
Halt	4°C	∞

Nach der PCR wurde ein *DpnI*-Verdau von 2 h bei 37°C angesetzt, um die methylierte DNA zu entfernen. Anschließend wurde der PCR-Ansatz in *E.coli* DH5 α transformiert. Die Verifizierung der ortspezifischen Mutation fand durch DNA-Sequenzierung statt.

3.1.2 Gibson Assembly

Das Kit wurde von *New England BioLabs (NEB)* erworben, dabei handelt es sich um eine Exonuklease-basierte Methode bei der DNA nahtlos und in der richtigen Reihenfolge zusammengesetzt wird. Die Reaktion wird unter isothermen Bedingungen mit drei enzymatischen Aktivitäten durchgeführt: Eine 5'-Exonuklease, die lange Überhänge erzeugt, eine Polymerase füllt die Lücken der angelagerten Einzelstrangregionen auf und eine DNA-Ligase verschließt die Nicks der angelagerten und gefüllten Lücken. Die Durchführung der Klonierung erfolgte nach vorgegebener Anleitung nach NEB. Nach dem die DNA-Stränge zusammengesetzt wurden, folgte eine Amplifikations-PCR um genügend Ausgangsmaterial für die fortschreitenden Klonierung zu erhalten. Bei Bedarf wurde der DNA-Strang in ein Übergangsvektor pCR Blunt II-TOPO kloniert (Promega).

3.1.3 DNA-Sequenzierung

Der *SeqStudio Genetic Analyzer* von Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) ermöglicht das Verifizieren einer Nukleotidabfolge basierend auf die Sanger Sequenzierung. Die Sequenzierung beruht auf die Kettenabbruchsynthese bei den komplementäre Strängen der vorliegenden DNA produziert werden, dabei jedoch an unterschiedliche Stellen abbricht. Wichtig für diese Methode sind sequenzspezifische Primer, dNTPs, radioaktiv markierte ddNTPs (=Didesoxynucleosid-triphosphate) und eine DNA Polymerase. Für die Amplifizierung der DNA werden 2 μ l Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100, 2.5 μ l (>25 ng) DNA-Matrize und 1.5 μ l (2 μ M) Sequenzierprimer benötigt.

Tabelle 4 Thermozyklisches Programm für die Amplifizierung der DNA in der DNA-Sequenzierung

PCR-Schritte	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96°C	10 s
Annealing	56°C	10 s
35 Zyklen		
Elongation	60°C	4 min
Halt	4°C	∞

Nach der Amplifizierung wurde die DNA mittels eines Ethanol/Natriumacetat-Gemisch gefällt. Der PCR-Ansatz wurde mit 90 µl MQ-Wasser verdünnt und in 250 µl 96% Ethanol mit 15 µl (1 M, pH 5) Natriumacetat zugegeben. Das Gemisch wurde 20 min bei 14800 rpm zentrifugiert. Nach dem Schritt wurde der Überstand verworfen, 200 µl 70 % (v/v) Ethanol/Wasser-Gemisch zugegeben und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet bei 70°C im Heizblock für 2 min trocknen gelassen. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 15 µl Hi-Di™ Formamid gelöst und im SeqStudio Genetic Analyzer gemessen.

3.1.4 Mikrobiologische Methoden

3.1.5 Zellaufschluss von E. coli

Das Zellpellet aus der Proteinexpression wurde bei -80°C gelagert. Für den Zellaufschluss musste dieses zunächst auf Eis aufgetaut werden. Zu dem aufgetauten Zellpellet wurde Lysepuffer (Zusammensetzung siehe 2.13.8) hinzugegeben und auf 50 mL mit milliQ-Wasser aufgefüllt. Die Suspension wurde für 30 min unter ständigem Rühren auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit einem Druck von 100 psi an Invensys APV-1000 homogenizer (APV Systems, Silkeborg, Denmark) (Arbeitskreis Prof. Dr. Stefan Knapp, Goethe Universität) durchgeführt, dabei wurden bei etwa 25 Durchläufen die Zellen mit unter Einfluss von Druck zum Platzen gebracht. Die Suspension wurde für 15 min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert, das Protein wird dabei vom restlichen Zellbestandteil getrennt.

3.1.6 Entsorgung von Mikroorganismen

Bakterienkulturen, sowie mit den Organismen in Kontakt gekommene Lösungen wurden vor der Entsorgung autoklaviert. Tierische Abfälle wie BSA und Antikörper wurden gesammelt und anschließend bei 120°C für mindestens 20 Minuten autoklaviert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Heterologe Proteinexpression in E.coli

Bei der rekombinanten Proteinexpression wurde zunächst das Zielgen in den entsprechenden *E. coli* Vektor T7 Express+pRARE (NEB) transformiert und über Nacht bei 37°C auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum anwachsen gelassen. Mit den transformierten Zellen wurden am nächsten Tag 250 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler mit 180 rpm inkubiert.

Am folgenden Tag wurde 1 L Hauptkultur, ebenfalls mit entsprechendem Antibiotikum (1:1000), mit 50-60 mL der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C im Schüttler mit 160 rpm wachsen gelassen und stetig die Zelldichte spektroskopisch kontrolliert. Bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ fand ein Temperaturwechsel statt. Hierbei wurde die Temperatur auf 20°C sowie die Umdrehungszahl auf 120 rpm herabgesetzt. Bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,8-0,9$ erfolgte die Zugabe von 500 µl 1M IPTG (Final 0.5 mM IPTG), um die Überexpression des Zielgens zu induzieren. Die Expression erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 rpm bei 4°C geerntet. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss (5.2.4). Wenn keine Weiterverarbeitung des Zellpellets erfolgte, wurde das Pellet langfristig bei -80°C gelagert.

3.2.2 Zellfreie Proteinexpression

Für die zellfreie Proteinexpression wurde ein Kit *S30 T7 High-Yield Protein Expression System* von *Promega Corporation* verwendet. Mit diesem Kit, auf Basis von *E.coli*-Extrakt, kann das gewünschte Protein in 1 Stunde bis zu 500 µg/ml aus Plasmidvektoren exprimieren. Die Vektoren sollten einen T7-Promotor und eine Ribosomenbindungsstelle enthalten.

Das Proteinexpressionssystem liefert einen T7 S30 Extrakt, der T7-RNA-Polymerase zur Transkription enthält und dem die OmpT-Endoproteinase- und Lon-Protease-Aktivität fehlt. Alle notwendigen Komponenten, die für die Translation und Transkription benötigt werden, sind in den gebrauchsfertigen Lösungen enthalten. Die Durchführung der Proteinexpression erfolgte nach den Angaben von *Promega Corporation* (*genauere Informationen siehe Technical Manual*). Für die Aufreinigung der zellfreien Synthese (cfs)-Reaktion wurden pro 50 µl 1 µl RNase A (hergestellt nach Anleitung im Handbuch) und 1 µl DNase I (3000 Kunitz/ml in 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM MgSO₄, hergestellt von SigmaAldrich #D5025) hinzugegeben. Nach 30 Minuten bei RT wurde die Reinigung unter Verwendung von His Mag Sepharose™ Ni-Beads (GE Healthcare) mit Puffer und Volumina gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die cfs-Taspase1 wurde schließlich in Elutionspuffer (20 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin, ergänzt mit 500 mM Imidazol, eluiert. Für eine 450 µl cfs-Reaktion wurden 200 µl einer 50%igen Aufschlämmung von Ni-Beads zur Reinigung verwendet, die eine ausreichende Bindungskapazität für etwa 5 mg His-markiertes Protein bereitstellt. Nach der Elution betrug die cfsTaspase1-Konzentration reproduzierbar 600 nM ± 20%. Für die meisten Assays wurde das Protein 1:20 in HTRF-Assaypuffer verdünnt, was zu einer Endkonzentration im Assay von 30 nM cfs-Taspase1 führte.

3.2.3 Metallchelataffinitätschromatographie

3.2.3.1 HisTrap™ FF Säule - Proteinaufreinigung

Variante an dem ÄKTApurifier (von Fraunhofer ITMP):

Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, die mit einem Polyhistidin-Tag ausgestattet sind, wurde über eine Metallchelataffinitätschromatographie aufgereinigt. Die Chromatographie erfolgte bei 4°C an einer ÄKTApurifier FPLC System (GE Healthcare) mit entsprechenden Nickelsäulen *Ni Sepharose 6 Fast Flow resin*. Zunächst fand die Äquilibrierung der Nickelsäule mit Äquilibrierungspuffer statt. In Abhängigkeit des Durchmessers der Säule wird beim Äquilibrieren eine Flussrate von 5 mL/min gewählt. Danach wurde die Säule mit Puffer A umgepuffert, damit anschließend die Zellsuspension aufgetragen werden konnte. Das Protein wurde mit mindestens 150 mL 5%-igem Anteil von Puffer B bei einer Flussrate von 3-5 mL/min gewaschen. Das Wasch-Programm erfolgte solange bis die Baseline bei 280 nm keine Veränderung aufwies. Die Elution des Proteins erfolgte mit Puffer B, hierbei betrug die Flussrate 1 mL/min. Die Fraktionen wurden anhand von Färbung des SDS-Gels untersucht, daraus ergaben sich die Fraktionen, die weiter aufgereinigt werden sollten.

Variante manuell:

Die Chromatographie erfolgte bei 4°C manuell mit einer peristaltischen Pumpe. Zunächst fand die Äquilibrierung der Nickelsäule mit Äquilibrierungspuffer statt. In Abhängigkeit des Durchmessers der Säule wird beim Äquilibrieren eine Flussrate von 30 U/min gewählt. Danach wurde die Säule mit Puffer A umgepuffert, damit anschließend die Zellsuspension aufgetragen

werden konnte. Das Protein wurde mit mindestens 150 mL 5%-igem Anteil von Puffer B bei einer Flussrate von 30 U/min gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit Puffer B. Die Fraktionen wurden anhand von Färbung des SDS-Gels untersucht, daraus ergaben sich die Fraktionen, die weiter aufgereinigt werden sollten.

3.2.3.2 *His Mag Sepharose™ Ni Magnetic Beads*

His Mag Sepharose™ Ni-Beads sind Magnetkügelchen, die für eine effiziente Aufreinigung von Histidin-markiertem Protein in einem kleinen Maßstab erlauben. Histidin-markierte Proteine bilden mit den immobilisierten Nickelionen einen Komplex, durch einen Magneten werden die *Beads* aufgefangen an denen das Protein hängt. Die *Beads* ermöglichen die Reinigung von rekombinanten Proteinen in kleinen Volumina mit einer hohen Kapazität. Die Bindungskapazität beträgt etwa 50 mg Histidin-markiertem Protein/mL. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben von *GE Healthcare Life Sciences (genauere Informationen siehe Instructions)*.

3.2.4 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden entweder mit Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter bei 4°C 5000xg oder Amicon Stirred cell Model 8050 bei 4°C unter Druckeinfluss von 1.5 bar Stickstoffs einkonzentriert. Die passende Membran mit der entsprechenden Porengröße wurde anhand der Proteingröße gewählt. Für alle Proteine wurde die Membran mit einer Porengröße von 10 kDa verwendet.

3.2.5 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte bei 4°C. Die Wahl der Säule für die Gelfiltration hängt zum Großteil von der Größe des Proteinkomplexes ab, jedoch spielen die verschiedenen Harze ebenfalls eine Rolle. Bei kleinen Proteinen (3 kDa - 70 kDa) benutzt man die Superdex75™ mit einem Durchmesser von 10 mm, einer Länge von 300 mm und einem Volumen von 24 mL. Für größere Proteine wird hingegen die Superdex200™ mit einem Durchmesser von 16 mm, einer Länge von 600 mm und einem Volumen von 120 mL (10 kDa - 600 kDa) verwendet. Die Säulen wurden vor der Benutzung mit entgastem milliQ-Wasser gewaschen und anschließend mit dem Assay Puffer äquilibriert. Etwa 5 mL von der konzentrierten Proteinlösung wurden zunächst filtriert und dann auf die Säule injiziert. Die Flussrate betrug je nach Säule 0.7-1.0 mL/min mit einem maximalen Säulendruck von 1 MPa. Die Kontrolle der Elution erfolgte durch Absorptionsspektroskopie bei einer Wellenlänge von 254nm, 280 nm, 320nm und 490nm. Das Eluat wurde in 1.5 mL Fraktionen aufgefangen.

3.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte photometrisch am *NanoDrop 2000c* Spektrometer oder *Nanophotometer P330*. Dabei wurden etwa 500 µL der Probe in einer Küvette bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm gemessen. Die Messung erfolgte in speziellen trUView-Küvetten (Bio-Rad), deren Schichtdicke 1 cm beträgt. Um die Konzentration zu ermitteln, wurde zunächst das Molekulargewicht des Proteins über das Programm *Protparam (Expassy)* ermittelt und anschließend mit dem Extinktionskoeffizient errechnet.

Eine weitere photometrische Methode, die angewendet wurde zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen, ist Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific. Die Methode wurde nach dem beschriebenen Protokoll von Thermo Fisher durchgeführt.

3.2.7 Markierung der SNAP-CS1/CS2-sGFP mit Fluorophoren

Das Proteinkonstrukte SNAP-CS2-sGFP/ SNAP-CS1-sGFP wurden je nach Bedarf mit dem entsprechenden Fluorophor bzw. Cryptat markiert. Für die Versuche im HTRF-Assay wurden die Konstrukte jeweils mit *SNAP-Lumi4 Terbium Cryptate* markiert. Für die visuelle Untersuchung des Assayverlaufs auf Tricin-SDS-Pages wurden die Konstrukte jeweils mit *SNAP-Vista® Green* markiert. Die Fluorophore sind jeweils in DMSO gelöst; 100 µM. Bei der Markierung wurden 20 µL (10 µM) des Fluorophors mit 2 µL (120 µM) vom Konstrukt in 378 µL Assaypuffer zusammengegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das markierte Konstrukt besaß anschließend eine Ausgangskonzentration von ca. 600 nM und war theoretisch zu 80% markiert. SNAP als Kopplungspartner wurde mit einem molaren Überschuss eingesetzt, um den Verbleib von freiem ungekoppeltem Fluorophor oder Cryptat auszuschließen. Dadurch war das Entfernen des freien Labels nicht notwendig.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Tricin-SDS-Polyacrylamidelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE)

Bei der Tricin-SDS-Polyacrylelektrophorese (oder Mini-Protean® TGX™ Precast Gele 4-15 % von BioRad) werden Proteine in einem elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht getrennt. Für die Trennung der Proteine wurden ausschließlich 12- 15%-ige Gele verwendet (s. Abschnitt 2.13.5). Die Vorbereitung der zu analysierenden Proteine erfolgte mittels 2-fachen Ladepuffers (2xLämmli-Puffer), hierbei wird dieser in einem Verhältnis von 2:1 eingesetzt. Die Proben wurden 5-10 min bei 95°C denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 min bei 250 V.

3.3.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit InstantBlue™

InstantBlue® ist eine gebrauchsfertige Coomassie-Proteinfärbung für Polyacrylamidgele. Die Gele wurden für 15 Minuten in die Farblösung gelegt. Bei dieser Farblösung ist kein waschen, fixieren oder entfärben notwendig.

3.3.3 Analyse von Polyacrylamidgelen durch Fluoreszenz

Es gibt viele Möglichkeiten Polyacrylamidgele anzufärben und somit die Auftrennung der Proteine sichtbar zu machen, jedoch ist die Nachweisgrenze stark eingeschränkt. Bei dieser Methode wurde das Protein mit einem Fluorophor markiert, der bei der Denaturierung der Proben bei 95°C nicht denaturiert und gleichzeitig SDS-stabil ist, sodass nach der Gelelektrophorese angeregt werden kann. Das Gel wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm und einer Belichtungszeit von 15 s am *Molecular Imager Chemi DOC™XRS+* (Bio-RAD) gemessen.

3.3.4 Western Blotting

Beim Western Blot können Proteine positiv nachgewiesen, Mengen abgeschätzt und deren Molekulargewicht bestimmt werden. Um Proteinlysate nach Größenverhältnissen aufzutrennen, wurden diese über ein 12- oder 15 %-iges SDS-Gel für 45 min bei 250 V aufgetrennt (s. 2.13.5) oder Gradientengele verwendet Mini-Protean® TGX™ Precast Gele (4-15%).

Der Transfer auf PVDF-Membranen (Low Fluorescence Western Membrane von Abcam) erfolgte mittels des Semi-dry Verfahrens. Anhand des Trans-Blot® TURBO™ von Bio-Rad werden die Proteine mit einem Standardprogramm (25 V, 0.4 A, 30 min für 2 Midi-Gele) auf die Membran übertragen. Das Blocken der Membran erfolgte mit 5 % BSA in TBS-T Puffer für 1 h bei RT, danach wurde die Membran 3-mal mit 0,1 %-TBS-T Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde ein spezifischer Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4°C 20 rpm rotieren gelassen. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut 3-mal mit 0,1 %-TBS-T Puffer gewaschen und mit einem sekundären HRP-konjugierter Antikörper für 1 h bei RT mit 20 rpm rotierend inkubieren gelassen und anschließend erneut 3x mit 0,1% TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels des Clarity™ Western ECL Blotting Substrate Systems von BioRad und die Visualisierung wurde am Molecular Imager Chemi DOC™XRS+ von Bio-Rad durchgeführt.

3.3.5 HTRF-Assay

Der HTRF-Assay wurde an einem Tecan Spark Mikroplattenreader mit Platten vom 384-Well Format (NUNC 264706) durchgeführt. Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Taspase1 wurde ein Fluoreszenz-basierter Assay in meiner Masterarbeit entwickelt. Hierbei nutzt man das FRET-System, bei dem ein Donor bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird, während der Anregung findet eine strahlungslose Energieübertragung auf den Akzeptor statt. Der Akzeptor emittiert wiederum Licht bei einer charakteristischen Wellenlänge. Die FRET-Effizienz hängt im Assay vom Abstand der Fluorophore ab. Werden die Fluorophore durch die Taspase1 gespalten, ist keine Fluoreszenz detektierbar.

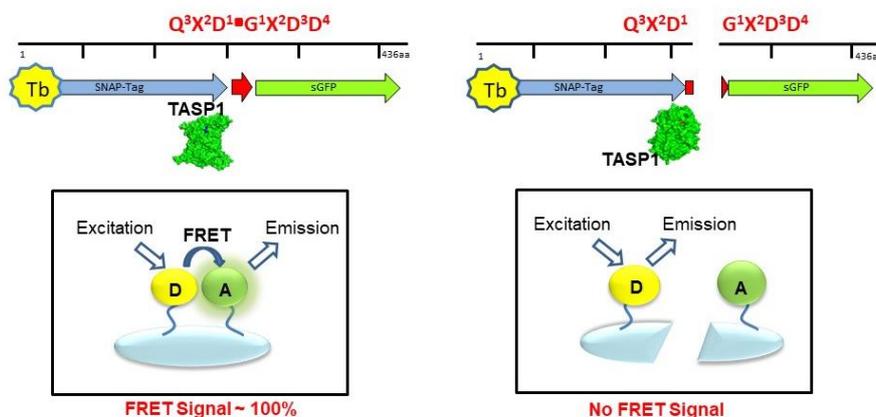


Abbildung 14: FRET-Schema im HTRF Assay

Das FRET-Konstrukt besteht aus einem Akzeptor, sGFP, und einem Donor, das an einem SNAP-tag gekoppelt ist. Bei dem Donor handelt es sich um das Lanthanoid Terbitium Cryptat. Zwischen dem Donor und dem Akzeptor befindet sich die Erkennungssequenz CS2 (Schnittstelle aus dem *MLL*-Gen, die von der Taspase1 prozessiert wird). Die FRET-Effizienz hängt im Assay vom Abstand der Fluorophore ab. Werden die Fluorophore durch die Taspase1 gespalten, ist keine Fluoreszenz detektierbar. Der Donor wird bei 340 nm angeregt und emittiert bei [490, 550, 590, 620] nm, zeitgleich wird der Akzeptor angeregt und emittiert bei 520 nm. Referenz des Terbitium Cryptats wurde bei 620nm gemessen.

Das Substrat besteht aus der Erkennungssequenz CS2 oder CS1 die am N-Terminus das SNAP-tag-Terbium Cryptat gekoppelt ist, während sich am C-Terminus sGFP befindet. Das Terbium fungiert als FRET-Donor, dieser wird bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und emittiert bei 490 nm, 550 nm, 590 nm und 620 nm. Das Emissionsmaximum bei 620 nm, dient in diesem Assay als Referenzmessung. Das sGFP hat die Aufgabe des Akzeptors, dieser wird durch die Emission des Donors angeregt und emittiert bei 520 nm.

Alle Tests wurden in HTRF Puffer durchgeführt (s. Abschnitt 2.13.9). Durch Zugabe von CHAPS und MgCl₂ im HTRF Puffer sollen Protein-Protein Interaktionen unterbunden werden, außerdem haben diese durch Bindung an Proteine oftmals eine stabilisierende Wirkung. Die 5% DMSO sollen die Löslichkeit der getesteten Verbindungen garantieren. Das Probenvolumen betrug 20 µL. Davon waren 10 µL markiertes Konstrukt mit einer Konzentration von 1 nM. Von der Taspase1 wurden 10 µL (Konzentration immer an Versuch angepasst) zum Konstrukt zugegeben. Als Negativkontrolle diente das Konstrukt mit 10 µL HTRF Puffer. Die Mikroplatte wird nach dem Pipettieren bei 1000 rpm für 1 min anzentrifugiert.

Tabelle 5 Messkonditionen für das HTRF Assay

	Akzeptor	Donor
Anregungswellenlänge	340 nm	340 nm
Emissionswellenlänge	520 nm	620 nm
Verzögerungszeit	100 µs	
Integrationszeit	400 µs	
Anzahl der Lichtblitze	100	
Ruhezeit	150 ms	

Bei der Messung am *Tecan Infinite F200 Pro* oder *Tecan Spark* wurde zunächst die Fluoreszenz des Akzeptors und dann als Referenz die Fluoreszenz des Donors gemessen. Das HTRF-Signal wurde mittels folgender Formel berechnet:

Formel 2 – Berechnung des HTRF-Signals

$$HTRF = \frac{\text{Akzeptorfluoreszenz} \cdot 10000}{\text{Donorfluoreszenz}}$$

Der Verstärkungsfaktor ist bei jeder Messung zu beobachten, da dieser Auskunft über das effektiv gemessene Signal gibt. Der Verstärkungsfaktor kontrolliert den *Photomultiplier Tube* bei der Umwandlung von Fluoreszenzlicht in elektrischen Strom. Dieser Faktor beschreibt ebenfalls das Signal zu Rausch-Verhältnis und die Detektion der Fluoreszenz in Z-Position. Werden zum Beispiel Messungen in bestimmten Zeitabständen wiederholt, sollte bei jeder Messung der gleiche Verstärkungsfaktor verwendet werden, um die Vergleichbarkeit hier gewährleisten zu können. Alle Messungen wurden in 3 Replikaten und bei RT durchgeführt. Um eine genaue Trennschärfe bei der Ermittlung des Anteils von geschnittenem und ungeschnittenem Proteinsubstrat machen zu können, wird der z-Faktor ermittelt. Dieser setzt sich aus dem Mittelwert μ und der Standardabweichung σ der Messgröße der Positiv(p)- und Negativkontrolle (n) zusammen.

Formel 3 – Berechnung des z-Faktors

$$z\text{-Faktor} = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Der Idealwert eines z-Faktors beträgt 1, wobei Messungen mit einem Wert ab 0,5 aufwärts als sehr gut bewertet werden.

3.3.6 Screening der FDA- Library (& Dose-Response)

Das HTRF-Screening-Assay soll helfen potenzielle Taspase1-Inhibitoren zu identifizieren. Dazu wurde das *superfolder* GFP über die Erkennungsstelle CS2(QLD|GVDD) mit einem SNAP-Terbium-Cryptat fusioniert (SNAP-Tb-CS2-sGFP). Dieses Screening Assay ermöglicht mittels FRET die Untersuchung der Taspase1-vermittelte Spaltung über sehr lange Zeiträume (mehrere Tage). Beim Testen der möglichen Taspase1-Inhibitoren erfolgte die Messung vom Prinzip her wie oben schon beschrieben. Alle Inhibitoren waren in DMSO gelöst mit einer Konzentration von 10 mM. Die cfs-wtTaspase1 und das Substratkonstrukt wurden jeweils in HTRF Puffer angesetzt.

Tabelle 6 Zusammensetzung für das Screening-Assay (in Triplikaten, mit 112 FDA AM)

	SNAP-Tb-CS2-sGFP	cfs-wtTaspase1	FDA AM (in DMSO)
Konzentration (final)	1 nM	~ 30-60 nM (1:20 des aufgereinig- ten cfs-Proteins)	10 µM
Volumen	10 µl	9.98 µl	0.02 µl (10 mM)

Die effektive Proteinexpression aus dem **S30 T7 High-Yield Protein Expression System** ist laut **Promega** bei einem 50µl – Ansatz etwa ~ 0.5 µg/µl. Um eine komplette 384-Well Platte mit wtTaspase1 á 9.98 µl zu füllen, wurden 9 x 50 µl Ansätze angesetzt.

Tabelle 7 Expressionsansatz von S30 T7 High-Yield Protein Expression System

Komponenten	Volumina
DNA template (700 ng/µl)	12,6 µl
S30 Premix	180 µl
T7 S30 Extract	162 µl
Rifampicin (50µg/ml)	9 µl
Nuclease free Water	86,4 µl

Das Protein wurde an demselben Tag, an dem das Screening stattfand exprimiert. Nach der Proteinexpression wurde ein RNase A/DNase I-Verdau durchgeführt und anschließend über magnetische *Nickelbeads* aufgereinigt (s. 3.2.3.2).

Bevor die eigentliche Reaktion startete, wurde der Inhibitor vorgelegt, die cfs-wtTaspase1 zugegeben und für ca. 10 min bei RT inkubiert. Anschließend gab man das Substrat-konstrukt hinzu und für 24h messen gelassen und dann nochmal nach 96 h. Die 24 h Messung erfolgte

am Tecan SPARK, hier ist es möglich ein Programm zu erstellen bei dem das Gerät stündlich die 384-Well Platte durchmisst. Damit während der Messung die Verdunstung der Lösung vermieden wird, verwendet man während der Messung eine „humidity chamber“. Die Referenzexperimente waren hierbei eine Positiv- sowie Negativkontrolle. Für die Negativkontrolle wurde DMSO vorgelegt und das Teilvolumen der wtTaspase1 mit HTRF Puffer ersetzt. Die Positivkontrolle war die cfs-wtTaspase1 ohne jeglichen Zusatz. Alle Messungen wurden in Triplikaten und bei RT durchgeführt. Als positiver Treffer wurden die ausgewertet die einen signifikanten inhibitorischen Effekt aufwiesen ($\geq 25\%$ ungeschnittenes CS2).

Die *Dosis-Wirkung (Dose Response)* erfolgte auf dieselbe Art wie im *Screening*-Protokoll mit dem Unterschied, dass hier jedoch eine Verdünnungsreihe der möglichen Inhibitoren erstellt wurde. Die positiven Treffer wurden von den entsprechenden Firmen erworben und in DMSO mit einer Konzentration von 100 mM gelöst. Verdünnt wurde mit DMSO in einem Verhältnis von 1:2 und die höchste Konzentration betrug 12.5 μM . Alle Messungen wurden in Triplikaten und bei RT durchgeführt.

3.3.7 Isothermale Titrationskalorimetrie (Affinity - ITC)

ITC-Experimente wurden unter Verwendung eines "Affinity ITC" (TA-Instruments) bei 25°C durchgeführt. Sowohl die wtTaspase1 als auch das CS2-Konstrukt wurde in T7 Express-pRARE exprimiert und über Nickelchelataffinitäts- und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Pufferbedingungen, in denen die Messung stattfand, war 25mM HEPES, 150mM KF, 5 mM DTT optional 1mM TCEP, 5% Glycerin, pH = 7,8 ergänzt mit 5% DMSO, 5 mM MgCl_2 und 0,1% CHAPS. Die Proben wurden vor der Messung für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und anschließend für 30 min entgast.

Von der *E.coli* wtTaspase1 wurden 174 μl (1 μM) in die Zelle platziert und 20 μM von dem CS2-Konstrukt in die Spritze eingefüllt. Gemessen wurde das Zutitrieren von CS2 auf die wtTaspase1 mit/ohne 12.5 μM Closantel sodium. Für die Kontrollversuche wurden jeweils die wtTaspase1 als auch das CS2-Konstrukt gegen den HTRF-Puffer oder 12.5 μM Closantel sodium gemessen. Die Titrations wurden mit 7 Injektion von 0,5 μl , 2 μl , 4 μl , 4x8 μl durchgeführt, dabei wurden Zeitintervalle zwischen den Injektionen von 60 und 120 Sekunden gewählt. Für die Auswertung der Messpunkte erfolgte über das Programm „NanoAnalyze Data Analysis“ (Version 3.10.0 von TA Instruments).

3.3.8 MALDI-TOF

Die Massenspektren wurden vom Arbeitskreis Dr. Julian D. Langer (Max-Planck-Institut für Biophysik) aufgenommen. Gemessen wurde die wtTaspase1 (*E.coli*) alleine (45 μM , MW 45581 Da) und als Kombination wtTaspase1 (45 μM , MW 45581 Da) mit Closantel sodium (450 μM , 686,9 Da).

Zusätzlich wurde auch das CS2-Konstrukt alleine gemessen (45 μM , MW 47539 Da) und ebenfalls als Kombination CS2 (45 μM , MW 47539 Da) mit Closantel sodium (450 μM , 686,9 Da) zusammen.

3.3.9 Kristallisation (Sitting-Drop Methode)

Das exprimierte Protein aus T7 Express+pRARE wurde durch Nickel-Agarose-Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Die Taspase1 wurde auf 20 mg/ml aufkonzentriert. Der Puffer enthielt 20 mM Tris (pH 7,9), 450 mM NaCl, 5 mM DTT und 5% (v/v) Glycerin. Der N-terminale His-Tag wurde nicht für die Kristallisation entfernt.

Um ein Proteinkristall zu erhalten, wurden verschiedene Pufferbedingungen getestet (Standard-Kristallisationspuffer (Qiagen N.V.) wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp zur Verfügung gestellt) bei die Taspase1 auskristallisieren könnte. Bei der Kristallisation wurde die *sitting-drop vapor diffusion* Methode angewendet und die Temperatur betrug 20°C.

Tabelle 8 Getesteten Standardpufferbedingungen auf Kristallisationsplatten (vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp erworben)

<i>Standard Bedingungen</i>	<i>Barcode</i>
JCSG7	CI005680
HCS3	CI005679
SG1	CI005610
HIN3	CI005630
LFS	CI005629

Der Kristallisationsansatz von 200 nl wird für einige Tage und Wochen bei konstanter Temperatur stehen gelassen. Die verschiedenen Ansätze wurden in einer 96-Wellplatte angesetzt, hierbei besteht jeder Ansatz aus einer definierten Menge der Proteinlösung und einer definierten Menge des Präzipitants (Verhältnis [130 nl:70 nl], [100 nl:100 nl] & [70 nl:130 nl]).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurde an Sterilbänken durchgeführt. Das verwendete Medium *DMEM Low Glucose* wurden jeweils mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin und mit 100 U Penicillin/100 µg Streptomycin versetzt und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden bei 37°C; 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % gehalten.

HEK293T-Zellen wurden alle 3 Tage passagiert, um eine maximale Konfluenz von ca. 80 % nicht zu überschreiten. Das alte Medium wurde anhand einer Vakuumpumpe entfernt, anschließend wurden die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 1 ml Accutase pro 10 cm Zellkulturplatte abgelöst und für 7-10 min bei 37°C inkubieren gelassen. Nach der Inkubation werden die Zellen vereinzelt und ca. 200 µL (1:5) auf einer neuen Platte in 10 ml serumhaltigem Medium ausgesät. Nach dem Passagieren sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 20-30 % haben.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Um eine bestimmte Anzahl an Zellen ausbringen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe des Zellzählers TC10 von Bio-Rad quantifiziert. 10 µl der Zellsuspension aus dem Accutase-Schritt wurden mit 10 µl 0,4 %-igen Trypan-Blau-Lösung vermischt und auf einem Messschlitten des Zellzählers gegeben. Gemessen wurde die Gesamtzellzahl der Zellen, sowie die Lebendzellzahl pro Milliliter und der prozentuale Anteil der Lebendzellzahl.

3.4.3 Transfektion mit *Sleeping beauty*

Die Transfektion mit *Sleeping beauty* Plasmiden basiert auf einer stabilen Integration einer (durch ITR „internal tandem repeats“) spezifischen DNA-Sequenz in das Genom einer Zelle mittels einer Transposase. Die Transposition ist ein präziser Prozess, bei dem ein definiertes DNA-Segment aus einem DNA-Molekül herausgeschnitten wird und an eine andere Stelle im selben oder mit einem anderen DNA-Molekül oder Genom ersetzt wird.¹⁷³

Für die Transfektion von HEK293T-Zellen wurden 24 h vorher ca. 4×10^6 mit einer Konfluenz von 70% auf eine 10 cm-Gewebekulturschale mit 10 ml Medium ausgebracht. 1h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Transfektionsansatz bestand aus zwei Komponenten, Lösung A und Lösung B.

Tabelle 9 Transfektionsansatz mit Metafecten

Kulturschale	Lösung A	Lösung B
Ø 10 cm	180 µl PBS 30 µl Metafecten	180 µl PBS 10 µg DNA 0,5 µg SB100 _{xco} Transposase

Lösung B wurde langsam zu Lösung A pipettiert und resuspendiert und für 15 min bei RT inkubieren gelassen. Nach der Inkubation wurde der Ansatz gleichmäßig auf die Zellen verteilt und für 24 h inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und je nach Viabilität der Zellen und Transfektionseffizienz mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert (Puromycin 2 µg/ml; Hygromycin B 300 µg/ml). Die stabile Integration der Plasmide wurde an dem Fluoreszenzmikroskop *Observer Z1* von Carl Zeiss überprüft.

3.4.4 Herstellung des Zelllysats

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Accutase für eine 10 cm Kulturschale bei 37°C ca. 10 min inkubieren gelassen und dann vereinzelt. Nach der Vereinzelnung wurden die Zellen in 1,5 ml- Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstands wurden das Pellet in 500 µl Lysispuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C rotieren gelassen. Anschließend wurde das Lysat für 60 min bei 14000 rpm 4°C zentrifugieren gelassen. Der Überstand (=Lysat) wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß

überführt und bei -20°C eingefroren. Wenn die Lyse nicht direkt erfolgte, wurden die Pellets bei -20°C eingefroren.

3.4.5 Closantel sodium Behandlung

Bevor die Zellen mit Closantel sodium behandelt worden sind, wurde zunächst ein **Zytotoxizitätstest** an den HEK293t durchgeführt, um zu schauen wie die Viabilität der Zellen durch die verschiedenen Konzentrationen von Closantel sodium beeinflusst werden. Getestet wurden 100 µM, 50 µM und 5 µM Closantel sodium und eine DMSO Kontrolle wurde mitgeführt. Zwei unterschiedlich transfizierte Zellen wurden getestet: 1) pITR EYP GFP-CS2-BFP (mock Kontrolle) und 2) pITR EYP GFP-CS2-BFP und pITR TCTH wtTaspase1. Bei dem Vektor pITR EYP handelt es sich um ein *Sleeping Beauty Vektor* der älteren Generation, in diesem Fall wird das Protein kontinuierlich exprimiert und muss nicht zusätzlich induziert werden, während bei dem pITR TCTH die Proteinexpression durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin induziert. 1 ml mit 1×10^5 cells/ml wurden in einer 24 Well Platte ausgebracht und für 24 h erholen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 µl Closantel sodium behandelt (1% auf 1 ml) und für 24h ruhen gelassen. Die Vitalität der Zellen wurde am nächsten Tag am Nucleocounter NC-3000 gemessen und ausgewertet.

Für die Dose Response in den HEK293T Zellen wurden jeweils 10 ml mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 cells/ml pro Versuch in eine 10er-Kulturschale ausgebracht und für 24 h ruhen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Closantel sodium in DMSO (0, 0.5, 1.5, 3, 5 µM) behandelt und für 48 h bei 37 ° C; 5% CO₂ inkubieren gelassen. Zusätzlich wurde die Expression von pITR TCTH wtTaspase1, durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 48 h in das Medium, induziert. Der prozentuale Anteil betrug 1% des Inhibitors auf das Gesamtvolumen von 10 ml. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und über Western Blot die Proteinexpression verifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten zu diesem Thema - Entwickeltes Testsystem

Viele bereits publizierte Forschungsergebnisse bestätigen die Relevanz der proteolytischen Funktion von Taspase1, während der Embryonalentwicklung und -differenzierung, jedoch spielt sie ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Prozessierung der onkogenen *MLL*-Fusionsproteine und ist somit von hoher medizinischer Bedeutung. Die Taspase1 ist ein potenzielles Ziel bei der Behandlung der *MLL*-induzierten Leukämie und auch in vielen soliden Tumoren, da sie hier überexprimiert vorgefunden wurde.^{125,131} Die Inhibierung von Taspase1 erscheint damit als eine aussichtsreiche mögliche Antikrebsstrategie. Dies umso mehr, da in unterschiedlichen Studien gezeigt wurde, dass die Inhibition von Taspase1 voraussichtlich keine schwerwiegenden Nebenwirkungen verursachen würde.^{125,128}

Ziel meiner Masterarbeit war die Entwicklung und Etablierung eines HTRF- Assays gewesen mit dem die proteolytische Spaltung von Zielproteinen durch Taspase1 detektiert werden sollte. Für die Entwicklung des Assay-Systems Methode wurden Substratkonstrukte kloniert, die von Taspase1 prozessiert werden. Diese Substratkonstrukte (s. Abb. 15) wurden entsprechend für die Detektion mittels HTRF (s. Kapitel 1.4) optimiert. Sie enthalten sowohl FRET Donor als auch einen zu diesem passenden FRET Akzeptor innerhalb des gleichen Moleküls. Diese sind zudem durch eine kurze Erkennungssequenz aus dem *MLL*-Protein voneinander getrennt. Die minimale Distanz zwischen FRET Donor und FRET Akzeptor ermöglicht einen sehr effizienten FRET und damit eine optimale Detektion mittels HTRF.

Als FRET Donor diente Terbium-Cryptat, ein Lanthanoid, dass in einen Makrocyclus eingebettet ist. Der N-terminale SNAP-tag des Substratproteins ermöglichte die kovalente Kopplung des Terbium (Tb)-Cryptats. Auf den SNAP-tag folgt jeweils eine der Erkennungssequenzen aus *MLL* (CS1 oder CS2; CS1 = KRSAEGQVDGADDLST, CS2 = DLPKISQLDGVDDGTE), die von der Taspase1 prozessiert werden können. Auf diese folgt am C-terminus der Substratkonstrukte dann *superfolder* GFP, ein grün fluoreszierendes Protein, welches hier als FRET Akzeptor dient. Im HTRF wird nach Anregung des Tb Cryptats Energie über FRET auf das GFP übertragen und dann als spezifische GFP Fluoreszenz detektiert. Da FRET nur dann effizient stattfindet, wenn Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe zueinander vorliegen, kann über die Abnahme der GFP Fluoreszenz die Prozessierung der Substratproteine durch Taspase1 verfolgt werden.

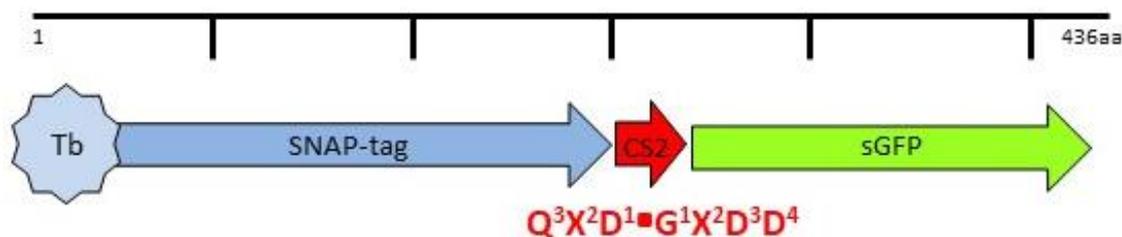


Abbildung 15 Substratkonstrukt Tb-SNAP-CS2-sGFP für die HTRF-Methode

Die Etablierung eines HTRF-basierten Screening-Assays ermöglichte die Beobachtung der Taspase1-vermittelte Spaltung über sehr lange Zeiträume (mehrere Tage). Während der Masterarbeit wurde im Zuge der Etablierung des HTRF Assays dieser sowohl mit Wildtyp Taspase1 (wtTaspase1) als auch mit zwei Taspase1 Mutanten durchgeführt, die im Vergleich

zum wt Enzym jeweils eine verminderte katalytische Aktivität aufweisen.¹⁷⁴ Die Taspase1 mit den Mutationen V142A und L146A hat eine Restaktivität von circa 20%. Dahingegen hat die Mutante mit den eingefügten Mutationen an den Stellen C163E/S291A, die sich in der Nähe des katalytischen Zentrums befinden. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Mutationen an diesen Stellen die Autoprocessing der Taspase1 komplett unterbindet und somit das katalytische Zentrum nicht aktiviert wird.^{146,175}

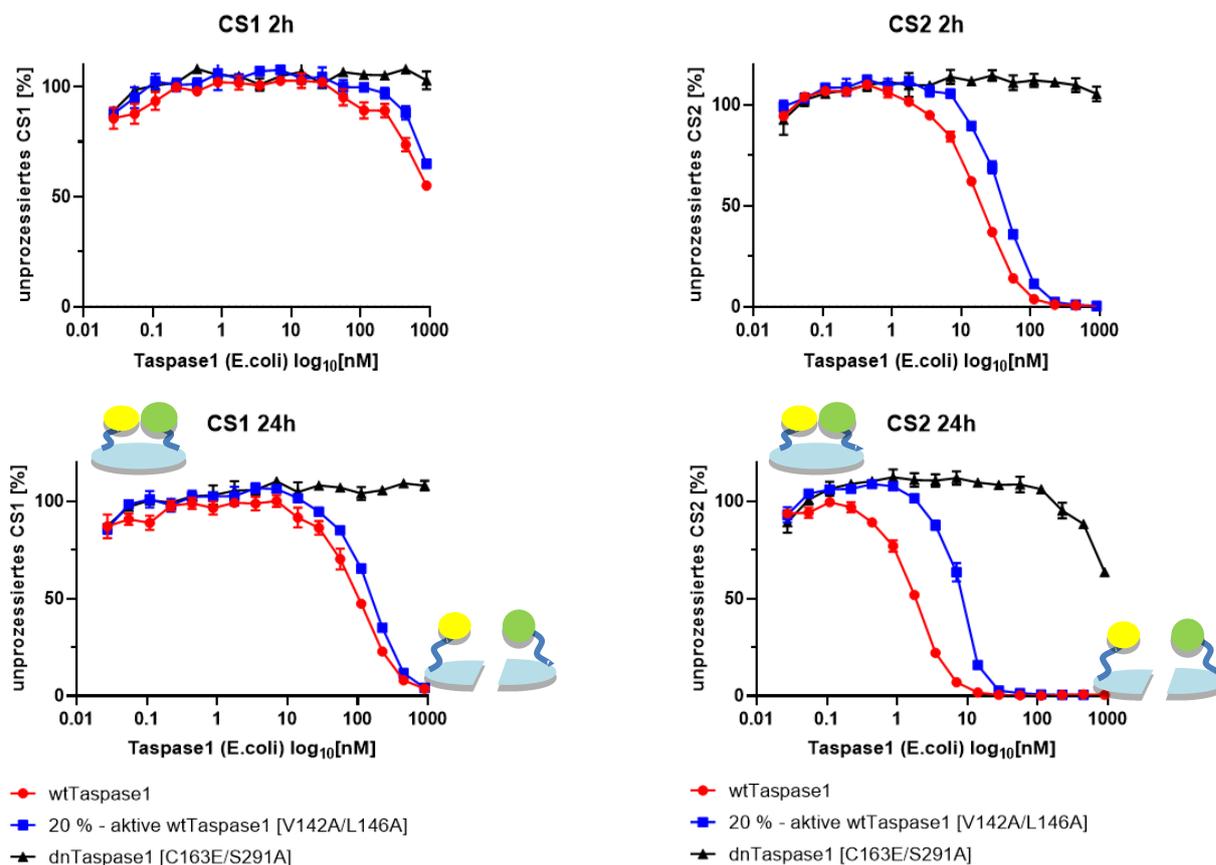


Abbildung 16 Auswertung des etablierten HTRF Screening Assay

In Rot wtTaspase1, in blau die 20%-aktive Mutante [V142A/L146A] und in schwarz die dominant-negative Mutante [C163E/S291A] = keine katalytische Aktivität. Die wtTaspase1 verdaut die CS1 und CS2 Konstrukt weitaus schneller als die Mutanten. wtTaspase1 hat eine höhere Affinität zu CS2 als zu CS1, literaturbekannt⁵⁹. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3.

Bei der Untersuchung der Mutanten oder der wtTaspase1-Aktivität wurde der zeitliche Verlauf der Autokatalyse der Taspase1 analysiert, sowie die Dauer, die die wtTaspase1 und Mutanten benötigen, um CS1 und CS2 zu prozessieren. Bei der Autokatalyse der wtTaspase1 konnte gezeigt werden, dass diese auch über längere Zeit als $(\alpha\beta)_2$ -Heterodimer bestehen bleibt und selber nicht abgebaut wird (s. Abb. 17).

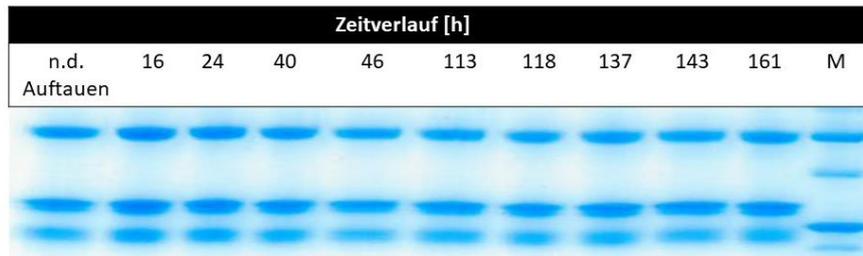


Abbildung 17 Beobachtung des katalytischen Zustands der wtTaspase1 in Abhängigkeit der Zeit

14 % SDS-Gel, Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert. Das Protein wurde nach dem Auftauen bei 4 °C gelagert und daraus immer die Proben entnommen. Das Bandenmuster entspricht der katalytisch aktiven Taspase1 mit den Banden bei 50 kDa, 28 kDa und 22 kDa.

Die Annahme hierbei ist, dass aufgrund des stöchiometrischen Bandenmusters im SDS-Gel (s. Abb. 17, Daten aus der Masterarbeit) es sich um eine Proenzym-Enzym Dimerstruktur handelt, dieses würde bedeuten, dass das Dimer nur ein aktives Zentrum pro Dimer trägt. Unterschiedliche Lagerungstemperaturen der wtTaspase1 zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität der Taspase1 im HTRF Assay.

In den Experimenten bei dem der zeitliche Verlauf der Prozessierung von CS1 und CS2 durch wtTaspase1 (Abbildung 16) gezeigt wurde, konnte eine höhere Affinität für CS2 als für CS1 beobachtet werden.¹⁷⁴ Diese Substratpräferenz berichtete auch bereits *Hsieh et al* 2003.¹⁴³ Der Katalyseverlauf der Mutanten zeigte den erwarteten Ablauf der Prozessierung, die 20%-aktive Taspase1 hydrolysierte sehr viel langsamer als die wtTaspase1, während es bei der dominant-negativen Taspase1 zu keiner Prozessierung von CS1 oder innerhalb von 2 h von CS2 kam. Nach 24 h wurde jedoch im Fall von CS2 auch mit dn-Taspase1 noch eine gewisse Abnahme des Anteils von intaktem Substratprotein detektiert. Dies war jedoch auf die drei höchsten dn-Taspase1 Konzentrationen beschränkt und damit auf Bedingungen in denen das molare Verhältnis von Taspase1 zu CS2 im Bereich von > 200-fach lag. Daraus folgt ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung. Es ist anzunehmen, dass das CS2 Substratprotein auch von der dn-Taspase1 noch immer mit hoher Affinität gebunden wird. Der molare Überschuss an dn-Taspase1 sollte daher dazu geführt haben, dass über die gesamte Inkubationszeit von 24 h sämtliches CS2 nahezu durchgehend Taspase1 gebunden vorlag. Bei vielen Proteasen bindet das Substratprotein in einer Konformation in der die zu spaltende Peptidbindung sterisch stark beansprucht wird. Sollte dies bei Taspase1 und CS2 auch der Fall sein, würde dies erklären, warum ein Teil des CS2 Substratproteins prozessiert wurde, obwohl das eigentliche aktive Zentrum der Taspase1 durch die eingeführten Mutationen inaktiviert wird. Abschließend wurden bereits im Rahmen der Masterarbeit verschiedene Fettsäurederivate über die HTRF Screening Methode untersucht, leider ohne Erfolg.

4.2 Erweiterung der HTRF Screening Assays

In der Masterarbeit wurde der HTRF Screening Assay entwickelt und etabliert. Deshalb wurde in der Doktorarbeit, direkt mit dieser Methode weitergearbeitet, um verschiedene Screening Experimente durchzuführen. Das CS2-Konstrukt (in pET29BH4) als auch die wtTaspase1 (in pET22b (+)) wurden in dem *E.coli* Expressionsstamm NEB T7 Express exprimiert, der zusätzlich mit dem Plasmid pRARE co-transfiziert wurde, zwecks Expression seltener tRNAs. Die Proteine wurden mittels Nickelaffinitäts- und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. In dem

nachfolgenden Screeningverfahren wurde eine *PPI Fragment-Library* (von Enamine, bereitgestellt vom Arbeitskreis Prof. Dr. Stefan Knapp, Goethe-Universität) getestet. Alle HTRF Messungen wurden an dem CS2-Substrat-Konstrukt durchgeführt, da die wtTaspase1 in vorherigen Versuchen gezeigt hat, eine höhere Affinität gegenüber dem CS2 Konstrukt zu haben und zeitlich gesehen das CS2 Konstrukt schneller von der Taspase1 prozessiert wird als das CS1 Konstrukt. Wie schon in Kapitel 4.1 erwähnt, ist das CS2-Substrat über den N-terminalen SNAP-tag mit Terbium Cryptat (Tb) markiert, welches als FRET Donor dient. Die Energieübertragung vom Tb zum FRET Akzeptor sGFP erfolgt durch eine Anregung des Donors, die durch eine Energiequelle (z. B. eine Blitzlampe) bei einer bestimmten Wellenlänge induziert wird. Durch elektrische Dipol-Dipol Wechselwirkung findet ein Energietransfer auf den Akzeptor sGFP statt, der dann anschließend bei einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten am Tecan Infinite F200 Pro (im Arbeitskreis Prof. Dr. Proschak) und am Tecan SPARK (vom Fraunhofer ITMP). Während der Messung wurde das markierte Konstrukt bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt. Der angeregte Donor transferiert via FRET, Energie auf das sGFP und emittierte das Licht bei einer Wellenlänge von 520 nm. Der Abstand zwischen den Fluorophoren liegt in etwa zwischen 20-80 nm, aufgrund der undefinierten Faltung (*random coil*) im Protein kann ein genauerer Wert für den (mittleren) Abstand nicht genannt werden. Als Referenzmessung und zur Bestätigung für die Anwesenheit von Terbium-Cryptat, wurde das Terbium Cryptat bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Bevor die HTRF Screening Messung durchgeführt wurde, inkubierte das Enzym wtTaspase1 mit den PPI Fragmenten etwa 30 min vor, dann wurde das Substrat beigefügt und die Proben für 2h bei RT weiter inkubiert.

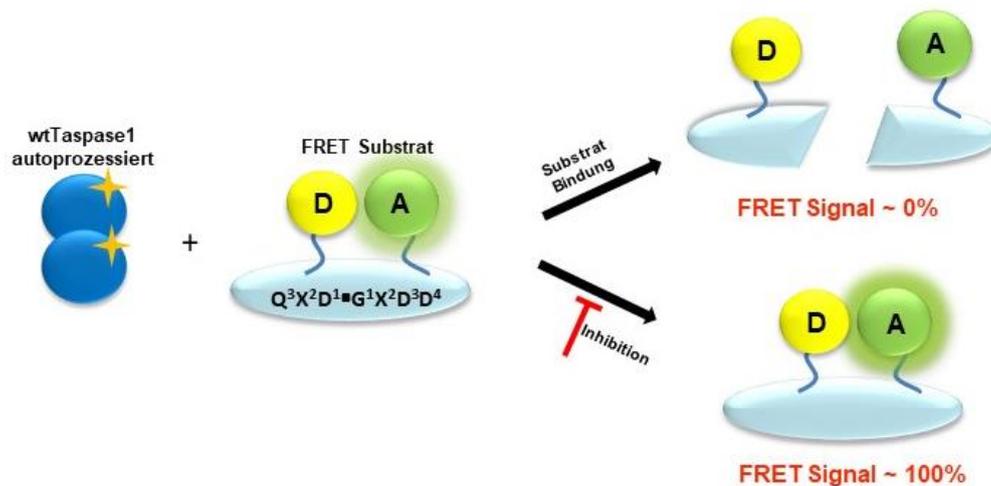


Abbildung 18 Zustandsmöglichkeiten während der HTRF Screening Assays

Bei der Fluoreszenzmessung sind zwei mögliche Zustände zu beobachten: 1. das Substrat wird von der wtTaspase1 geschnitten, dadurch sind Donor und Akzeptor nicht länger aneinandergelockt und somit findet kein FRET mehr statt, die Fluoreszenz des Akzeptors ist nicht mehr detektierbar. Oder 2. die wtTaspase1 wird von einem möglichen Inhibitor daran gehindert das CS2-Konstrukt zu prozessieren und dementsprechend findet weiterhin FRET statt, die Fluoreszenz des Akzeptors ist detektierbar.

Nach 2 h wurde die Fluoreszenz gemessen, dabei gab es zwei mögliche Zustände zu beobachten. Der eine, bei dem das Substrat von der wtTaspase1 vollständig geschnitten wurde, dabei Donor und Akzeptor nicht länger aneinander gekoppelt sind und somit keine Fluoreszenz mehr detektierbar war. Der andere Zustand wäre, bei dem die wtTaspase1 von einem möglichen Inhibitor aus der *PPI Fragment-Library* daran gehindert wird das CS2-Konstrukt zu prozessieren und dementsprechend Fluoreszenz detektierbar wäre. Natürlich gibt es dann noch den Zustand, bei dem der Anteil aus geschnittenem *versus* ungeschnittenem Substrat beliebig variieren kann. Dabei kann zum Beispiel nur ein Teil des Substrates verdaut

werden oder nur teilweise eine Inhibition stattfinden, in diesem Fall würde man dann noch ein Anteil des FRET Signals detektieren können. Die Messungen wurden alle bei RT durchgeführt. Das HTRF-Signal wurde dann mittels der Formel aus Kapitel 3.4.5 berechnet.

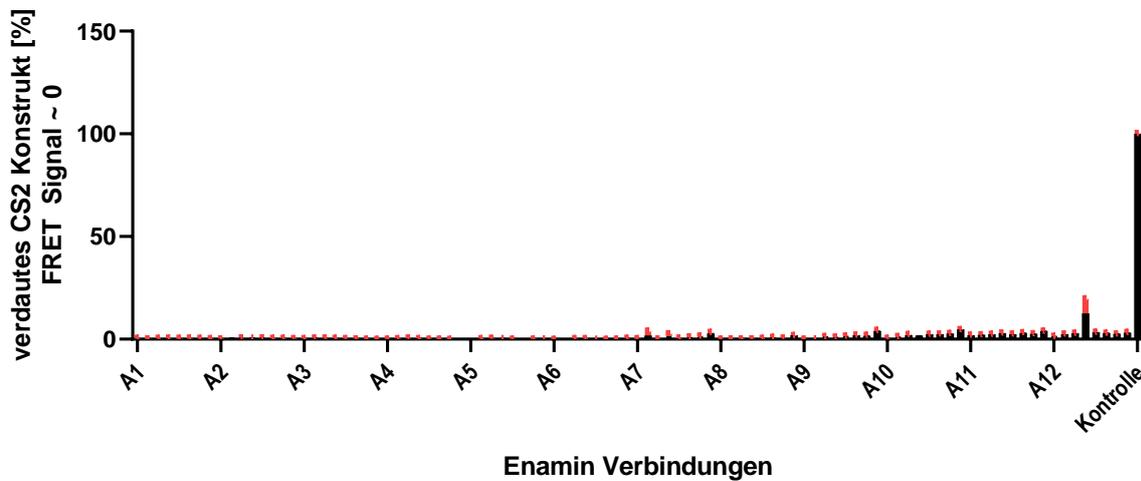


Abbildung 19 Getestete PPI Verbindungen

90 PPI Verbindungen aus einer Enamine Library, die in DMSO gelöst sind mit einer finalen Konzentration von 10 μM im HTRF Assay. Taspase1 wurde mit einer finalen Konzentration von 15 nM eingesetzt, während das CS2 Konstrukt mit einer finalen Konzentration von 1 nM. Der DMSO-Anteil in der Messprobe betrug 5%. Die Messproben wurden in Triplikaten aufgetragen und gemessen. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte des ungeschnittenen CS2 Konstrukts (in schwarz) aus den Triplikaten mit den dazugehörigen Standardabweichungen (in rot) Ergebnis nach 24 h. Bereitgestellt vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp an der Goethe Universität

Wie in Abbildung 19 eindeutig zu erkennen ist, hatte keine der PPI Fragment-Verbindungen einen inhibitorischen Effekt auf wtTaspase1.

In dem HTRF Screening Assay wurde mit der in *E.coli* exprimierten wtTaspase1 gearbeitet, als Information sollte man wissen, dass *E.coli*-exprimierte wtTaspase1 bereits autokatalytisch aktiv ist. Da die Taspase1 bereits autoproteolytisch aktiviert wurde, kann die Auto-Aktivierung nicht mehr inhibiert werden, bzw. ein Inhibitor, der hier gegen wirkt, würde keine Wirkung mehr zeigen. In dem Screening Assay konnte nur die Untersuchung der Inhibition während des Substratbindens oder dem Substratverdau analysiert werden. Es war nicht möglich die wtTaspase1 aus *E.coli* als Monomer bzw. im noch inaktivierten Zustand aufzureinigen. Ab dem Zeitpunkt der Induktion müssen für die Proteinexpression, die Lyse und die anschließende mehrstufige Aufreinigung mindestens 2 Tagen eingerechnet werden. Dadurch vergeht zu viel Zeit in der das exprimierte Proenzym dimerisieren und sich autokatalytisch aktivieren kann.

Schaut man sich den Verlauf der Aufreinigung genauer auf der SDS-PAGE an, ist erkennbar, dass die Taspase1, während der Zelllyse bzw. im Zellpellet noch als Monomer vorliegt, sobald es jedoch aufgereinigt wird, beginnt das Taspase1-Monomer sich zu dimerisieren und autokatalytisch aktiv zu werden, erkennbar am Auftreten der den Untereinheiten zuordbaren Banden in der SDS-PAGE. Sehr gut erkennbar die Monomer-Bande bei 50 kDa und die α - und β -Untereinheit mit 28 kDa und 22 kDa (markiert mit Pfeilen). Nach der Größenausschlusschromatographie war die wtTaspase1 bereits weitestgehend autoprozessiert. Die Banden sind gleichmäßig verteilt und das Bandenmuster lässt vermuten, dass ein Taspase1-Dimer aus nur einem aktiven und einem inaktiven Monomer besteht. Die frühen Fraktionen 1-5 sind im Bereich des *void volumes* und kurz danach, in diesem Bereich eluiert Protein, dass entweder aufgrund von Überladung der Säule keine freien Hohlräume mehr gefunden hat oder aggregiert ist und dadurch größer ist. In den ersten Fraktionen 1-5 könnte es sich auch um Dimere handeln, die während der Aufreinigung wahrscheinlich kaputtgegangen sind oder

falsch gefaltet sind. Der Peak könnte natürlich auch auf ein größeres Protein hinweisen, also eine höhere Oligomerisierung der Taspase1, was den frühen Elutionsverlauf erklären würde.

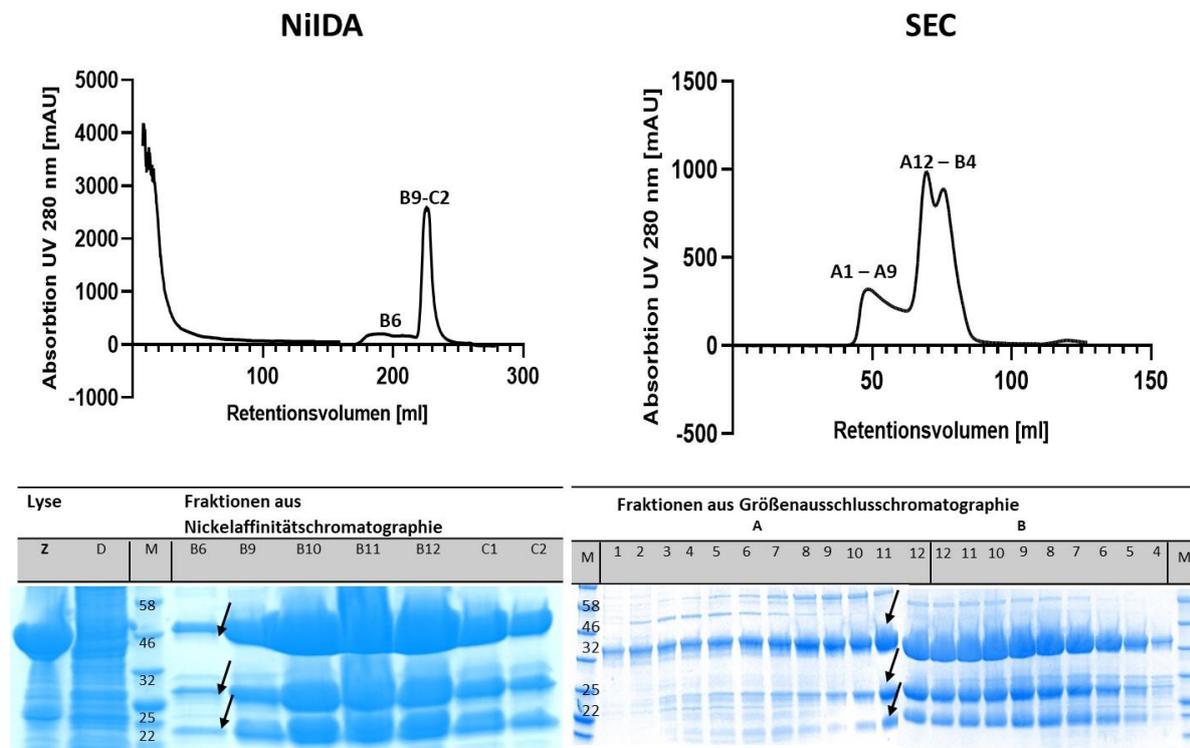


Abbildung 20 Nickelaffinitätschromatographie (NiIDA) und Größenausschlusschromatographie (SEC)

12 % SDS-PAGE von der Zellyse und der Größenausschlusschromatographie Superdex200 HiLoad 16/60, Bandenmuster entspricht dem der Taspase1 (50 kDa Monomer, α - und β -Untereinheit mit 28 kDa und 22 kDa, markierte mit Pfeilen), Z = Zellpellet nach der Lyse, D = Durchfluss vom Auftrag auf die Säule und M = Marker

Das übergeordnete Ziel war es den Assay so auszubauen, dass die Möglichkeit besteht nicht nur Inhibitoren zu identifizieren, die die Bindung und Prozessierung des Substrates inhibieren, sondern auch solche Inhibitoren, die die wtTaspase1 an der Dimerisierung und/oder Autoaktivierung hindern. Dazu war es zwingend notwendig, dass die wtTaspase1 bei Zugabe der Inhibitoren noch als Proenzym vorlag.

Deshalb wurde ein System benötigt mit dem die Taspase1 als Proenzym exprimiert und nach einer zügigen Aufreinigung auch als noch inaktives Proenzym erhalten werden konnte. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen Proenzym und aktivierter Taspase1 diente hier wiederum das charakteristische Bandenmuster in der SDS PAGE, in welcher das Proenzym als Monomer von circa 50 kDa erscheint.

Das Protokoll, das verwendet wurde um die Monomere wtTaspase1 zu exprimieren, nutzte das *E.coli* extraktbasiertes zellfreie Expressionssystem von Promega namens *S30 T7 High-Yield Protein Expression System*.¹⁷⁶ Das System vereinfacht die gekoppelte Transkription und Translation auf Basis von DNA-Sequenzen, die einen T7-Promotor enthalten müssen. Das mitgelieferte Extrakt beinhaltet die T7-RNA-Polymerase für die Transkription und alle notwendigen Komponenten wie zelluläres Lysat, Aminosäuren, dNTPs, tRNA, ein ATP-regenerierendes System, IPTG und Salze, die benötigt wurden um das System zu

regenerieren.¹⁷⁶ Das zellfreie System (cfs) ermöglichte die Expression des gewünschten Proteins innerhalb einer Stunde und die direkte Weiterverarbeitung des Proteins.

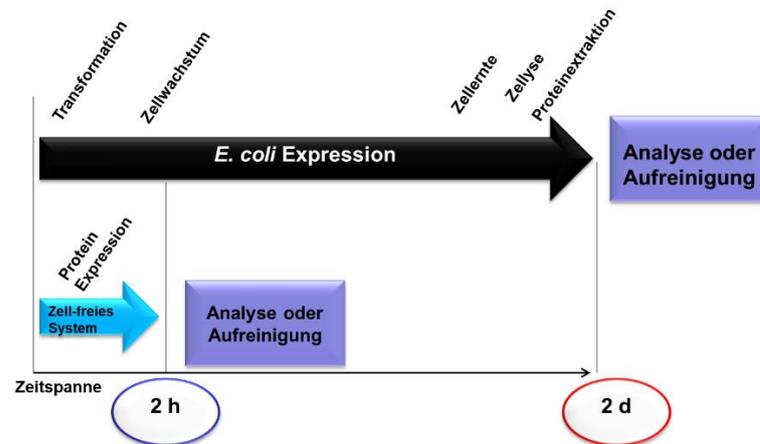


Abbildung 21 Zeitspanne einer rekombinanten Proteinexpression im Vergleich zu dem zellfrei basierendem System

In Abbildung 21 ist sehr schön verdeutlicht wie der zeitliche Ablauf einer rekombinanten Proteinexpression vonstatten läuft. Bis das rekombinant exprimierte Protein aufgereinigt wurde, vergingen im Durchschnitt 3-4 Tage. In dieser Zeit hat die wtTaspase1 sich bereits auto-proteolytisch aktiviert und zeigt in der SDS-PAGE die typischen Bandenmuster der aktivierten wtTaspase1 (s. Abbildung 20). Demgegenüber erlaubt der zeitliche Ablauf bei Verwendung des zellfreien Expressions-Systems die Expression des Proteins innerhalb von einer Stunde durchzuführen, gefolgt von einer ebenfalls deutlich schnelleren Aufreinigung u.a. durch Wegfall der Lyse. Circa 3 h nach Start der zellfreien Expression konnte die cfs-Taspase1 dadurch bereits im *HTRF Screening Assay* eingesetzt werden.

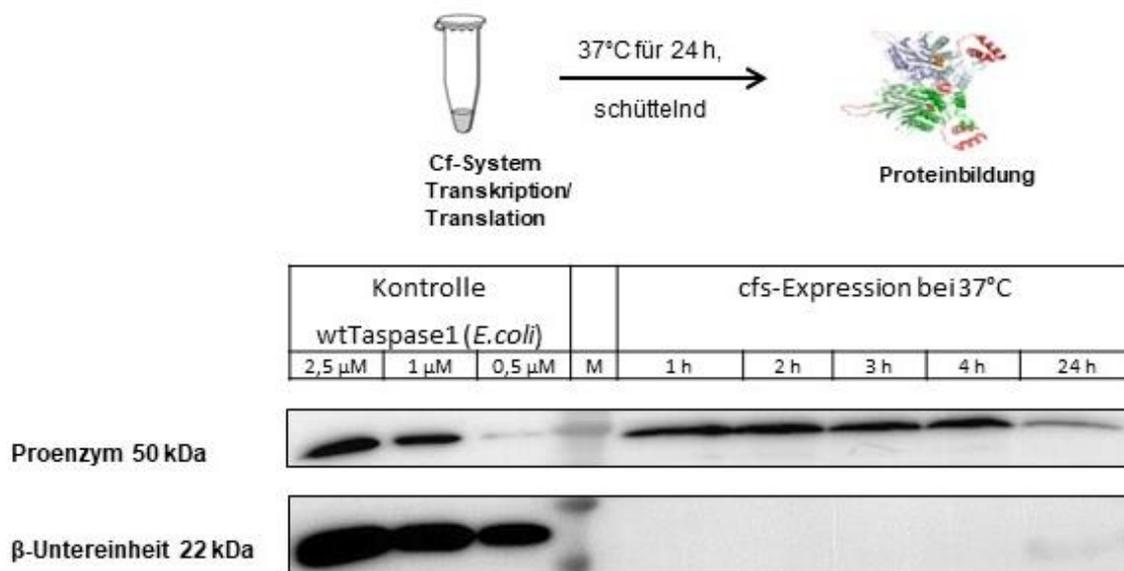


Abbildung 22 Western Blot der Proteinexpression durch das zellfrei basierte System

Western Blot: Kontrolle wtTaspase1 die in *E.coli* exprimiert wurde; typisches Bandenmuster (50 kDa, 28 kDa und 22 kDa); 28 kDa nicht erkennbar, da die α -Untereinheiten keinen His-tag trägt. Die wtTaspase1 in pET22b(+) Vektor wurde im cf-System exprimiert. Erst nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die Bande bei 22 kDa sichtbar, was darauf hinweist, dass wtTaspase1 nach der Expression im cf-System zunächst exklusiv als Monomer und damit als Proenzym vorliegt. Innerhalb von 24 h lässt der Blot erahnen, dass die Autokatalyse der wtTaspase1 begonnen hat und als aktiviertes Enzym vorliegt. Verwendeter Antikörper α -His-Tag Maus monoklonal IgG1 (Einsatz 1:1000).

Im Western Blot (WB) wurde die in *E.coli*-exprimierte wtTaspase1 als Kontrolle genommen, um einen direkten Vergleich zu haben, ob das richtige Protein im cf-System exprimiert wurde. Die Kontrolle mit der *E.coli*-exprimierten wtTaspase1 zeigte im WB nicht ihr typisches Bandenmuster (50 kDa, 28 kDa und 22 kDa). Da die α -Untereinheiten (28 kDa) keinen His-tag trägt, der Antikörper jedoch gegen His-tag bindet, ist hier dementsprechend im Blot auch nur die β -Untereinheiten sichtbar. Die wtTaspase1 in pET22b(+) Vektor wurde im cf-System für 24 h bei 37°C exprimiert und stündlich eine Probe entnommen. Im Blot ist eine Bande auf der Höhe von 50 kDa zu sehen, die Bande weist daraufhin, dass wtTaspase1 hier als Monomer bzw. Proenzym vorliegt, da keine weiteren Unterbanden zu sehen sind. Nach 24 h lässt der Blot erahnen, dass die Autokatalyse der wtTaspase1 begonnen hatte, da hier die 50 kDa Bande an Intensität abgenommen hat im Vergleich zu den Banden davor und zudem ist eine leichte Bande auf der Ebene der β -Untereinheit zu erkennen.

Da durch den Western Blot bestätigt wurde, dass die wtTaspase1 als Monomer im cf-System exprimiert wurde, ging es nun um die Integration des Systems in das HTRF Screening Assay. Dabei wurde zunächst getestet, ob das Screening Assay zusammen mit dem Reaktionsmix aus dem Promega Kit¹⁷⁶ kompatibel für das HTRF System war und ohne eine Aufreinigung des Proteins im Screening Assay verwendet werden könnte. Die wtTaspase1 wurde dazu zunächst im cf-System exprimiert und anschließend ohne weitere Verarbeitung direkt im HTRF Screening Assay eingesetzt und entsprechend gegen konstant 1 nM CS2 Substrat titriert.

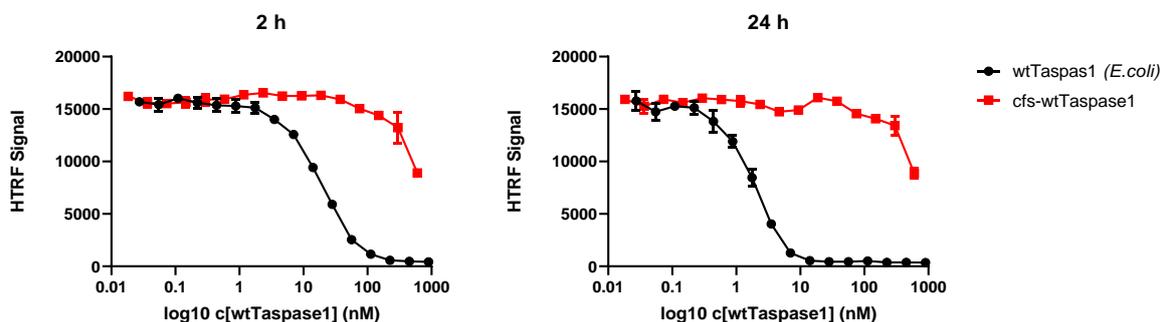


Abbildung 23 Integration des cf-System in das HTRF Screening Assay

Kontrolle in Schwarz wtTaspase1 (in *E.coli* exprimiert) als Titrationsreihe gemessen mit einer Höchstkonzentration von 900 nM < danach 1:2 verdünnt, in Rot wtTaspase1 in cf-System exprimiert mit einer Höchstkonzentration von 600 nM < danach 1:2 verdünnt. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3. Cfs-wtTaspase1 weitaus langsamer als wtTaspase1 (*E.coli*).

Im Abbildung 23 ist in Schwarz die Kurve für die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 dargestellt als Kontrolle und in Rot, die Kurve für die cfs-wtTaspase1. Ziemlich gut zu erkennen ist, dass die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 das CS2 Konstrukt weitaus schneller prozessierte als die cfs-wtTaspase1. Die cfs-wtTaspase1 erweckte den Anschein nach 24 h ins Stocken zu geraten bzw. verbraucht zu sein, was einige Fragen aufkommen ließ, wie: Wird genug Protein exprimiert? Wird es richtig translatiert und transkribiert, sodass die Autoprozessierung stattfinden kann? Ist vielleicht im cf-System ein Inhaltsstoff enthalten, der die wtTaspase1 daran hindert zu autoprozessieren bzw. das Substrat zu prozessieren? Um einige Punkte ausschließen zu können, wurde die cfs-wtTaspase1 aufgereinigt. Nach dem cf-System wurde zunächst ein DNase I und RNase A Verdau-Schritt eingeführt, damit falls bei der wtTaspase1 einige DNA-Erkennungsmotive existieren, diese nicht miteinander interagieren könnten, zudem könnten schon Nukleinsäuren durch *Molecular crowding* stören. Als *Molecular crowding* werden

Veränderungen in der Konformation, dem Zustand oder Eigenschaften eines Proteins oder Protein-Protein Wechselwirkungen bezeichnet, die durch Interaktion zwischen Makromolekülen aus näherer Umgebung mit Proteinen verursacht werden z.B. durch verringerter Diffusionsrate. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte über *His Mag Sepharose™ Ni-Beads*, da die wtTaspase1 einen C-terminalen His-tag trägt. Histidin-markierte Proteine bilden mit den immobilisierten Nickelionen einen Komplex, durch einen Magneten werden die *Beads* an denen das Protein hängt (temporär) immobilisiert, sodass das freie Puffervolumen verlustfrei abgenommen werden kann. Die *Beads* haben eine hohe Kapazität und ermöglichten die Reinigung von rekombinanten Proteinen in kleinen Volumina. Nach der die Metallaffinitätschromatographie erfolgte eine Dialyse zum Salzaustausch und zwecks Reduktion des Imidazols.

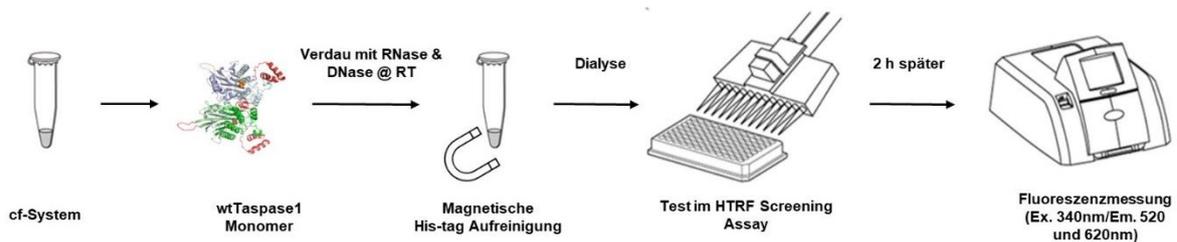


Abbildung 24 Arbeitsschritte mit dem integrierten zell-frei basierten System

Arbeitsschritte: Protein wird im cf-System exprimiert für 1,5h bei 37°C schüttelnd, danach wird ein DNase I und RNase A Verdau für 30 min bei RT durchgeführt, anschließend folgt eine magnetische His-tag Aufreinigung und Dialyse gegen den HTRF Puffer. Die Reaktion wird in einer 384-Well Platte angesetzt und nach 2 h bei RT die Fluoreszenz detektiert. Bilder wurden aus den Technical Manuals^{176,177} von Promega GmbH entnommen und weiterverarbeitet.

Nach der Dialyse wurde das exprimierte Protein zusammen mit dem CS2-Konstrukt im HTRF Screening Assay getestet. In Abbildung 25 sind die Messungen nach 2 h, 24 h und 96h gezeigt. Diese zeigen sehr deutlich die schnelle Prozessierung des CS2-Konstrukts durch die in *E.coli*-produzierte wtTaspase1. Nach 2 h hat die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 (in schwarz) in hohen Konzentrationen das Konstrukt bereits vollständig verdaut, während die cfs-wtTaspase1 (in rot) das Konstrukt weit langsamer verdaut. Faktisch passt der Kurvenverlauf sehr gut zu dem WB (s. Abb. 25). Im WB wurde die cfs-exprimierte wtTaspase1 noch als Proenzym detektiert, was dafür spricht, dass die cfs-wtTaspase1 noch nicht auto-aktiviert wurde. Diese nicht Aktivierung der cfs-wtTaspase1 ist HTRF Assay gut zu beobachten. Hierbei ist der Kurvenlauf zu Beginn bei 2h leicht absinkend, was für die unvollständige Reifung der cfs-wtTaspase1 spricht und dementsprechend es zu keiner Substratprozessierung kommt. Nach 24 h und 96 h ist dem Kurvenverlauf deutlich zu entnehmen, dass das CS2 Substrat von der cfs-wtTaspase1 verdaut wurde und die Reifung des Enzyms im vollsten Gange ist. Der Test verdeutlicht, dass bei gleicher Proteinkonzentration die *E.coli*-produzierten wtTaspase1 ein deutlicheren Zeitversatz in der Prozessierung des Substrats hinlegt als die cfs-wtTaspase1. Die cfs-wtTaspase1 muss zuvor noch die autokatalytische Aktivierung absolvieren.

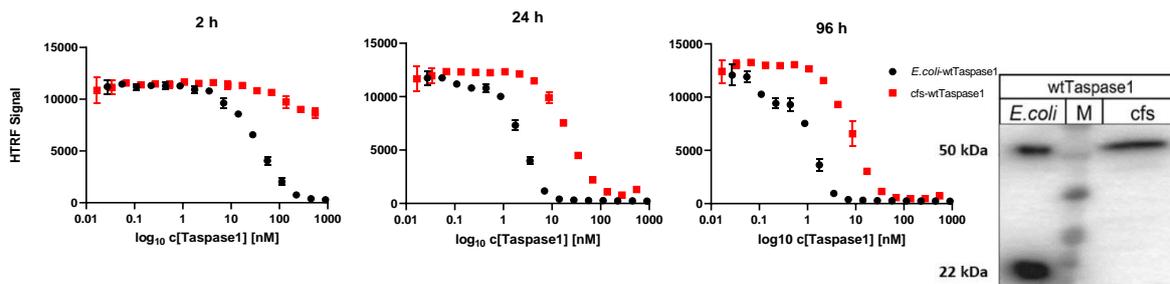


Abbildung 25 Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivität der cfs-wtTaspase1 im Vergleich zu der *E.coli*-produzierten wtTaspase1 im HTRF Screening Assay

E.coli-wtTaspase1 (in schwarz) hat nach 2 h bereits in hohen Konzentrationen das Konstrukt vollständig verdaut, während die cfs-wtTaspase1 (in rot) weitaus langsamer schneidet, was dafür spricht, dass die cfs-wtTaspase1 erst noch die Autokatalyse durchlaufen muss, um dann das CS2 Konstrukt prozessieren zu können. Erst nach 24 h hat die cfs-wtTaspase1 in hohen Konzentrationen das Konstrukt vollständig geschnitten. Nach 96 h liegt bei 30 nM cfs-wtTaspase1 der Großteil des CS2 Konstrukts geschnitten vor. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3. Das Proenzym der cfs-wtTaspase1 wurde per Western Blot verifiziert. Verwendeter Antikörper α -His-Tag Maus monoklonal IgG1 (Einsatz 1:1000), deshalb nicht das typische Bandenmuster sichtbar, sondern nur das Monomer 50 kDa und die β -Untereinheit mit 22 kDa.

Nach 24 h hatte die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 (in schwarz) bereits das Konstrukt, das mit 1 nM eingesetzt wurde, in einem Verhältnis von 1:10 vollständig verdaut, während die cfs-wtTaspase1 (in rot) das Konstrukt erst bei einem Verhältnis von 1:100 vollständig geschnitten hatte. Die cfs-wtTaspase1 war um ein 10-faches langsamer. Dieser Zeitversatz war im Vergleich zu Inkubations- und Messzeiten groß und bot damit eine optimale Voraussetzung zum Screenen nach Inhibitoren, die die Auto-Aktivierung der Taspase1 inhibieren. Nach 96 h hatte die cfs-wtTaspase1 das Konstrukt in einem Verhältnis von 1:30 verdaut, wohingegen die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 das Konstrukt bereits im Verhältnis von 1:4 vollständig geschnitten hat.

Ein Nachteil hatte die zellfrei basierte Expression jedoch, die erhaltenen Proteinmengen aus der Expression waren, um ein Screening durchzuführen, viel zu gering bzw. die Darstellung hinreichender Mengen durch einen hohen Verbrauch entsprechend sehr kostenintensiv. Die Proteinkonzentration nach der zellfreien Expression befanden sich im Bereich von 1-3 mikromolar bei 50 μ l Elutionsvolumen nach der Aufreinigung; leider nicht genug, um aus einem 50 μ l Expressionsansatz nach entsprechendem Verdünnen den Screen auf einer ganzen 384 Well Platte fahren zu können. Eine höhere Ausbeute nach zellfreier Expression war daher wünschenswert. Um die Ausbeute zu erhöhen war nun die Idee ein Plasmid mit codon-optimierter wtTaspase1 CDS (engl. coding sequence) im cf-System zu nutzen.

4.3 Codon-optimierte Taspase1

Um die Proteinexpression zu erhöhen, wurde bei *Thermo Fisher GeneArt Synthesis* eine codon-optimierte Taspase1 (co-Taspase1) CDS mit *XhoI*- und *NdeI*-Restriktionsschnittstellen bestellt. Eine Codon-Optimierung kann die Proteinexpression erhöhen, indem die Codon-Nutzung des Gens verändert wird. Da 20 Aminosäuren von 61 Codons codiert werden, ist es möglich einzelne Codons zu verändern. Methionin (Met) und Tryptophan (Trp) werden hierbei jeweils nur von einem einzigen Codon codiert, während alle anderen Aminosäuren von mehreren Codons spezifiziert werden. Aufgrund dieser Degeneration des genetischen Codes ist es möglich, dass mRNA-Sequenzen mit unterschiedlichen synonymen Codon-Zusammensetzungen für dasselbe Polypeptid kodieren.¹⁷⁸ Jeder Organismus verwendet unterschiedliche Codonverwendungen, dies hat zur Folge, dass selten verwendete Codons die Translation bremsen können, während häufig genutzte Codons wiederum die Translation

beschleunigen können. Der Codon-Gebrauch eines jeden Organismus ist meist an die tRNA-Verfügbarkeit der Zelle angepasst, dementsprechend ist Translationseffizienz eines Gens an die Verfügbarkeit der tRNAs gebunden. Wird jedoch die Nucleotidsequenz an die Verfügbarkeit der komplementären tRNAs angepasst, kann die Translationseffizienz nachweislich gesteigert werden. Eine Codonoptimierung kann soweit in das Geschehen eingreifen, dass resultierende suboptimale RNA-Sequenzen beseitigt werden können, beispielsweise kann dadurch die Ausbildung von RNA Hairpins unterbunden werden.

Für diese Arbeit wurde zunächst die synthetisierte DNA-Sequenz in den Vektor pET22b(+) kloniert. Dazu wurde die synthetisierte DNA-Sequenz zunächst per PCR amplifiziert. Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt in ein Übergangsvektor *pGEM-T*[®] Vektor¹⁷⁹ von *Promega GmbH* kloniert, um die Effizienz der weiteren Klonierung zu erhöhen. Die Klonierung wurde durch ein Agarosegel und einer anschließenden Sanger-Sequenzierung bestätigt. Der pGEM-T Vektor mit der coTaspase1 Sequenz sowie dem Zielvektor pET22b(+) wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NdeI* verdaut. Nach dem Verdau wurden die Fragmente mit einem 1% Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und geluliert. Zuletzt wurde mit den verdautem Vektor-Rückgrad pET22b(+) (~5000 bp) und dem Fragment coTaspase1 (~1200 bp) eine T4-Ligation über Nacht bei 4°C angesetzt und am nächsten Tag in den Bakterienstamm *DH5α* transformiert. Die angewachsenen Kolonien wurden per Agarose-Gelelektrophorese und Sanger-Sequenzierung analysiert und bestätigt.

Nach Verifizierung des klonierten Plasmids pET22b(+) mit coTaspase1 wurde die coTaspase1 direkt im zellfrei basierten System exprimiert, gleichzeitig wurde auch die wtTaspase1 exprimiert, um den direkten Vergleich zu haben. Die Arbeitsschritte waren dieselben wie auch schon in Kapitel 4.2 Abbildung 24 beschrieben. Nach der Expression der coTaspase1 und der wtTaspase1 im zellfreien System war nach der Messung (s. Abbildung 26) im HTRF Screening Assay ziemlich deutlich, dass die coTaspase1 offensichtlich schneller autokatalytisch aktiviert wurde als die cfs-wtTaspase1. Um die exprimierte Proteinkonzentration zu ermitteln wurde ein BCA durchgeführt. BCA, Bicinchoninsäure, bildet mit den zweiwertigen Kupferionen in Lösung einen grünlichen Komplex, wird die Bicinchoninsäure durch Peptidbindungen verdrängt, werden die Kupferionen zu einem einwertigen reduziert und der Farbkomplex erscheint blau-violett. Mit dem BCA-Assay wurde für die cfs-coTaspase1 eine Konzentration von 4,6 µM ermittelt, während die cfs-wtTaspase1 nur eine Konzentration von 2,2 µM aufwies. Die Ausbeute nach Expression im cf-System auf Basis der codon-optimierten wtTaspase1 CDS war demnach etwa 2-fach höher.

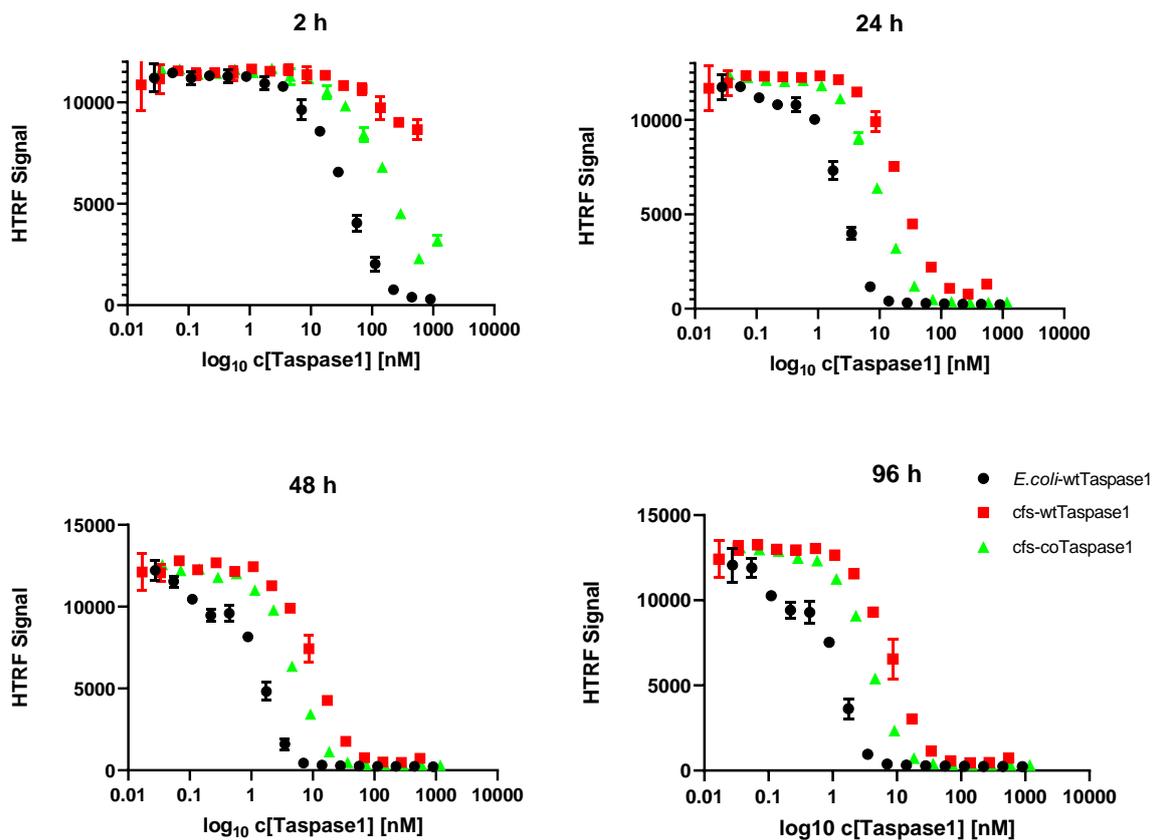


Abbildung 26 HTRF Screening Assay mit coTaspase1, cfs-wtTaspase1 und *E.coli*-wtTaspase1 bei unterschiedlichen Zeitpunkten

E.coli-wtTaspase1 (in schwarz) hat nach 2h bereits in hohen Konzentrationen das Konstrukt vollständig verdaut, während die *cfs*-wtTaspase1 (in rot) weitaus langsamer schneidet, was dafür spricht, dass die *cfs*-wtTaspase1 erst noch die Autokatalyse durchgehen muss, während die coTaspase1 (in grün) deutlich schneller als die *cfs*-wtTaspase1 aber viel langsamer als die *E.coli*-wtTaspase1 (in schwarz). Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3. Finale Konzentration im HTRF Assay von dem *cfs*-Protein ist 1:4.

Um den Unterschied auch auf dem Western Blot zu sehen, wurden von jedem Arbeitsschritt Proben entnommen, sowohl von der coTaspase1 als auch von der *cfs*-wtTaspase1. Ganz klar ist in dem Western Blot (Abbildung 27) zu erkennen, dass sowohl die *cfs*-wtTaspase1 also auch die coTaspase1 als Proenzym exprimiert wurden. Beim genaueren Betrachten des WBs ist eine leichte Bande bei der coTaspase1 auf der Höhe der 22 kDa Markerbande zu sehen. Diese schwache Bande liegt auf derselben Höhe wie die β -Untereinheit bei der *E.coli*-produzierten wtTaspase1. Die 22 kDa Bande ist ein Indiz dafür, dass die coTaspase1 bereits während der Expression dimerisiert und autoprozessiert wurde und dies würde erklären, wieso die coTaspase1 im HTRF Screening Assay das Konstrukt schneller prozessierte als die *cfs*-wtTaspase1.

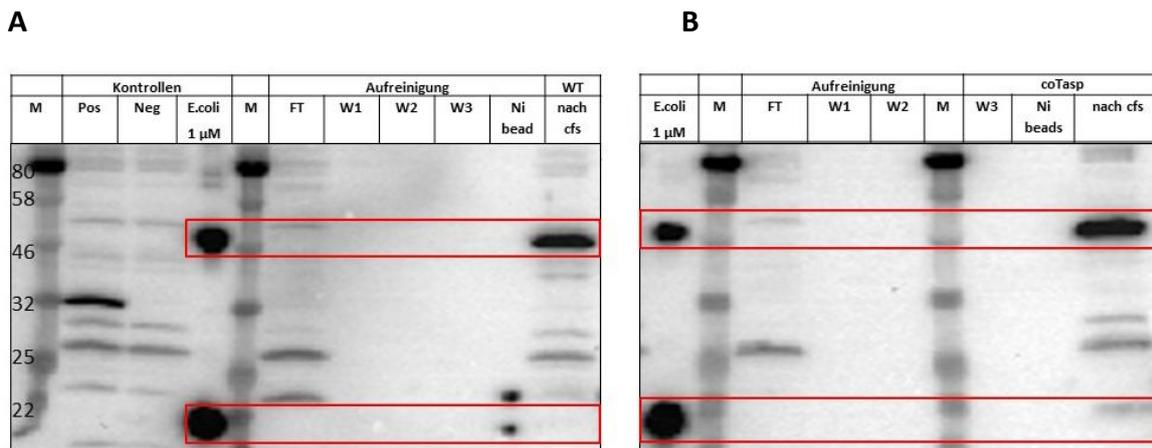


Abbildung 27 Western Blot von coTaspase1 und wtTaspase1 aus dem cf-System

Vergleich zwischen der wtTaspase1 (A) und der coTaspase1 (B) in zellfrei basierten System. Beide erscheinen hauptsächlich als als Monomere 50 kDa und liegen demnach nach der Expression als Proenzym vor. Bei der coTaspase1, erscheint bereits eine Bande bei 22 kDa, was für die Autokatalyse der Taspase1 spricht. Als Kontrolle: Pos. S30 T7 Kontroll DNA Renilla Luciferase 32 kDa (im Kit enthalten), Neg. zell-freie System statt DNA wurde Wasser zugegeben und als letzt Kontrolle: die E.coli-produzierte wtTaspase1. Zusätzlich im Blot zu sehen sind die Aufreinigungsschritte, zur Kontrolle das kein Protein verloren geht. FT= Flowthrough/Überstand, W1-3 = Waschschritte , M = Marker. Verwendeter Antikörper α-His-Tag Maus monoklonal IgG1 (Einsatz 1:1000), deshalb nicht das typische Bandenmuster abgebildet, sondern nur das Monomer 50 kDa und die β-Untereinheit mit 22 kDa.

Von der coTaspase1 wurde ein zeitlich kontrollierte Inkubation des Expressionsansatzes durchgeführt, um zu schauen ab welchem Zeitpunkt die coTaspase1 autoprozessiert. Die Proben wurden während der Expression bei 37°C und 1400 rpm an den Zeitpunkten 90 min, 3 h, 4 h, 5 h und 24 h entnommen.

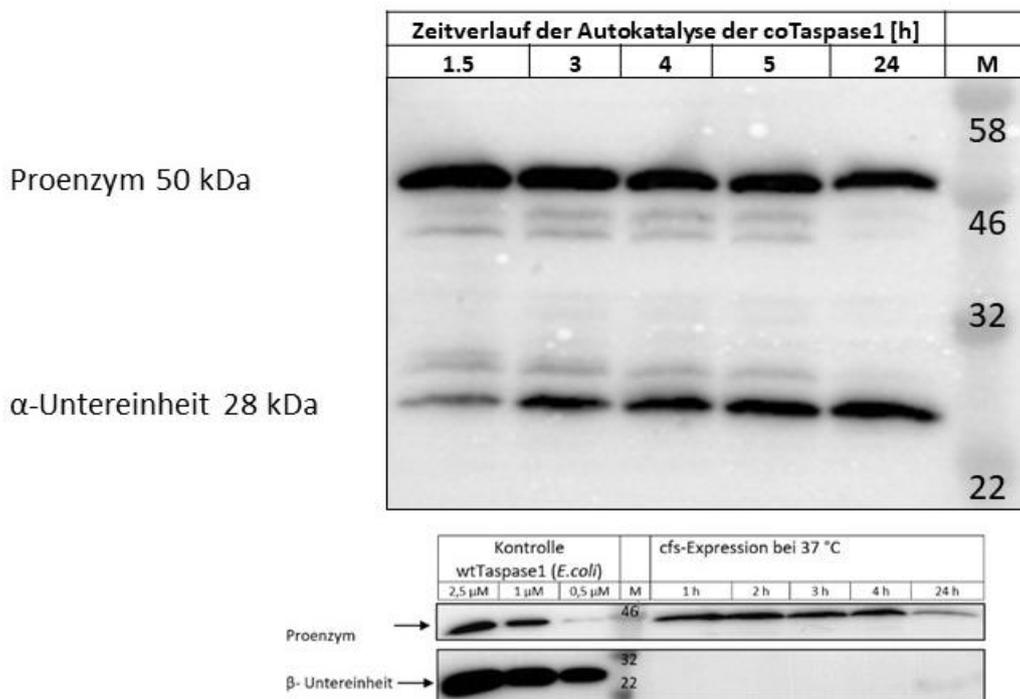


Abb. 22 Western Blot der Proteinexpression durch das zellfrei basierte System

Abbildung 28 Zeitverlauf der Autoprozessierung der coTaspase1 in dem zellfrei exprimierten System

Proben wurden nach 1.5, 3, 4, 5 und 24 h aus dem zellfreien Expressionsansatz entnommen, bei 95°C 5 min denaturiert und dann auf ein 12.5%-SDS-PAGE beladen und anschließend auf eine PVDF Membran geblottet. Gut erkennbar ist die beginnende autokatalytische Aktivierung der coTaspase1 bereits nach 1.5 h. Nach 24 h erreicht diese eine ca. 50%-ige Dimerisierung und Aktivierung. Die leichten Banden sind Artefakte bzw. nicht vollständig denaturiertes Protein. Verwendeter Antikörper Anti-Taspase1 (B-7) (sc-390934) mouse monoclonal IgA (Santa Cruz) (1:500)(spezifisch für ein Epitop, welches zwischen den Aminosäuren 89-130 innerhalb einer internen Region von der Taspase1 liegt). Zur Erinnerung Abbildung 22 eingefügt, für einen direkten Vergleich, welche das entsprechende Experiment für die wtTaspase1 zeigt.

In dem zeitlich kontrollierten Expressionsansatz der coTaspase1 ist in der Abbildung 27 gut erkennbar, dass bereits nach 1.5 h ein Teil der Taspase1 die autokatalytische Aktivierung durchlaufen hat wie an der Bande bei 28 kDa zu sehen war. Mit zunehmender Zeit nahm die 28 kDa Bande an Intensität zu und nach 24 h war die Intensität der Banden bei 28 und bei 50 kDa in etwa gleich, was dem Zustand einer ca. 50%-igen Dimerisierung und Aktivierung entspricht. Die leichten Banden unter den 50 kDa und die über den 28 kDa sind Artefakte bzw. nicht vollständig denaturiertes Protein. Somit ist durch diesen Western Blot und den HTRF Assay gezeigt worden, dass die coTaspase1 im Vergleich zu der cfs-wtTaspase1 weitaus schneller das CS2 Substrat prozessierte. Ihrer höheren Expressionsrate führte zu einer schnelleren autokatalytischen Aktivierung detektierbar bereits innerhalb von 1.5 h nach Start der cf-Expression. Bei der cfs-wtTaspase1 hingegen wurde in Abbildung 22 gezeigt (zum direkten Vergleich wurde in Abb. 28 die Abb. 22 hinzugefügt), dass diese um die 24 h benötigte, um autokatalytisch aktiv zu werden und das Konstrukt zu verdauen.

Aus den Versuchen lässt sich nun schließen, dass die coTaspase1 die Effizienz der Proteinexpression zwar um ein vielfaches gesteigert wurde, jedoch womit nicht gerechnet wurde ist, dass sie sich auch weitaus schneller autokatalytisch aktiviert als die cfs-wtTaspase1. Somit war die coTaspase1 leider nicht für die Screenings der Inhibitoren nützlich und das HTRF Screening Assay System musste mit der cfs-wtTaspase1 durchgeführt werden.

4.4 Finale Version des HTRF Screening Assays mit integriertem zellfreiem System

In dem HTRF Screening Assay wurde ein zusätzliches System, das zellfrei Proteinexpressions-system mit eingebaut, welches die wtTaspase1 als Monomer/Proenzym exprimieren sollte. Durch das exprimieren der wtTaspase1 als Proenzym werden mehr Inhibitionsmöglichkeiten eröffnet, sei es in der Dimerisierung, in der autokatalytischen Aktivierung oder während des Substratbindens oder -verdauens. Ein Nachteil des zellfrei exprimierenden Systems, war die niedrige Proteinmenge, die dabei erzielt wurde. In der Beschreibung nach dem Hersteller reichte die effektiv erhaltene exprimierte Proteinmenge nicht aus, um eine 384-Well Platte mit à 9 µl mindestens 15 nM exprimiertem Protein pro Well zu füllen. Um genug Proteinmenge zu erhalten, war nun das weitere Vorgehen, den Expressionsansatz soweit wie möglich zu erhöhen. Zusätzlich wurde der Arbeitsschritt der Dialyse nach der Proteinaufreinigung nochmals genauer untersucht, um vielleicht einen Arbeitsschritt weglassen zu können, in der die cfs-wtTaspase1 zeitlich auto-aktiviert werden könnte. Die Dialyse war sehr zeitintensiv und somit ein potenzielles Zeitfenster in dem die wtTaspase1 autokatalytisch aktiv werden konnte, zusätzlich ging bei der Dialyse oft auch Protein verloren. Dementsprechend wäre es für den Screeningablauf theoretisch ein Arbeitsschritt, den man sich sparen könnte. Zu berücksichtigen war hierbei, dass beim Fehlen des Dialyseschlusses das Protein im Elutionspuffer mit einer Imidazolmenge von 500 mM vorlag und dieses die Reaktion im HTRF Screening Assay hätte stören können. Deshalb wurde zunächst untersucht, was für eine Auswirkung das Entfallen der Dialyse auf das HTRF Screening Assay hatte und anschließend wie viel von dem Expressionsansatz notwendig war, um eine 384-Well Platte zu füllen.

Getestet wurde die exprimierte cfs-wtTaspase1 im HTRF Screening Assay, bei der das Protein einmal mit Dialyse und einmal ohne Dialyse mit dem Konstrukt in Kontakt kam. Hierbei wurde

die Auswirkung des hohen Imidazolgehalts auf das Dimerisierungs- und Aktivierungsverhalten der wtTaspase1 beobachtet.

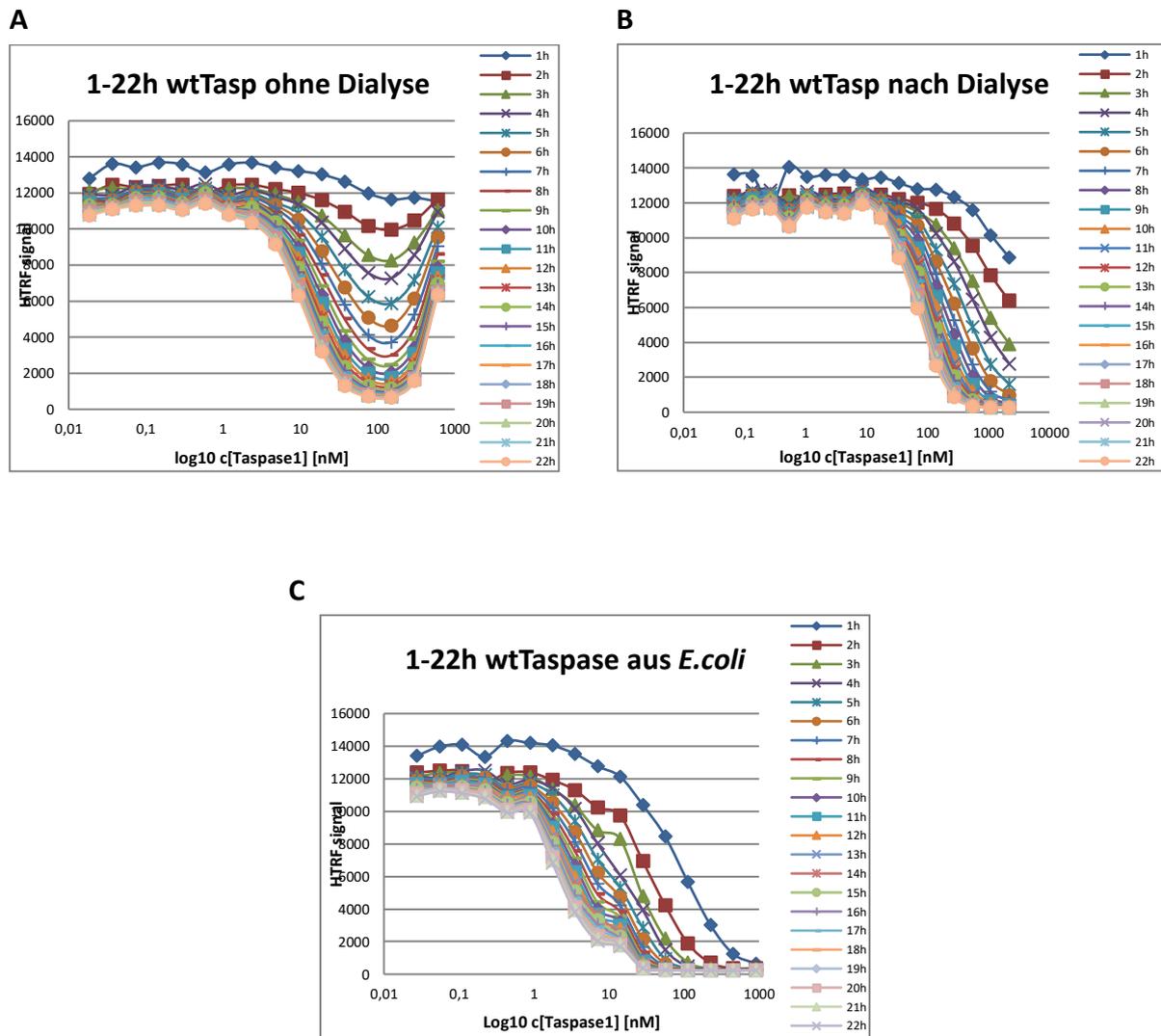


Abbildung 29 Auswirkung des Dialyse-Schrittes im HTRF Screening Assay

Stündlich 1-22h wurde die Fluoreszenz gemessen. Das CS2 Konstrukt mit 1 nM eingesetzt. Die cfs-wtTaspase1 wurde als Titrationsreihe eingesetzt, die höchste Konzentration betrug 1-1,5 μM . **A** Bei der Messung ohne Dialyse sieht man in den hohen Konzentrationen einen nicht erwarteten Anstieg der Fluoreszenz. **B** mit Dialyse hingegen eine gleichmäßige Reduktion der Fluoreszenz. **C** Kontrolle wtTaspase1 aus *E.coli*. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3.

Aus den Graphen ist der zeitliche Verlauf der cfs-wtTaspase1 ersichtlich, in **A** ohne die Dialyse und in **B** mit der Dialyse, es ist deutlich zu sehen, dass der Dialyse-Schritt ein ausschlaggebender Faktor in dem HTRF Screening Assay ist. In **Abbildung A** erkennt man in den hohen Konzentrationen bis 100 nM, dass bei der cfs-wtTaspase1 keine wirkliche Reduktion der Fluoreszenz zu erkennen war, womöglich hinderte die hohe Imidazolkonzentration aus dem Elutionspuffer die wtTaspase1 daran, das Konstrukt zu finden und zu prozessieren. Ab einer Konzentration von 100 nM schien die Imidazolkonzentration so weit verdünnt zu sein, dass diese das FRET-System oder die eigentliche Reaktion zwischen der wtTaspase1 und dem Konstrukt nicht mehr störte. Bei der Messung **B** hingegen wurde die Dialyse vorher durchgeführt, hierbei ist sehr gut erkennbar, dass die Reduktion der Fluoreszenz zeitlich gleichmäßig abgenommen hatte und keine Erhöhung bzw. Störung des FRET-Signals zu beobachten war. Der Dialyse-Schritt war offensichtlich für das HTRF Screening Assay bzw. für

die eigentliche FRET-Messung von großer Bedeutung, da hier wie aus Abbildung **B** zu entnehmen, keine Interaktion mit dem FRET-System zu beobachten war bzw. eine Verstärkung des FRET-Signals stattfand. Jedoch war dieser Schritt sehr zeitintensiv und die Wahrscheinlichkeit, dass die wtTaspase1 autokatalytisch aktiv wurde, war in diesem Schritt sehr hoch. Zudem musste in Betracht gezogen werden, dass je größer der Reaktionsansatz für die Proteinexpression war, desto länger hätte die Dialysezeit angedauert, um hierbei einen größtmöglichen Salzaustausch zu erzielen. Das Eliminieren des Dialyse-Schrittes sorgte für enorme Zeiteinsparung. Die Verdünnungsreihe der cfs-wtTaspase1 offenbarte in diesem Versuch (s. Abbildung 29 **A**), dass bei einer Konzentration von 100 nM die hohe Imidazolkonzentration keinen allzu großen Effekt mehr auf das FRET-System hatte. Bei einer Konzentration von 100 nM wurde die Probe zunächst 1:10 mit dem HTRF Puffer verdünnt, somit lag final in der Messprobe eine Verdünnung von 1:20 verdünnt vor. Effektiv ist nur noch 25 mM Imidazol in dem Puffer vorhanden und offensichtlich tragbar für das Testsystem.

Bezüglich des Erhöhen des Proteinansatzes für die Expression wurde die 9-fache Menge des eigentlich angegebenen Expressionsansatzes nach dem Hersteller verwendet, damit es von der Proteinmenge ausreichte, wurde diese nach der Aufreinigung in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die finalen Arbeitsschritte zusammengefasst sind: Zunächst wurde die 9-fache Menge des cf-Systemes eingesetzt, um genug Protein zu exprimieren, danach folgte ein 30 minütiger Verdau mit RNase A und DNase I und dann eine His-tag Aufreinigung. Nach der Aufreinigung wurde das Protein 1:10 mit HTRF Puffer verdünnt und direkt in HTRF Screening Assay mit 10 μ l 1 nM CS2 Konstrukt getestet.

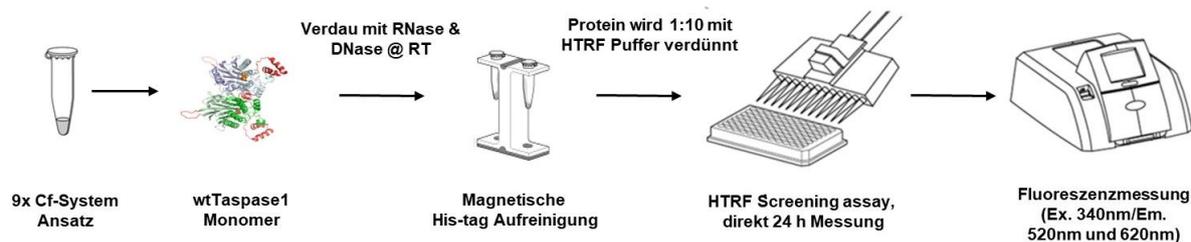


Abbildung 30 Optimierter endgültiger HTRF Screening Assay

Arbeitsschritte: Protein wird im 9-fache Ansatz cf-System exprimiert für 1,5h bei 37°C schüttelnd, danach wird ein DNase I und RNase A Verdau für 30 min bei RT durchgeführt, anschließend folgt eine magnetische His-tag Aufreinigung. Das Protein wird nach der Aufreinigung 1:10 mit HTRF Puffer verdünnt. Die Reaktion wird in einer 384-Well-Platte angesetzt und sofort beginnt bei RT die 24 h-Fluoreszenzdetektion. Bilder wurden aus den Technical Manuals^{176,177} von Promega GmbH entnommen und weiterverarbeitet.

4.5 Screening der FDA zugelassenen Medikamente

Die FDA, U.S. *Food and Drug Administration*, ist die Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten. Sie ist für den Schutz der öffentlichen Gesundheit verantwortlich, indem sie die Sicherheit und Wirksamkeit von Human- und Tierarzneimitteln, sowie von biologischen Produkten und Medizinprodukten gewährleistet. Zudem gewährleisten sie die Sicherheit der Nahrungsmittelversorgung, der Kosmetika und der Produkte, die Strahlung aussenden.¹⁸⁰ In dieser Arbeit wurden 1200 FDA-zugelassene Medikamente getestet, die mir von Prof. Dr. Stefan Knapp (Arbeitsgruppenleiter, pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt) bereitgestellt worden sind. Alle Arzneimittel aus der Bibliothek waren in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und lagen mit einer Konzentration von 10 mM vor. Die Verbindungen wurden unter Verwendung des ECHO- und Access-Systems

(Labcyte) in Triplikaten in 384-Well Platten (384-Well Platte NUNC 264706, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen.

Zu den vorgelegten Arzneimittel (0.02 µl, 10 mM) wurde noch mit einer finalen Konzentration 1 nM CS2-Konstrukt und frisch exprimierter cfs-wtTaspase1 ~ 30 nM zugegeben. Mit einem Gesamtvolumen von 20 µl betrug die Endkonzentration der Arzneimittel 10 µM (1:1000 Verdünnung). Die Positivkontrolle für dieses Assay war das CS2-Konstrukt zusammen mit der cfs-wtTaspase1 mit einem 5% DMSO-Anteil (v/v), während die Negativkontrolle das CS2-Konstrukt mit 5% DMSO-Anteil (v/v) ohne cfs-wtTaspase1 war. Die Fluoreszenzmessung wurde sofort nach Ansetzen der Reaktion gestartet und stündlich für 24 h gemessen. Während des Screenings wurde die Messung am Tecan Spark mit einer Feuchtigkeitskassette durchgeführt, um jegliche Verdunstung zu vermeiden. Alle positiven Treffer wurden als Arzneimittel mit der Fähigkeit definiert, den proteolytischen Spaltungs- oder Dimerisierungsprozess der wtTaspase1 signifikant zu hemmen.

Tabelle 10 Zusammensetzung der Komponenten im HTRF Screening Assay

	SNAP-Tb-CS2-sGFP (mit 5%DMSO)	cfs-wtTaspase1 (mit 5% DMSO)	Verbindung (in DMSO)
Finale Konzentration	1 nM	~ 30-60 nM (1/20 des aufgereinigten cfs-Proteins)	10 µM
Volumen	10 µl	9.98 µl	0.02 µl (10 mM)

Der Anteil des ungeschnittenen Substrates wurde durch folgende Formel ermittelt:

Formel 4 Berechnung ungeschnittenes Substrat im HTRF Assay

$$\text{Anteil des ungeschnittenen Substrats} = \frac{([\text{HTRF Signal mit der Verbindung}] - [\text{Hintergrundfluoreszenz}])}{([\text{HTRF Signal der Negativkontrolle}] - [\text{Hintergrundfluoreszenz}])}$$

Die Hintergrundfluoreszenz wurde anhand der Positivkontrolle ermittelt, hierbei verdaute die cfs-wtTaspase1 das Substratkonstrukt vollständig. Die noch detektierte Diffusion von unspezifischen FRET wurde dann als Hintergrundfluoreszenz bezeichnet. Nachdem die FDA Bibliothek getestet wurde (s. 9.4), kamen interessante potenzielle Inhibitoren für die wtTaspase1 zum Vorschein. Als positiver Treffer wurden die definiert, die die Fähigkeit besitzen, die proteolytische Spaltung von CS2 (≥ 25 % ungeschnitten CS2) signifikant zu hemmen. Da die verwendete cfs-wtTaspase1 noch keinen Dimerisierungsprozess und keine autoproteolytische Aktivierung durchlaufen hatte, könnte die beobachtete Hemmung auch entweder aus einer Störung der Autoaktivierung von Taspase1 und/oder aus einer Hemmung der aktiven Taspase1 resultieren. Positive Treffer waren mit den Arzneimittel Methacycline HCl, Doxycycline HCl, Primaquine bisphosphate, Tetracycline HCl und Closantel sodium zu beobachten.

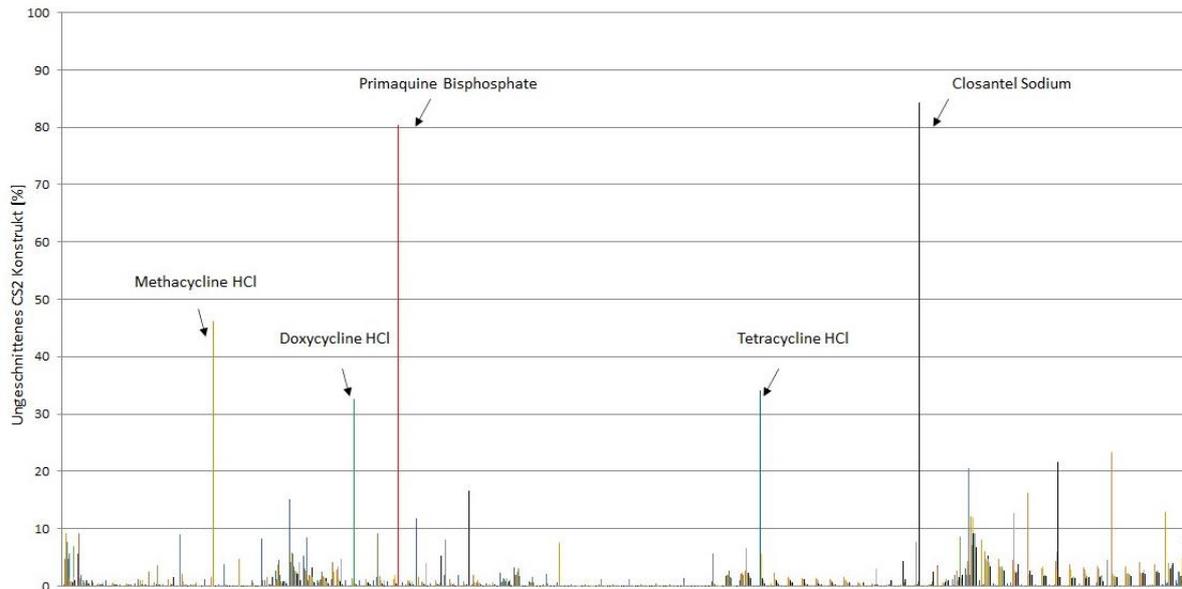
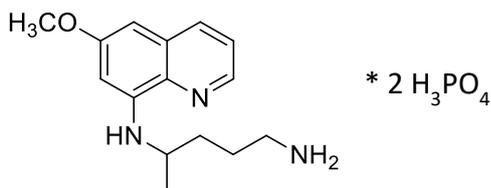


Abbildung 31 FDA zugelassene Arzneimittel die HTRF Screening einen positiven Effekt aufwiesen

Screening Ergebnisse aus der FDA Bibliothek, 5 positive Ergebnisse, die vermutlich mit der wtTaspase1 interagieren. Das ungeschnittene Substrat wurde nach der Formel 4 berechnet. Treffer aus dem Screen: Methacycline HCl, Doxycycline HCl, Primaquine bisphosphate, Tetracycline HCl und Closantel sodium. Messzeit 96 h.

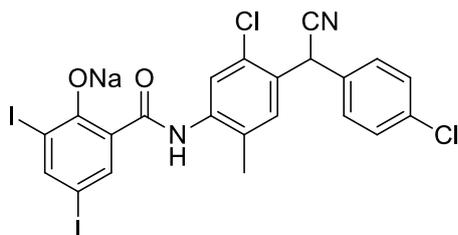
Bei genauerer Auswertung der Screening Daten erschienen Tetracycline HCl und Derivate den Verdacht zu erwecken falsch positive Treffer zu sein, da diese anscheinend in den Messungen ein verstärktes Akzeptor- & Donorsignal verursachten (Daten nicht gezeigt), ausgelöst durch die zusätzliche Anregung des Tetracyclins und Derivate selbst bei 340 nm. Tetracyclin und Derivate wurden unter Vorbehalt trotzdem in einer Dose Response getestet. Dementsprechend rückte der Fokus besonders auf die positiven Treffer Primaquine bisphosphate und Closantel sodium.



Primaquine bisphosphate

Primaquine bisphosphate ist ein Medikament gegen *Plasmodium vivax*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*. Diese sind Hauptverursacher für Malaria-infektionen und -erkrankungen.¹⁸¹ Zudem wurde festgestellt, dass die Aktivität und hämolytische Toxizität von Primaquine bisphosphate mit seinen reaktiven Metaboliten in Verbindung steht. Es wird

angenommen, dass die reaktiven Metaboliten hauptsächlich durch die Wirkung von Cytochrom-P450-vermittelten Stoffwechselwegen gebildet werden.¹⁸²



Closantel Sodium

Closantel sodium ist ein antiparasitäres Medikament, dessen Anwendung nur bei Tieren gegen mehrere adulte und in verschiedenen Entwicklungsstadien von Trematoden, Nematoden und Arthropoden findet. Zudem wurde es als potenter und spezifischer Inhibitor der Chitinase von *Onchocerca volvulus* (OvCHT1) und anderen Filarien-Chitinasen bestätigt.^{162,163} In weiteren

Untersuchungen wurde die Anti-Staphylokokken-Aktivität von Closantel sodium gegen Vancomycin-resistente Staphylococcus aureus-Isolate und andere Gram-positive Bakterien bestätigt.¹⁶⁴

Die möglichen Inhibitoren wurden in Experimenten zur Ermittlung ihrer Dosis-Wirkungs-Beziehung (Dose Response) näher untersucht.

4.6 Dosis-Wirkungs-Beziehung (Dose Reponse) von Primaquine bisphosphate und Closantel sodium

Die Treffer aus dem HTRF Screening Assay wurden nun in einer Dosis-Wirkungs-Reaktion genauer untersucht. Die Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte nach demselben Prinzip wie auch schon im HTRF Screening Assay (s. 4.5) mit dem Unterschied, dass hier eine Verdünnungsreihe der Verbindung erstellt wurde. Verdünnt wurden die möglichen Inhibitoren mit DMSO in einem Verhältnis von 1:2, die höchste Konzentration betrug 12.5 μM . Alle Messungen wurden in Triplikaten und bei RT durchgeführt. Untersucht wurden Methacycline HCl, Doxycycline HCl, Primaquine bisphosphate, Tetracycline HCl und Closantel sodium. Zusätzlich wurde auch Closantel ohne das Natrium getestet, um eine mögliche Inhibition des Natriums ausschließen zu können. Die zugelassenen Arzneimittel wurden in der 384-Platte mit 1 μl vorgelegt, danach wurde das frisch exprimierte Protein, ca. 30 nM cfs-wtTaspase1, zu den Verbindungen gegeben zusammen mit dem CS2-Konstrukt, final 1 nM. Die Positivkontrolle für diesen Assay war das 1 nM CS2-Konstrukt zusammen mit der cfs-wtTaspase1 und 5% DMSO-Anteil (v/v), während die Negativkontrolle das 1 nM CS2-Konstrukt mit 5% DMSO-Anteil (v/v) und HTRF Puffer statt cfs-wtTaspase1 war. Die Fluoreszenzmessung wurde sofort nach Ansetzen der Reaktion gestartet und stündlich für 24 h gemessen. Die Messung wurde am Tecan Spark mit einer Feuchtigkeitskassette durchgeführt, um jegliche Verdunstungen zu vermeiden.

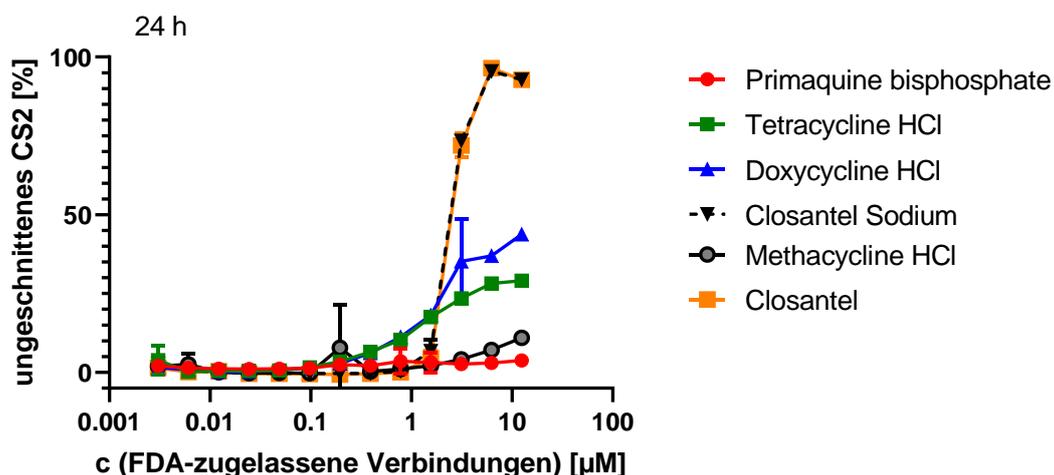


Abbildung 32 Dose Response mit den positiven Treffern aus dem HTRF Screening Assay

Verschiedene Konzentrationen der positiven Treffer (höchste Konzentration 12.5 μM , dann folgt eine Titration 1:2 verdünnt) wurden auf die cfs-wtTaspase1 und dem CS2-Konstrukt getestet. Getestete Verbindungen waren Primaquine bisphosphate, Tetracycline HCl, Doxycycline HCl, Closantel, Closantel sodium und Methacycline HCl. Die Reaktion wird in einer 384-Well Platte angesetzt und über 24h wird die Fluoreszenz detektiert. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3. Die Werte auf der x-Achse wurden als dekadischer Logarithmus aufgetragen.

Die Abbildung 32 zeigt, dass Doxycyclin und Tetracyclin in der Messung einen positiven Effekt auf die wtTaspase1 ausübten, jedoch bei genauerer Betrachtung der Rohdaten (hier nicht

gezeigt) fiel auf, dass ein verstärktes Akzeptor- und Donor-Signal zu sehen war, wie auch schon in dem *Screening* vermutet. Die Verstärkung des FRET-Signals bzw. die erhöhten Fluoreszenzdaten wurden durch die zusätzliche Anregung des Tetracyclins und Derivate bei 340 nm verursacht (Absorption des Tetracyclins bei ca. 320 nm). Dementsprechend konnten Tetracyclin und Doxycyclin nicht als mögliche Inhibitoren für die wtTaspase1 in Betracht gezogen werden. Primaquine bisphosphate, welches sich in dem HTRF Screening als sehr vielversprechend erwies, zeigt hier enttäuschenderweise keinen positiven Effekt mehr auf die wtTaspase1. Wiederholungen der *Dose Response* mit Primaquine bisphosphate bestätigten das Ergebnis von Abbildung 32, somit zeigte es keinen positiven Effekt auf Taspase1. Methacyclin zeigte ebenfalls keinen ausschlaggebenden Effekt. Closantel sodium als auch Closantel bewiesen in der *Dose Response* einen positiven Effekt auf die wtTaspase1 auszuüben. Indem Closantel ohne Natrium ebenfalls einen Effekt auf die Taspase1 ausübte, konnte mit Sicherheit gesagt werden, dass Closantel für den inhibitorischen Effekt zuständig war und nicht das Natrium selbst.

In einem weiteren Schritt wurde der IC_{50} -Wert von Closantel sodium ermittelt, sowohl an cfs-wtTaspase1 als auch an *E.coli*-produzierter wtTaspase1. Closantel sodium wurde in einem Bereich zwischen 0 und 12,5 μM (Verdünnungsreihe 12.5 μM > 1:2) getestet und hemmte beide Taspase1-Präparate, cfs-wtTaspase1 mit einer IC_{50} von ca. 1.6 μM und die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 mit einem IC_{50} von ca. 3.9 μM . Eingesetzt wurde 1 nM CS2-Konstrukt und ca. 30 nM cfs-wtTaspase1 und 100 nM *E.coli*-produzierte wtTaspase1. Die Konzentration der cfs-exprimierten Taspase1 konnte nicht mit der gleichen Konzentration wie der *E.coli*-exprimierten Taspase1 durchgeführt werden, da in dem zellfrei basierten System vorher nicht bekannt war, wie viel Protein genau exprimiert wurde. Nach der Expression und Aufreinigung wurde das Protein direkt im HTRF Assay eingesetzt. Die exakte Konzentration konnte erst im Nachhinein über die BCA Proteinbestimmung errechnet werden.

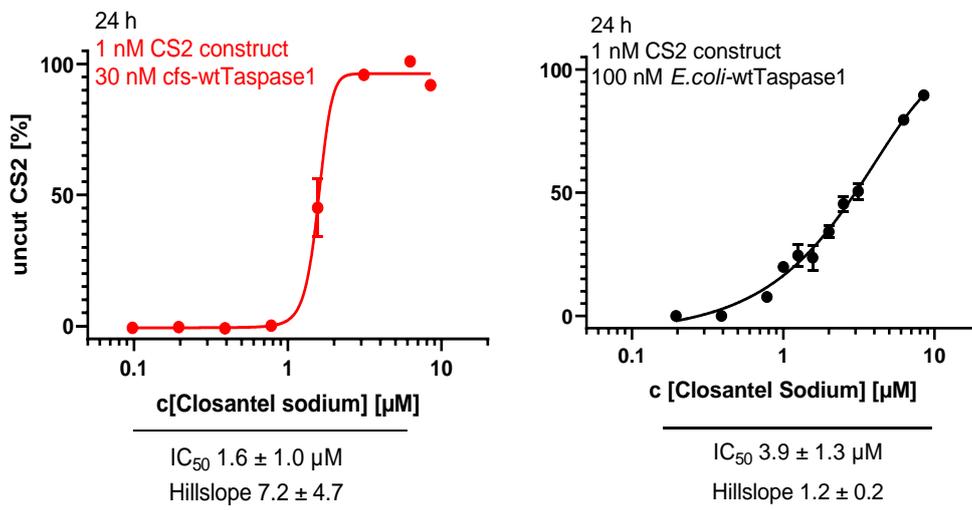


Abbildung 33 Dose Response für die cfs-wtTaspase1 und für die *E.coli*-produzierte wtTaspase1

Der IC_{50} wurde sowohl bei cfs-wtTaspase1 als auch bei *E.coli* produzierte wtTaspase1 bestimmt. Von der Handhabung erfolgte der Versuch wie schon in dem HTRF Screening Assay beschrieben. Gemessen wurden 24 h am Tecan Spark bei RT, dabei wurde während der Messung eine Feuchtigkeitskassette verwendet, um mögliche Evaporation von Lösungen zu vermeiden. Die höchste Konzentration an Closantel sodium betrug 12.5 μM , danach erfolgte eine Verdünnungsreihe (12.5 μM > 1:2 verdünnt). 1 nM CS2-Konstrukt und ca. 30 nM cfs-Taspase1 und 100 nM *E.coli*-produzierte wtTaspase1. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3. Steilerer Hillslope bei cfs-wtTaspase1 als bei *E.coli*-produzierte wtTaspase1. Der IC_{50} liegt bei beiden im Bereich von \pm 2 μM .

Für die *cfs-wtTaspase1* wurde eine viel steilere Steigung beobachtet als im Vergleich zum Experiment mit *E.coli*-exprimierter Taspase1, dies wird meist als Hinweis auf ein höheres Maß an Kooperation interpretiert, gekennzeichnet durch einen hohen *Hillslope*. Der *Hillslope* beschreibt die Steigung der sigmoidalen Kurve in der Dosis-Wirkungskurve. Eine Steigung von mehr als 1 zeigt eine positive Kooperation zwischen dem Enzym und dem Liganden an, während eine Steigung von weniger als eins eine negativ kooperative Bindung anzeigt. Ein *Hillslope* $\gg 1$ ist ein Hinweis darauf, dass der beobachtete Effekt (hier in diesem Fall der Verdau von CS2 bzw. Hemmung dessen) durch Prozesse beeinflusst werden, die sich kooperativ verstärken. Hierbei kann es ein Indiz sein, dass Closantel sodium nicht nur die bereits aktive Taspase1 hemmt, sondern zusätzlich deren Reifung zum aktiven Enzym verhindert. Dabei könnte entweder die Taspase1-Dimerbildung blockiert werden und/oder es sorgt für eine Hemmung der autoproteolytischen Spaltung innerhalb des Dimers.

Um ausschließen zu können, dass die beobachtete Hemmung durch Closantel sodium kein Artefakt sein konnte, wurde die CS2-Spaltung per Western Blot (WB) als orthogonalen Assay nachgewiesen. Die Konzentration des CS2-Substrats wurde daher für einen optimalen Nachweis per WB auf 8 nM erhöht und mit 30 nM *cfs-wtTaspase1* jeweils in Gegenwart von 0-12.5 μ M Closantel sodium behandelt.

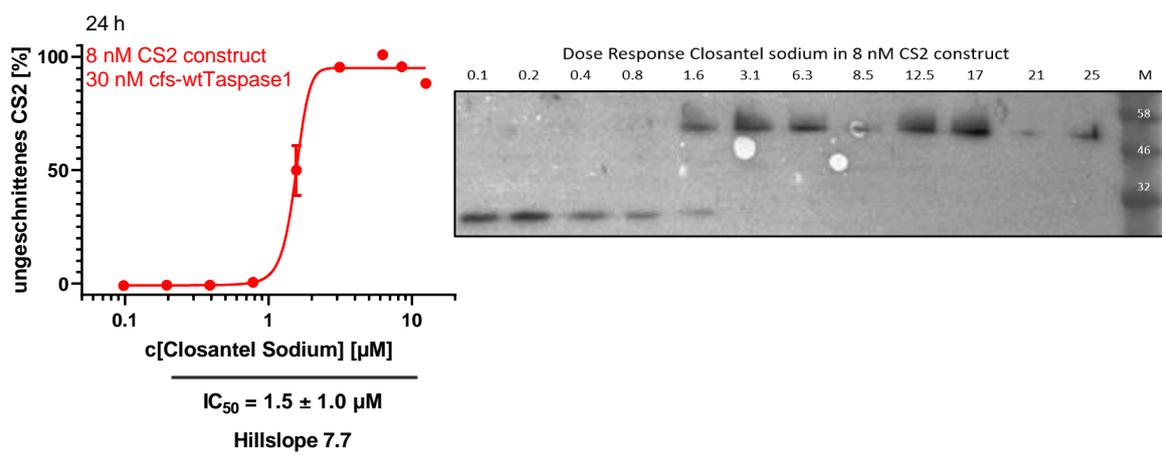


Abbildung 34 Verifizierung der proteolytischen CS2-Spaltung über Western Blot

Die Konstruktkonzentration wurde auf 8 nM erhöht, damit diese über Western Blot detektiert werden kann. In dem Kurvenverlauf als auch im Western Blot ist der Wendepunkt mit einer 1.6 μ M Closantel sodium Präsenz sehr gut erkennbar. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 3. Das volle Konstrukt ist auf der Höhe von 46 kDa zu sehen, während das geschnittene Konstrukt nur mit einer Bande bei 26 kDa detektiert werden kann, da das Konstrukt das sGFP nur auf der C-terminalen Seite trägt. Als Primärantikörper wurde Anti-GFP IgG Rabbit polyklonal und als Sekundärantikörper ein HRP-konjugierter Antikörper Anti-Rabbit IgG.

Der Western Blot (Abbildung 34) bestätigte die dosisabhängige Hemmung durch Closantel sodium. In diesem Blot wurde gegen das sGFP detektiert, dabei wurde ein polyklonaler Anti-GFP IgG Rb (Abcam) Antikörper verwendet. Das volle CS2 Konstrukt ist auf der Höhe von 46 kDa zu sehen, während das geschnittene Konstrukt nur mit einer Bande bei 26 kDa detektiert werden kann, da das Konstrukt das sGFP nur auf der C-terminalen Seite trägt. Sehr schön aus dem WB zu entnehmen, ist der inhibitorische Effekt von Closantel sodium in den hohen Konzentrationen bis zu einer Konzentration von 1.6 μ M zu erkennen. In dem Kurvenverlauf als auch im Western Blot ist der Wendepunkt mit einer Präsenz von 1.6 μ M Closantel sodium sehr gut erkennbar.

Zusätzlich wurde untersucht inwieweit Closantel sodium die Spaltung von CS2 verhindern kann. Um den prozentualen Anteil des verbleibenden ungeschnittenen CS2 zu bestimmen,

wurde das HTRF-Assay verwendet. Die *E.coli*-produzierte-Taspase1 wurde in Gegenwart fester Konzentrationen von 2 – 6 – 12.5 μM Closantel sodium oder DMSO als unbehandelte Kontrolle titriert. Die Konzentration von CS2 wurde auf 20 nM erhöht, um den Nachweis aus denselben Proben im HTRF-Test sowie im Western-Blot zu ermöglichen. Die höchste wtTaspase1 (*E.coli*) Konzentration war 5 μM und alle folgenden Konzentrationen wurden 1:2 verdünnt.

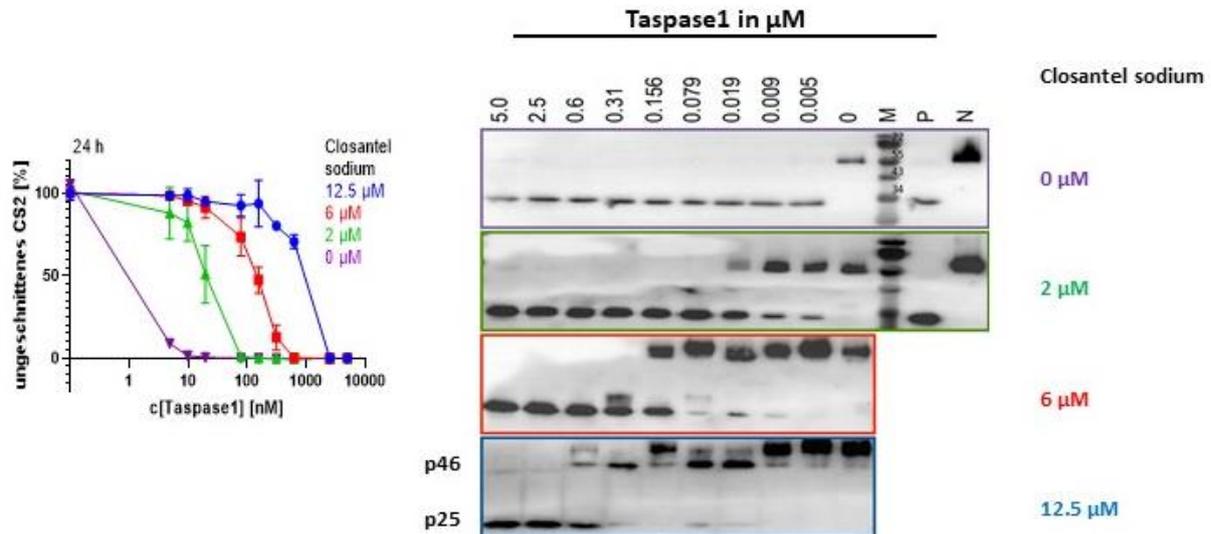


Abbildung 35 Einfluss verschiedene Closantel sodium Konzentration auf die *E.coli*-produzierte wtTaspase1

Einfluss verschiedener konstant gehaltener Closantel sodium Konzentrationen auf einer Taspase1 Titrationsserie mit der höchsten Konzentration von 5 μM > 1:2 folgende Konzentrationen. Das CS2-Substratprotein wurde auf 20 nM eingestellt und 24 h mit *E. coli*-produzierter wtTaspase1 im Bereich von 5 nM – 5 μM oder ohne Taspase1 als Kontrolle behandelt. Das Hemmpotenzial von Closantel-Natrium wurde bei konstanten Konzentrationen von 2, 6, und 12,5 μM mit 5% DMSO im Vergleich zu DMSO allein als Kontrolle. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 4. Kurvenverlauf nach 24 h über die HTRF Messung aufgenommen und die Proben aus dem HTRF Assay wurden für das Western Blot verwendet. Das volle Konstrukt ist auf der Höhe von 46 kDa zu sehen, während das geschnittene Konstrukt nur mit einer Bande bei 26 kDa detektiert werden kann, da das Konstrukt das sGFP nur auf der C-terminalen Seite trägt. Als Primäntikörper wurde Anti-GFP IgG Rabbit polyklonal und als Sekundäntikörper ein HRP-konjugierter Antikörper Anti-Rabbit IgG.

Aus dem HTRF Experiment ist ersichtlich, dass mit zunehmender Closantel sodium Konzentration der inhibitorische Effekt auf die wtTaspase1 zunimmt. Hierbei war die Verschiebung des Kurvenverlaufs mit zunehmender Inhibitorkonzentration zu verfolgen. Diese Beobachtung bestätigten die Western Blots, die mit den Proben aus dem HTRF Assay erstellt wurden, hier ist ebenfalls die Verschiebung des CS2 Bandenmusters mit zunehmender Inhibitorkonzentration ersichtlich. Die Doppelbanden die an einigen Stellen im Western Blot zu sehen sind, sind wahrscheinlich der Dauer des Denaturierungsschritts geschuldet, da offensichtlich nicht alles denaturiert wurde. Zudem kann es auch an der hohen Closantel sodium Konzentration liegen, die möglicherweise während der Denaturierung mit dem Protein interagiert bzw. stört und somit teilweise die Denaturierung unterbindet. In Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten reichten 2 μM nicht aus, um die CS2-Spaltung vollständig zu verhindern. In diesem Versuch wurde festgestellt, dass 12.5 μM Closantel sodium bis zu ca. 200 nM die *E.coli*-produzierte Taspase1 vollständig inhibiert.

4.7 MALDI-TOF

Zeitabhängige Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI-TOF matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight) wird für die Untersuchung von geladenen Makromolekülen wie zum Beispiel Proteine verwendet. In dieser Methode werden einfach geladene, intakte Makromolekül-Ionen in die Gasphase gebracht. Um dies zu ermöglichen

wird der Analyt auf die UV-absorbierende Matrix fixiert. Die Matrix wird mit kurzen Laserpulsen angeregt, dabei absorbiert die Matrix die Strahlung, wird ionisiert und sorgt dafür, dass in der Matrixoberfläche kleine explosionsartige Teilchenablösungen stattfinden. Durch diese kleine explosionsartigen Teilchenablösungen wird der Analyt in die Gasphase überführt und hierbei wird Ladung auf den Analyten übertragen. Kurz nach dem Ionisieren des Analyten, wird ein Spannungspuls angelegt, der die Ionen in das Spektrometer treibt.¹⁸³

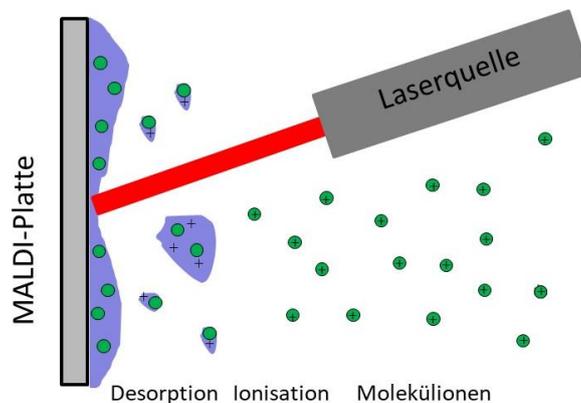


Abbildung 36 Methode nach MALDI-TOF

In dieser Methode werden einfach geladene, intakte Makromolekül-Ionen in die Gasphase gebracht. Um dies zu ermöglichen wird der Analyt auf die UV-absorbierende Matrix fixiert. Die Matrix wird mit kurzen Laserpulsen angeregt, dabei absorbiert die Matrix die Strahlung, wird ionisiert und sorgt dafür, dass in der Matrixoberfläche kleine explosionsartige Teilchenablösungen stattfinden. Durch diese kleine explosionsartigen Teilchenablösungen wird der Analyt in die Gasphase überführt und hierbei wird Ladung auf den Analyten übertragen.

Um die hemmende Wirkung genauer untersuchen zu können, wurde der Effekt von Closantel sodium auf die wtTaspase1 selbst untersucht. Um ausschließen zu können, dass Closantel sodium keine Auswirkung auf das Substratprotein ausübte, wurde hiervon ebenfalls ein Massenspektrum aufgenommen. Gemessen wurde zum Einen die wtTaspase1 alleine und in Anwesenheit von Closantel sodium und das Substratprotein alleine und ebenfalls in Anwesenheit von Closantel sodium. Die Aufnahmen der Spektren wurden freundlicherweise vom Arbeitskreis Dr. Julian Langer (Max-Planck Institut Frankfurt am Main) übernommen.

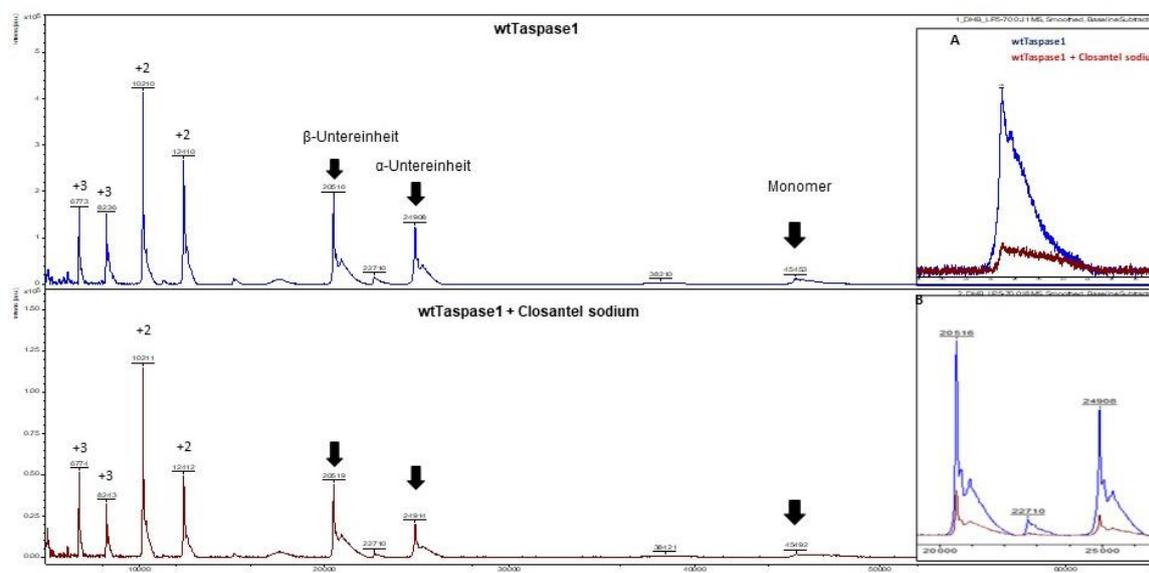


Abbildung 37 Massenspektrum von dem wtTaspase1 ohne und mit Closantel sodium

3 spezifische Signale: bei 45453 m/z Monomer wtTaspase1 mit den 24908 m/z α -Untereinheit und 20516 m/z β -Untereinheit. Alle weiteren Signale sind Fragmentierungen des Monomers und der Untereinheiten. **A** Auf der rechten Seite vergrößerte Monomerpeaks und übereinandergelegt. **B** Auf der linken Seite vergrößerte Untereinheiten und übereinandergelegt.

In dem Spektrum von der wtTaspase1 sind 3 ausschlaggebende Signale hervorgetreten, dabei wurde die Taspase1 mit einem Teil als Monomer detektiert und zwei größere Signale demonstrieren die α - und β -Untereinheiten der wtTaspase1, die mit dem eigentlichen Molekulargewicht übereinstimmen. Ganz links sind weitere Fragmentierungen der Untereinheit zu sehen. Im Spektrum mit Taspase1 und Closantel sodium sind dieselben Signale zu beobachten wie auch schon in dem Spektrum zuvor, wo nur Taspase1 detektiert wurde. In dem Spektrum mit zusätzlichem Closantel sodium ist keine Verschiebung der Signale zu beobachten, dementsprechend ist keine Adduktbildung zu sehen und keine kovalente Bindung zwischen Taspase1 und Closantel sodium feststellbar.

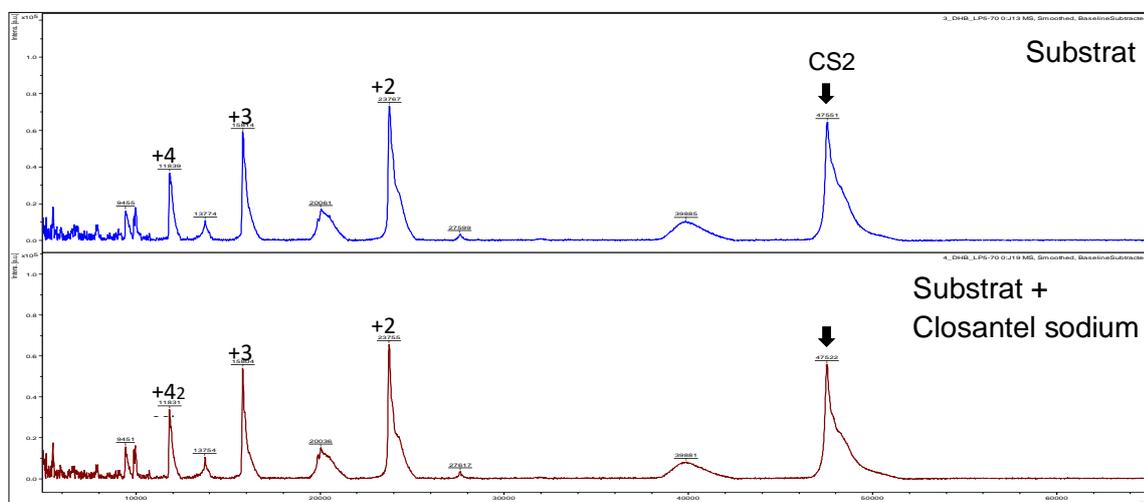


Abbildung 38 Massenspektrum von dem CS2 Konstrukt ohne und mit Closantel sodium

CS2 Konstrukt hat ein starkes Signal bei 47522 m/z mit zusätzlichen Signalen, die die Fragmentierung (markiert mit +2, +3, +4) des Konstrukts widerspiegeln. Zusätzlich zu den charakteristischen Signalen sind noch einige kleinere zu sehen, die den Salzen zuzuordnen sind, die im Puffer vorhanden sind.

Im Massenspektrum mit CS2 hingegen ist wie zu erwarten nur ein Signale zu sehen bei 47551 m/z und die zusätzlichen Fragmentierungen, die während der MALDI Messung entstehen. Zusätzlich zu den charakteristischen Signalen sind noch einige kleinere zu sehen, die den Salzen zuzuordnen sind, die im Puffer vorhanden sind. In dem Spektrum mit zusätzlichem Closantel sodium ist ebenfalls keine Verschiebung der Signale zu beobachten, und auch hier ist keine kovalente Bindung zwischen dem CS2 Konstrukt und Closantel sodium feststellbar.

Wie aus den beiden Massenspektren sehr gut zu entnehmen ist, bindet Closantel sodium weder kovalent an Taspase1 noch an das CS2-Substratprotein. Dies ist aus den unveränderten Diagrammen in beiden Experimenten gut ersichtlich.

4.8 Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)

Als nächstes wurden ITC Experimente durchgeführt, um Closantel sodium als neuartigen Taspase1-Inhibitor zu validieren. Die isotherme Titrationskalorimetrie ermöglicht es, die Bindung eines kleinen Moleküls an ein Protein entweder direkt zu messen oder seinen Einfluss auf die Komplexbildung zwischen zwei Proteinen indirekt zu zeigen. Aufgrund der begrenzten

Löslichkeit von Closantel sodium wurde hier der Einfluss gemessen, der während des Substratbindens bzw. Prozessierung verursacht wird.

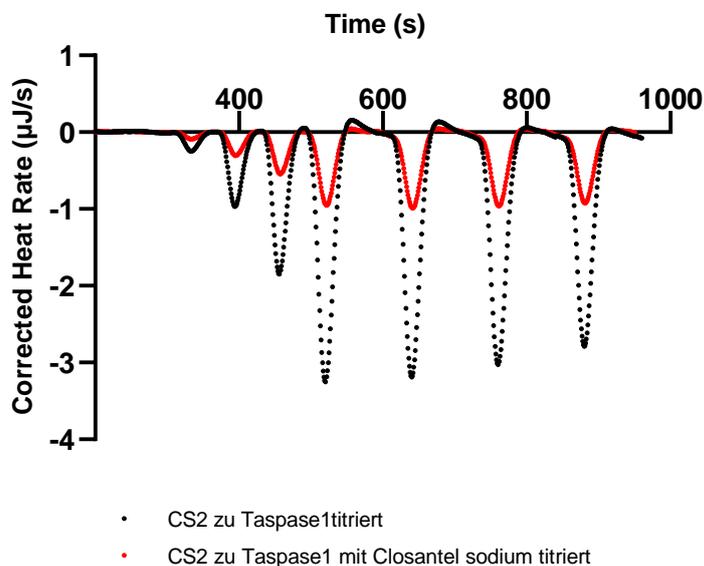


Abbildung 39 ITC Messung von CS2 mit wtTaspase1 mit und ohne Closantel sodium

In Anwesenheit von Closantel sodium ist ganz klar eine Reduzierung der exothermen Energie zu beobachten. ITC Messung mit 20 µM CS2 in der Titrationsspritze und in der Messzelle 1 µM *E.coli*-produzierte wtTaspase1 (einmal mit 12.5 µM Closantel sodium und einmal ohne) - Injektionsvolumen (0.5 µl, 2 µl, 4 µl) à 60 s und 4x8 µl à 120 s bei 25°C. Als Blankmessungen dienten die ITC Messungen bei der CS2 in HTRF Puffer mit/ohne Closantel sodium titriert wurde. (Bei den Daten handelt es sich um Rohdaten.)

In dem ersten Experiment wurde CS2 zu der wtTaspase1 (aus *E.coli*) zutitriert (in schwarz), hierbei konnte eine exotherme Reaktion beobachtet werden. In Gegenwart einer konstanten Konzentration von 12.5 µM Closantel sodium konnte hingegen eine wesentliche Reduzierung der exothermen Energie beobachtet werden. Die Auswertung der einzelnen ITC-Experimente zeigte, dass die Bindung von CS2 an Taspase1 im Allgemeinen eher schwach ist, was durch eine konstante Enthalpie pro Mol des Injektionsmittel über einen großen Bereich des Molverhältnisses gezeigt wird (s. Kapitel 9.3). Dies stimmt mit der zeitabhängigen Verarbeitung überein, die zuvor in den HTRF-Assays beobachtet wurde. Die Anwesenheit von 12.5 µM Closantel sodium führte zu einer wesentlichen Verringerung der Bindungsenthalpie pro Mol Injektionsmittel auf etwa 1/3. Die Verringerung der Bindungsenthalpie ist ein Hinweis darauf, dass Closantel sodium in irgendeiner Art und Weise Taspase1 daran hindert das Substrat zu binden. Wie dies geschieht muss jedoch weiter untersucht werden.

4.9 Closantel sodium Behandlung in HEK293T

Weiterhin sollte die Spaltung eines CS2-Substrats in einem zellbasierten Experiment untersucht werden. Bei dem CS2 Konstrukt handelte es sich um ein FRET Substrat GFP-CS2-BFP, welches von einem vorherigen PhD Studenten Christian Engelbrecht kloniert wurde. Das Substrat wurde in ein pITR EZP Vektor kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein konstitutives Expressionsplasmid. Die Expressionskassete (Transposon) in ITR (inverted tandem repeats) wird über die Sleeping-Beauty Transposase in das Genom stabil in die Zellen integriert. Über einen EF1 α -Promotor wird die Expression des *gene of interest* (GOI) induziert, zudem ist ebenfalls eine SV40 polyA-Sequenz enthalten. Ebenfalls in dem Vektor enthalten jedoch in einem getrennten ORF (*open reading frame*) das ZsGreen Protein (Z) als Transfektionsreporter sowie für die Puromycin N-acetyl-transferase (P) als Selektionsmarker. Ebenfalls in die Zellen transfiziert wurde der Vektor pITR TCTH, der das Gen wtTaspase1 trägt. Dieser Vektor ist analog zu pITR-EZP, enthält jedoch einen Doxycyclin-induzierbaren TRE2-Promotor (T) sowie einen CMV-Enhancer strangabwärts der polyA Sequenz. Ebenfalls in dem Vektor enthalten das dTomato Protein (T) als Transfektionsreporter sowie für die Hygromycin (H) als Selektionsmarker.

Die Transfektion mit *Sleeping beauty* Plasmiden basiert auf einer stabilen Integration einer (durch ITR „*internal tandem repeats*“) spezifischen DNA-Sequenz in das Genom einer Zelle mittels einer Transposase. Die Transposition ist ein präziser Prozess, bei dem ein definiertes DNA-Segment aus einem DNA-Molekül herausgeschnitten wird und an eine andere Stelle im selben oder mit einem anderen DNA-Molekül oder Genom ersetzt wird.¹⁷³

Die Plasmide mit der wtTaspase1 und dem GFP-CS2-BFP Substrat wurde zusammen in HEK 293T-Zellen stabil transfiziert, als Kontrolle diente das Substrat ohne die wtTaspase1.

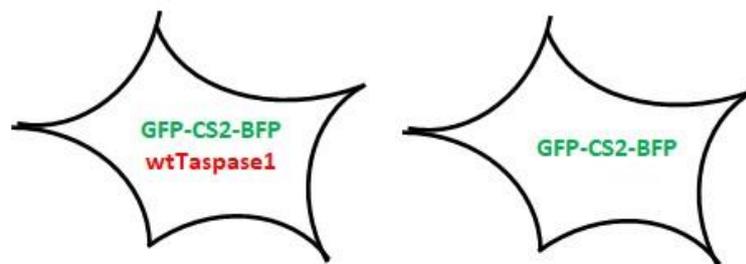


Abbildung 40 Transfizierte Zelllinien für den zellbasierten Versuch

Die Transfektion erfolgte mittels *Sleeping beauty* Plasmiden und wurde wie in Kapitel 3.5.3 durchgeführt. Die Plasmide mit der wtTaspase1 und dem GFP-CS2-BFP Substrat wurde zusammen in HEK293T-Zellen transfiziert, als Kontrolle diente das Substrat ohne wtTaspase1. Die erfolgreiche Transfektion wurde über die Transfektionsreporter ZsGreen (grün) und dTomato (rot) mit dem Fluoreszenzmikroskop verifiziert.

Zunächst wurde ein Zytotoxizitätstest von Closantel sodium durchgeführt, um daraus folgend die weiteren Arbeitskonzentration zu bestimmen, bei der die Zellen nicht vom Closantel sodium selbst starben. Getestet wurden 100 μ M, 50 μ M und 5 μ M Closantel sodium (in DMSO gelöst, 1% DMSO-Volumanteil im Test auf die Zellen wurde nicht überschritten) auf die HEK293T-Zellen, zusätzlich wurde eine reine DMSO Kontrolle (DMSO-Anteil in den Test betrug 1% (v/v)) mitgeführt, um das mögliche Absterben der Zellen durch DMSO ausschließen zu können. Die Zellen wurden für 48 h mit Closantel sodium behandelt und anschließend die Viabilität der Zellen am Nucleocounter NC-3000 gemessen.

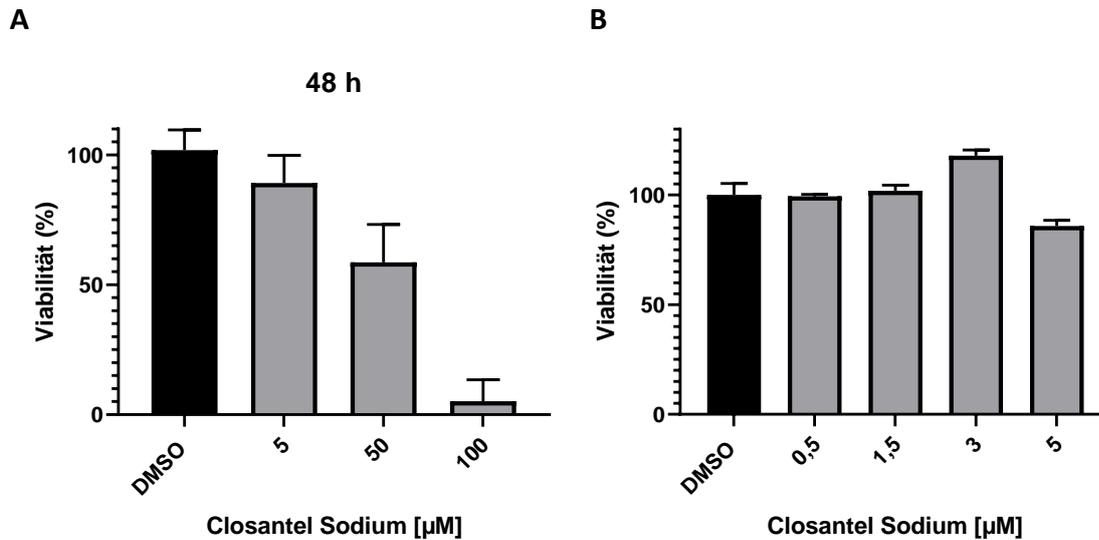


Abbildung 41 Zytotoxizitätstest von Closantel sodium auf HEK293T

Zytotoxizitätstest von Closantel sodium. **A** Behandlung der Zellen für 48 h, dann Viabilität gemessen am Nucleocounter NC-3000. Der gesamtprozentuale Anteil von Closantel sodium (in DMSO gelöst) im Medium betrug 1 %, ebenfalls auch die DMSO Kontrolle. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 6. **B** Für die weiteren Arbeitskonzentrationen wurde Konzentrationen unter die 5 μM gewählt, somit wurden nachfolgenden die Konzentrationen 5 μM , 3 μM , 1,5 μM und 0,5 μM weiteren Tests unterzogen. Daten sind der Mittelwert \pm SD; N = 2. Die Werte wurden auf die Kontrolle normalisiert.

Nach 48 h Behandlung mit Closantel sodium war sehr gut erkennbar, dass die Viabilität der Zellen in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Closantel sodium sehr stark beeinträchtigt war. Bei 5 μM Closantel sodium lag eine Viabilität von etwa 90 % vor. Für die weiteren Arbeitskonzentrationen wurden Konzentrationen unter 5 μM gewählt, somit wurden die Konzentrationen 5 μM , 3 μM , 1,5 μM und 0,5 μM für weitere Tests ausgesucht. In einem weiteren Test konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen \leq 5 μM die Zellviabilität nicht signifikant senken ließ. Mit diesen Konzentrationen 5 μM , 3 μM , 1,5 μM und 0,5 μM wurden in einem neuen Test die Zellen behandelt und für 48 h inkubieren gelassen. Die Kontrollzelllinien wurde genauso behandelt wie zuvor beschrieben, jedoch tragen diese nur das GFP-CS2-BFP Substrat. Gleichzeitig zu der Closantel sodium Behandlung wurde die Expression der wtTaspase1 durch Zugabe von Doxycyclin induziert.

Nach der 48 h Behandlung wurden die Zellen geerntet und lysiert (s. 3.4.4). Bei jeder Probe wurde die Proteinkonzentration mittels BCA bestimmt. Die Proben wurden denaturiert und zur Auftrennung auf ein Gradientengel Mini-Protean® TGX™ Precast Gele 4-15 % von BioRad beladen. Das Gradientengel wurde dann auf eine PVDF Membran geblotet. Für den Western Blot wurde als Primärantikörper Anti-GFP IgG Rb verwendet und als Sekundärantikörper dementsprechend einen HRP-konjugierten Anti-Rabbit.

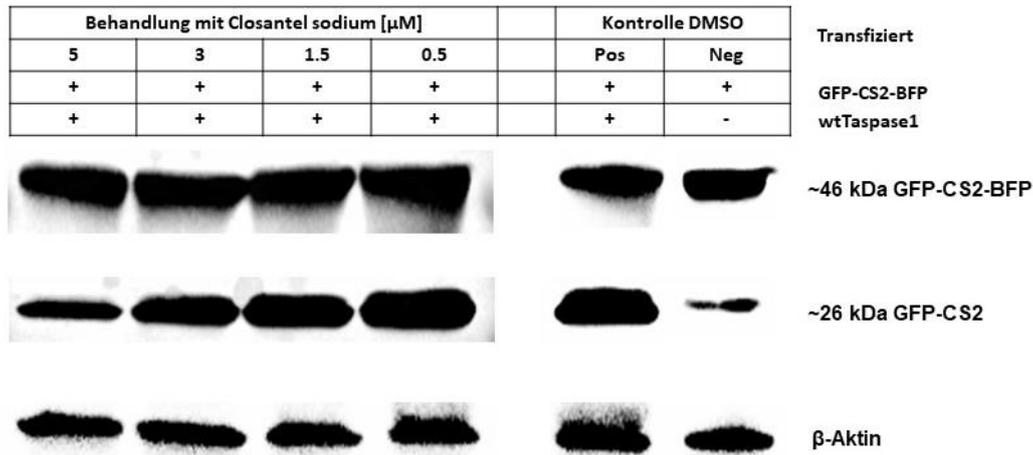


Abbildung 42 Nachweis des inhibitorischen Effekts von Closantel sodium auf wtTaspase1

Behandlung von Closantel sodium in lebenden Zellen. Closantel sodium hemmt die Hydrolyse des Substratproteins (GFP-CS2-BFP). Eine Verringerung der Intensität der 26-kDa-Proteinbande, die GFP-CS2 entspricht, weist auf die Hemmfähigkeit von Closantel sodium hin. Das volle Konstrukt ist auf der Höhe von 46 kDa zu sehen, während das geschnittene Konstrukt nur mit einer Bande bei 26 kDa detektiert werden kann, da das Konstrukt das sGFP nur auf der C-terminalen Seite trägt. Als Expressionskontrolle wurde hier das Gen β -Aktin gewählt. Als Primärantikörper wurde Anti-GFP IgG Rabbit polyklonal und als Sekundärantikörper ein HRP-konjugierter Antikörper Anti-Rabbit IgG.

Der Western Blot zeigt, dass die Behandlung von Closantel sodium zu einer Verringerung des gespaltenen Substratproteins führte. Je höher die Konzentration war, desto mehr nahm die Intensität der 26 kDa Bande ab. Die positive Kontrolle zeigte eine Spaltung (siehe 26 kDa GFP-CS2 gespaltenes Proteinfragment), während die negative Kontrolle eine verringerte 26 kDa Bandenintensität zeigte. Die leichte 26 kDa Bande bei der Negativkontrolle lag an der endogenen Taspase1, die in den HEK293T natürlicherweise exprimiert wird und dementsprechend ebenfalls das CS2 Substrat prozessieren konnte. Aus diesem Experiment ergibt sich der Verwendungszweck von Closantel sodium an Zellen, da es offensichtlich in das Zellinnere gelangt und die Taspase1 in niedrigen mikromolaren Konzentrationen (MW 685.1) hemmt.

4.10 Kristallisation von wtTaspase1 und Closantel sodium

Die Kristallisation von Proteinen ist heutzutage das Mittel der Wahl, um zum Einen noch unbekannte Proteinstrukturen aufklären zu können und zum Anderen das Verständnis der Funktion eines Proteins zu erhalten. Zudem ist es sehr hilfreich bei der Untersuchungen von bindenden Liganden, um somit herauszufinden an welchen genauen Stelle der Ligand bindet bzw. in welchen Bereich der Ligand mit dem Protein interagiert. Die höchste Auflösung einer Proteinstruktur erhält man am besten über Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen. Die Voraussetzung für diese Methode ist dabei, dass gute Proteinkristalle gezüchtet werden müssen. Damit Proteinkristalle entstehen können, benötigt man zunächst eine übersättigte Lösung. Bei einer übersättigten Lösung handelt es sich um einen thermodynamisch instabilen Zustand. Dieser Zustand wird entweder durch Ausfällung eines amorphen Präzipitats oder durch Kristallisation equilibriert.

Hat sich in der übersättigten Lösung ein Kristall gebildet, ist es nun möglich nachträglich niedermolekulare Moleküle in das Kristall miteinzubauen. Der Proteinkristall bildet während des Wachstums ein geordnetes Kristallgitter, hierbei berühren sich die Proteinmoleküle nur an bestimmten Kontaktstellen auf ihren Oberflächen. Durch diese Kontaktstellen an der Oberfläche bilden sich zwischen den Proteinmolekülen Hohlräume, die meist mit Puffer gefüllt

sind. In diese Hohlräume können nachträglich noch niedermolekulare Substanzen eingebracht werden.

Bei diesem Experiment soll zunächst die wtTaspase1 an sich erst kristallisiert werden und nach Bildung der Kristalle, soll das Closantel sodium in das Kristallgitter eingeführt werden. Hierfür wurde eine Proteinkonzentration von ca. 20 mg/ml beim Ansetzen der Kristallisationsplatten verwendet. Das Protein befand sich im folgenden Puffer 20 mM Tris, 450 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% Glycerin. Um ein Proteinkristall zu erhalten, wurden verschiedene Pufferbedingungen getestet (Standard-Kristallisationspuffer wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp zur Verfügung gestellt) bei die Taspase1 auskristallisieren könnte. Die Standard-Kristallisationspuffer waren bereits vorgefertigte Pufferlösungen, die von Firmen erworben werden können. Als gängigste Methode zur Proteinkristallisation ist die Gasphasendiffusion, hierbei gibt es zwei Arten zur Durchführung, einer davon ist der hängende Tropf (*hanging-drop vapor diffusion*) und die Andere ist der sitzende Tropf (*sitting-drop vapor diffusion*). Für die Kristallisation von der wtTaspase1 wurde die *sitting-drop vapor diffusion* Methode angewendet. Der Kristallwachstum wurde bei 20°C durchgeführt. Bei dieser Methode wurde die Proteinlösung zusammen mit dem Präzipitant vermischt, jedoch war dieses Gemisch noch nicht übersättigt.

Das Gemisch befand sich zusammen mit dem Reservoir des Präzipitanten in einem verschlossenen Behälter. Durch den höheren Dampfdruck des Wassers im Gemisch als im Präzipitant, kommt es zu einer Diffusion des Wassers über die Gasphase in das Reservoir mit dem Präzipitant. Diese Diffusion führt zu einer langsamen Übersättigung des Proteins im Tropfen und ermöglicht nun das Kristallisieren des Proteins.

Tabelle 11 Getesteten Standardpufferbedingungen auf Kristallisationsplatten (vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp erworben)

Standard Bedingungen	Barcode
JCSG7	CI005680
HCS3	CI005679
SG1	CI005610
HIN3	CI005630
LFS	CI005629

Der Kristallisationsansatz von 200 nl wurde für einige Wochen bei konstanter Temperatur stehen gelassen. Die verschiedenen Ansätze wurden in einer 96-Wellplatte angesetzt, hierbei besteht jeder Ansatz aus einer definierten Menge der Proteinlösung und einer definierten Menge des Präzipitants (Verhältnis [130 nl:70 nl], [100 nl:100 nl] & [70 nl:130 nl]). Wöchentlich wurde in den Platten mittels eines Mikroskops nach Kristallen Ausschau gehalten, leider vergebens.

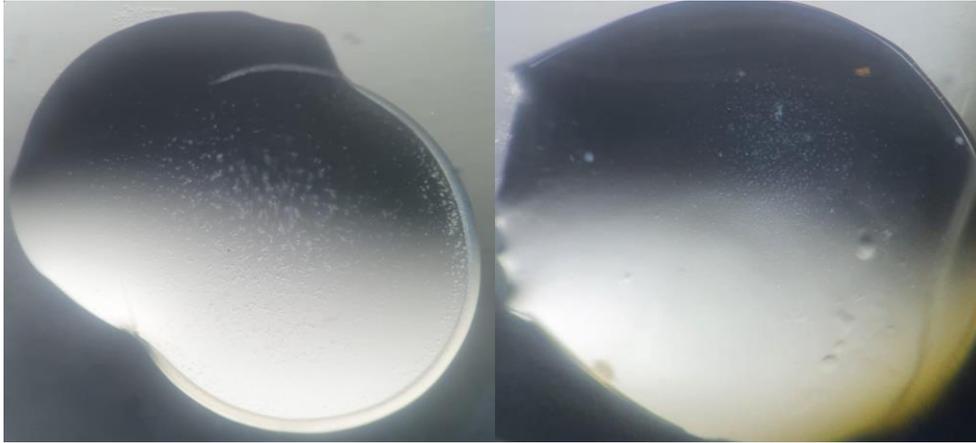


Abbildung 43 Mikroskop Bilder aus den Kristallisationsplatten

In den einzelnen Wells war meist ein Niederschlag/Präzipitat oder eine Phasentrennung zu beobachten. Bei Erstens, wie in Abbildung 43 gezeigt, scheinen ganz viele Mikrokristalle ausgefallen zu sein, welches womöglich an der zu hohen Konzentrationen von Protein und/oder dem Präzipitant liegen kann. Leider ist ein amorpher Niederschlag meist nicht von einem mikrokristallinen Niederschlag zu unterscheiden. Bei der Phasentrennung hingegen ist die Trennung unter dem Mikroskop wie eine Öl-in-Wasser-Emulsion zu beschreiben. Hierbei liegen in einer Phase zu hohe Protein- und niedrige Präzipitantkonzentrationen vor, in der anderen Phase sind die Verhältnisse umgekehrt.

Da in keiner Kristallisationsplatte Kristalle angewachsen waren, konnte leider mit dem Einbringen von Closantel sodium nicht fortgeföhren werden.

4.11 Strukturuntersuchung der wtTaspase1 während des Substratbindens

Ein weiteres Experiment, das während der Promotion ein Thema war, war die strukturelle Untersuchung der Taspase1 bezüglich ihrer autoproteolytischen Aktivierung und Hydrolyse des Substrates. Die Idee war hierbei diese Prozesse über Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (EPR, *electron paramagnetic resonance*) zu untersuchen. Schaut man sich genauer die veröffentlichten Kristallstrukturen an, die von *Khan et al.* 2005 publiziert worden sind¹⁴⁸, entdeckt man beim genaueren Hinsehen, dass es sich bei der inaktiven und aktiven Taspase1, um zwei verschiedene Zustände handelt

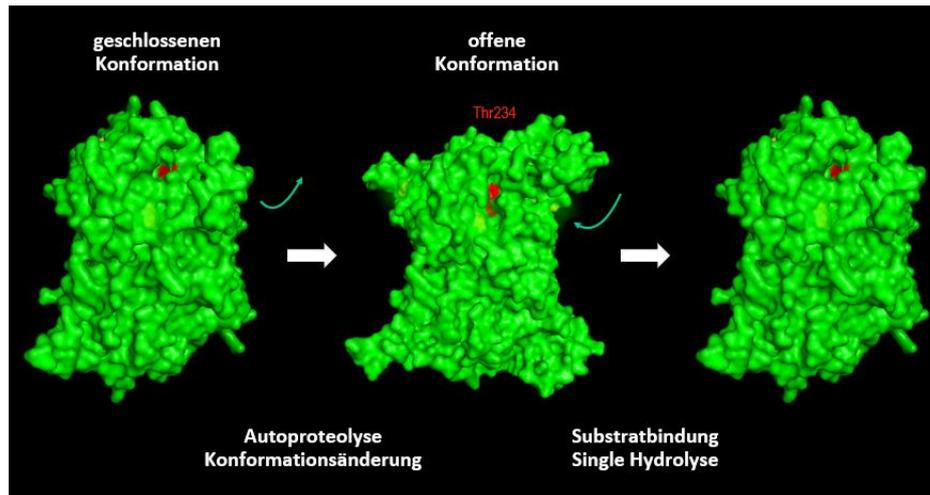


Abbildung 44 Konformationsänderung basierend auf die publizierten Kristallstrukturen

Zu beobachten in Abbildung 44 sind die veröffentlichten Kristallstruktur von Khan *et al.*¹⁴⁸ (PDB aktive Form 2A8J von, inaktive Form 2A8I) Computergestützte Modellierung von Taspase1 basierend auf der verfügbaren Kristallstruktur PDB 2A8I. Die fehlenden Aminosäurereste 206–229 und 352–362 sowie eines Strukturelements, das aus Aminosäureresten 164–180 wurden modelliert. Unterschiede zwischen der veröffentlichten Kristallstruktur und der *in silico* modellierten Taspase1-Struktur werden in Rot angezeigt. Das katalytische Zentrum ist in orange dargestellt.¹⁴⁶ Vergleicht man die beiden Strukturen miteinander ist die erste Struktur die geschlossenen Konformation der inaktiven Taspase1, während bei der aktiven Form es offensichtlich so aussieht als wäre eine offene Konformation.

Die zwei unterschiedlichen Zustände lassen zur Annahme, dass die Taspase1 während der Autoproteolyse eine Konformationsänderung durchläuft. In der Kristallstruktur ist deutlich zu erkennen, dass Taspase1 vor der Autoaktivierung eine geschlossene Struktur hat. Während nach der Autoaktivierung eine Änderung der Strukturanordnung in der Kristallstruktur zu beobachten ist und davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um eine geöffnete Konformation handelt. Zudem besteht die Annahme, dass die Struktur sich nach der Hydrolyse des Substrats wieder schließt und möglicherweise der Grund sein könnte, wieso in unseren HTRF Messungen nur eine einmalige Hydrolyse von Taspase1 zu beobachten ist.

Diese Hypothese sollte über EPR Spektroskopie untersucht werden, dabei sollten an strategisch sich anbietenden Stellen *Spinlabels* (= ein organisches Molekül mit einem ungepaartem Elektron) eingeführt werden. Ist das Spinlabel einmal in das Protein eingebaut, werden die Bewegungen eines Spinlabels von seiner lokalen Umgebung bestimmt. Während einer EPR Messung entsteht ein Magnetfeld um die Spinlabels, dabei werden die Energieniveaus der ungepaarten Elektronen aufgespalten. Hierbei kann das Elektron in einem unteren oder oberen Energieniveau existieren, dies wird in der EPR Messung als die Absorption von Mikrowellenphotonen erkannt. Da Spinlabels sehr empfindlich auf Bewegungen reagieren, äußert sich dies in tiefgreifende Auswirkungen auf ihr EPR-Spektrum. Würde solch eine Auswirkung im EPR Spektrum während der Konformationsänderung der Taspase1 detektiert werden, könnte dies ein Beweis für die Hypothese sein.

Die Spinlabels sollten durch eine genetische Kodierung von nicht-kanonischen Aminosäuren (ncAAs, *non-canonical amino acids*) durch die Amber-Codon-Suppressionstechnologie in die Sequenz eingebaut werden. Solche ncAAs tragen orthogonal funktionelle Gruppen, die verwendet werden können, um spektroskopische Markierungen (z.B. Fluorophore oder Spinlabels) durch posttranslationale Modifikation ortsspezifisch anzubringen.¹⁸⁴ Um eine nicht kanonische Aminosäure in der Translationsmaschinerie eines Organismus zu codieren, wird das Amber Stopcodon verwendet. Dieser Codon wird von keiner endogenen tRNA erkannt. Eine mit der interessierenden ncAA beladene tRNA wird so konstruiert, dass sie ein Stopcodon erkennt und die ncAA über die tRNA in die wachsende Polypeptidkette eingebaut wird. Dieses Verfahren beinhaltet die Verwendung einer tRNA- und eines Aminoacyl-tRNA-Synthetase-

Paares (Enzym, das die tRNA mit einer Aminosäure acyliert) aus einer Spezies, die sich stark von dem Wirt unterscheidet, in dem das rekombinante Protein produziert wird.¹⁸⁵

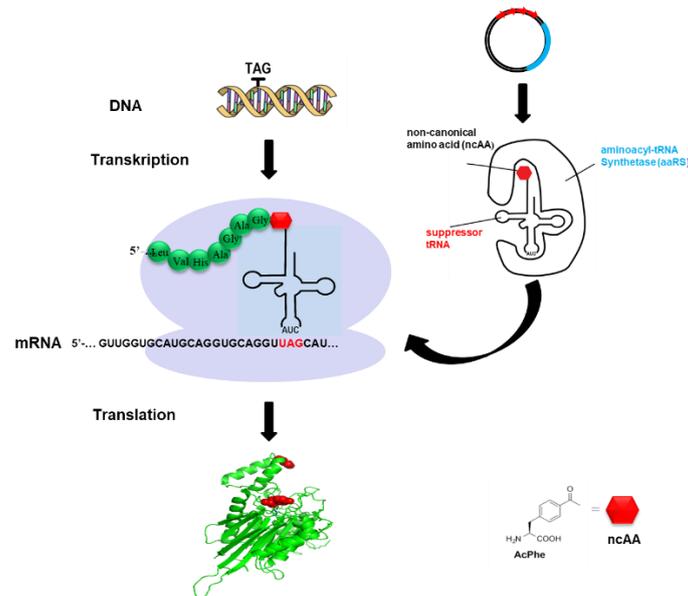


Abbildung 45 Amber Codon Suppression

Benötigt wird ein Plasmid, die die Suppressor tRNA kodiert, die entwickelte Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) und das Zielprotein mit dem Amber-Codon werden in Zellen transfiziert. Die aaRS katalysiert die Acylierung des Suppressors tRNA mit der ncAA. Die Amber Codon tragende mRNA wird im Ribosom translatiert. Wird das Amber-Codon von der mit den ncAA geladenen tRNA erkannt, wird diese Aminosäure der wachsenden Polypeptidkette hinzugefügt.

Bei dieser Methode wurden ortsspezifische Amber Stopcodons (TAG) in die zu untersuchende Taspase1-Sequenz mutiert. Dabei wurden zwei Mutationen in die Taspase1 Sequenz eingefügt. Eine Mutation wurde im stabilen Innenbereich eingefügt (Aminosäure K59 oder Y52) und die andere wurden im Bereich des Helix-Loop-Helix Motivs eingebracht (Abbildung 46).

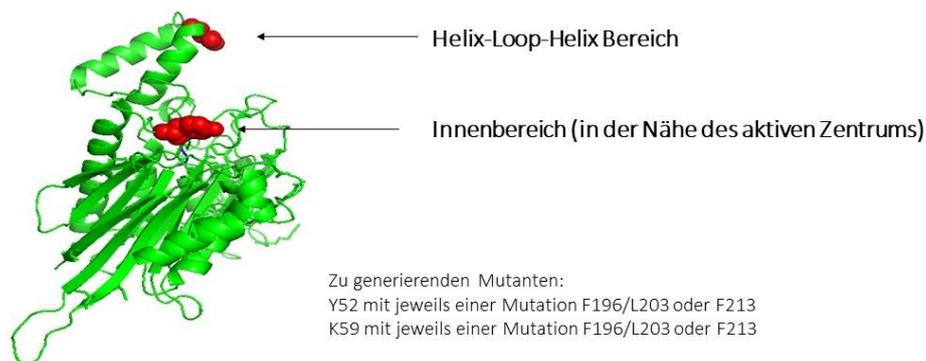


Abbildung 46 Ortsspezifische Mutationen - Amber Stopcodon

Eingefügte Amber Stopcodons (TAG): im stabilen Innenbereich Y52 oder K59 und in der Helix-Loop-Helix Bereich F196, L203 oder F213. Rot markierte Stellen.

Die ausgewählten Positionen in dem Helix-Loop-Helix Bereich sind: F196, L203 und F213. Durch die Wahl mehrerer Positionen in diesem Bereich ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass bei einer EPR Messung mögliche Sekundäreffekte ausgeschlossen werden können, zudem können dadurch besser kleine Distanzänderungen erkannt werden. Damit es in der EPR Messung zu keiner Überlagerung von Signalen kommt, trägt nur ein Monomer in dem Taspase1-Dimer die Amber Stopcodons bzw. die Spinlabels. Dies funktioniert in dem ein Duetvektor verwendet wird, bei dem es möglich ist zwei Gene gleichzeitig zu exprimieren.

Dabei wird dieser Vektor die Sequenz der wtTaspase1 tragen in dem die Amber Stopcodons eingefügt sind und kein His-tag trägt. Die zweite Sequenz wird die codon-optimierte Taspase1 sein die keine Amber Stopcodons trägt, jedoch hier einen His-tag vorhanden ist. Während der Proteinexpression können verschiedene Dimerkombinationen entstehen, diese können dann durch eine His-tag Aufreinigung aussortiert werden.

Während meiner Promotionszeit bin ich leider nur dazu gekommen die Mutanten mit den entsprechenden Mutationen anzufertigen und den *ready to use* Vektor zu klonieren. Bei dem Ausgangsvektor handelt es sich hierbei um ein Duetvektor auf Basis von pET29b Vektor, der zwei *Multiple Cloning Sites* kodiert, mit jeweils einem T7-Promoter, ein lac-Operon und eine Ribosomenbindungsstelle vorausgeht, anschließend folgt dann der T7 Terminator. Durch die zwei T7 Promotoren ist es möglich gleichzeitig zwei unterschiedliche Zielgene in *E.coli* zu exprimieren. Vorteile durch eine Coexpression sollen zum einen eine erhöhte Ausbeute, Löslichkeit und Wirkung sein; zum anderen können einzelne Untereinheiten vor einem proteasomalen Abbau geschützt werden. Für die Klonierung des Duetvektors wurden zunächst alle Fragmente mittels PCR mit der Q5 Polymerase amplifiziert und anschließend in ein Übergangsvektor pCR Blunt II-TOPO Vektor kloniert. Zuerst wurde die mutierte wtTaspase1 Sequenz mit einer linker-Sequenz (indem der zweite T7 Promotor, das lac-Operon und die Ribosomenbindungsstelle lokalisiert ist) mittels Gibson-Cloning miteinander kloniert. Die Sequenz wurde aufgereinigt und über Sanger Sequenzierung bestätigt. Die PCR-produzierten Fragmente als auch das neu generiert Fragment wurden dann über Restriktionsenzymen für die Ligation verdaut. Das Fragment pET29b *Backbone* wurde mit *NheI/NcoI-HF*, das Fragment codon-optimierte Taspase1 [S291A oder C163E/S291A] wurde mit *NdeI/NheI* und zu guter Letzt das Fragment wtTaspase1-linker wurde mit *NdeI/NcoI-HF* verdaut. Nach dem Verdau und Aufreinigung der verdauten Fragmente wurden diese über Nacht bei 4°C mittels der T4 Ligase zusammengesetzt und am nächsten Tag in DH5α Bakterien transformiert. Die Verifizierung des korrekt zusammengesetzten Vektors erfolgte über Sanger Sequenzierung.

In dem Duetvektor wurden die wtTaspase1 und die coTaspase1 eingefügt, hierbei trägt die coTaspase1 bestimmte Mutationen, die dafür sorgen soll, dass die Autoproteolyse langsam oder gar nicht stattfindet. In vorherigen Doktorarbeiten wurden verschiedene Taspase1 Mutanten untersucht. Die Taspase1-Mutanten wurden auf (a) ihre Fähigkeit, Dimere zu bilden; (b) ihre autoproteolytische Aktivität; und (c) die Fähigkeit, geeignetes Substratprotein zu hydrolysieren, getestet. Die wirksamsten Mutationen waren S291A und C163E. Diese Mutante kann zwar dimerisieren, aber nicht selbst aktiviert werden bzw. wenn nur die Mutation S291A eingeführt wird, führt dies zu einer langsameren katalytischen Aktivität des Taspase1-Dimers.^{146,175}

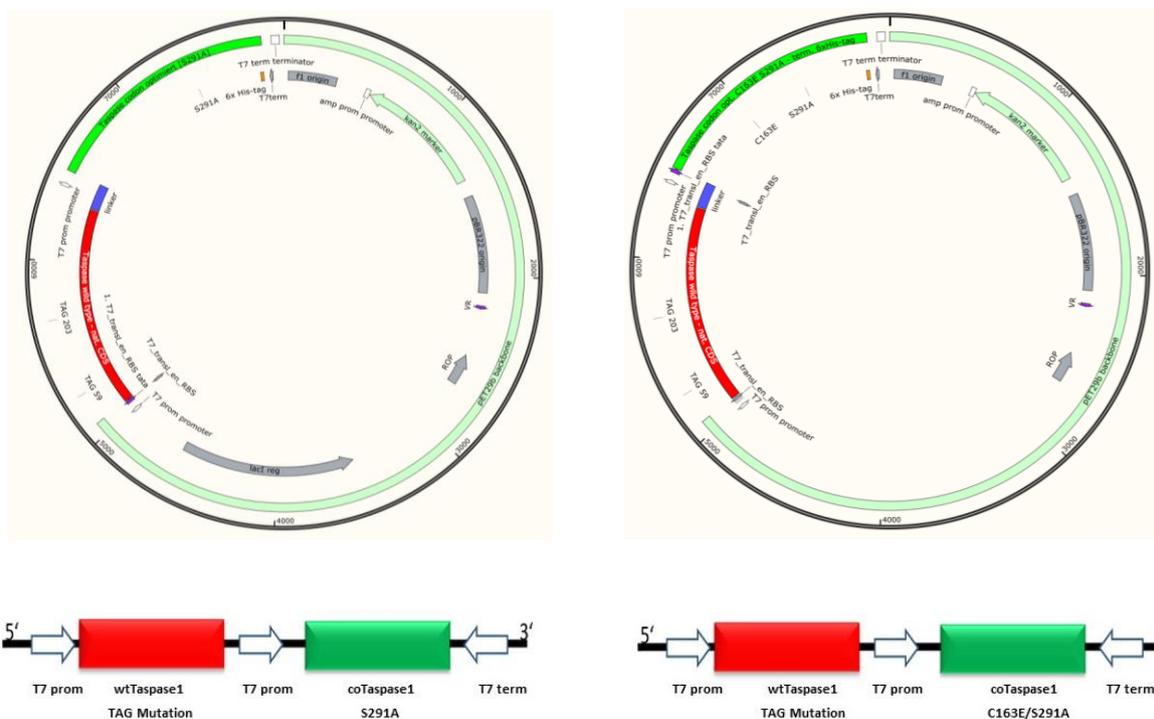


Abbildung 47 Duetvektor mit pET29b mit wtTaspase1 (59/203 TAG Mutationen)-linker-coTaspase1 [S291A oder C163E/S291A]

Duetvektor bestehend aus pET29b Backbone, der T7 Promotor gefolgt von der wtTaspase1 Sequenz mit den TAG Mutationen an den Aminosäuren K59 und L203, dann folgt der Linker in der der zweite T7 Promotor vorzufinden ist und anschließend die codon-optimierte Taspase1 [S291A oder C163E/S291A] mit einem 6xHis-tag, in dem eine oder zwei Mutationen vorhanden sind.

Bei dieser Kombination aus wtTaspase1 und coTaspase1 kommt beim Lesen die Frage auf, wieso wurde die Kombination so gewählt? Zum einen aus einem ganz einfachen Grund, die coTaspase1 war bereits vorhanden und es hat sich angeboten diese in dem Duetvektor zu verwenden. Zum anderen ist die coTaspase1 soweit optimiert worden, dass eine optimale Kompatibilität in der *E.coli* Expression herrscht und somit die Expression des Proteins deutlich gesteigert werden konnte. Durch die erhöhte Expressionsrate der coTaspase1 ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass eine Kombination aus wtTaspase1 und coTaspase1 ein Dimer bilden. Natürlich werden bei der Expression auch unerwünschte Kombinationen entstehen, ein Teil dieser falsch kombinierten Dimere können anhand einer Metallchelataffinitätsaufreinigung eliminiert werden, da nur die coTaspase1 ein His_{6x}-tag trägt. Durch die Aufreinigung würden alle wtTaspase1-wtTaspase1 Kombinationen eliminiert werden, was den Vorteil hat, dass bei einer späteren EPR Messung keine Interferenz durch das direkt gebundene Monomer im Dimer entstehen könnte. Bezüglich der Kombination aus coTaspase1-coTaspase1 kann diese in der Messung und in der Lösung vernachlässigt werden, da diese in einer EPR Messung kein Spinlabel tragen würden und somit auch kein Signal zu erwarten wäre.

5 Diskussion

Proteasen sind unentbehrlich für viele biologischen Prozesse, einschließlich Proliferation, Zelltod, Migration und vieles mehr. Wenn diese Enzyme jedoch dysreguliert sind, tragen sie zum Fortschreiten mehrerer Krankheiten bei, wie beispielsweise Krebs oder neurodegenerative Störungen.¹²¹ Threonin-Aspartase 1 wurde ursprünglich als Protease identifiziert, die ausschließlich für die Spaltung und Aktivierung des MLL-Proteins zuständig ist. Durch die Spaltung werden die Histonmethyltransferasen MLL1 (KMT2A) und MLL2 (KMT2B) aktiviert, diese induzieren wiederum die *HOX*- und *Cyclin*-Genexpression.¹²⁴ Das MLL-Protein enthält die evolutionär konservierte Taspase1-Erkennungs- und Hydrolysestelle Q⁻³X⁻²D⁻¹•G¹X²D³D⁴ zweimal: CS1 (QVD•GADD) und CS2 (QLD•GVDD). Diese sind innerhalb der MLL-Proteinsequenzen bei 2.666/2.667 und 2.718/2.719 lokalisiert. Taspase1 zeigt eine Präferenz für CS2 gegenüber CS1 und somit verursacht die Taspase1-vermittelte Hydrolyse von MLL und erzeugt so die p320 N- und p180 C-MLL-Proteinfragmente.^{124,143} Taspase1 prozessiert nicht nur MLL1 und MLL2, sondern auch deren Fusionsproteine AF4-MLL und auch den Transkriptionsfaktor IIA (TFIIA) sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.³ Die proteolytische Spaltungsaktivierung von TFIIA ist für die männliche Spermatogenese¹²⁷, die kraniofaziale Entwicklung¹²⁸ und die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen der fetalen Leber essenziell.^{3,129} Die onkologische Relevanz der Taspase1 konnte auch für verschiedene solide Tumorentitäten nachgewiesen werden, insbesondere für Brust- und Hirntumoren.^{123,132,134,135} Die neuesten Forschungsergebnisse demonstrieren sogar eine direkte Rolle von Taspase1 bei HER2/neu-positiven Brustkrebs.^{125,134} *Balkin et al.* beobachteten erstmals Anomalien an einem weiblichen Säugling, bei dem schwere kraniofaziale Anomalien, Dysgenese des vorderen und hinteren Segments, Immunschwäche und makrozytische Anämie diagnostiziert wurde. Mittels Exom-Sequenzierungen konnte gezeigt werden, dass der Säugling heterozygot eine *de novo*-Missense-Variante im TASP1-Gen aufzeigte (Nucleotid c.1027G>A, Aminosäureaustausch p.(Val343Met).¹³⁸ Die proteolytische Spaltung von Taspase1 an MLL1 führt dabei zu einer Destabilisierung des MLL1 Proteins. Tritt der Fall ein, dass MLL1 nicht von Taspase1 verdaut wird, kommt es zu einer erhöhten Assoziation zwischen dem MLL1 und dem Chromatin. Die Ursache liegt an dem unprozessierten MLL1, das durch den Verlust der proteolytischen Spaltung durch Taspase1 an Stabilität gewinnt. Diese Stabilität des Proteins sorgt für die Verdrängung von MLL-Chimären aus dem Chromatin in Leukämiezellen. Zudem fand die Forschungsgruppe heraus, dass eine Inhibition der Casein Kinase (CKII) zu einer Blockierung der proteolytischen Spaltung durch die Taspase1 führt. Die CKII phosphoryliert im Normalfall das MLL in der Nähe der Taspase1-Spaltungsstelle, diese Phosphorylierung erleichtert die Spaltung durch die Taspase1. Wird nun das CKII blockiert, findet keine proteolytische Spaltung durch die Taspase1 statt und führt somit zur Verdrängung der MLL-Chimäre vom Chromatin.¹⁸⁶ In den meisten Fällen erzeugen die leukämogenen MLL-r Fusionsproteine, die resistent gegen den Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Abbau sind, was die onkogenen Chimären extrem stabil macht.^{187,188}

5.1 Erweiterung des HTRF Screening Assays

Taspase1 nimmt eine wichtige Rolle ein, wenn es um die Prozessierung des MLL-Gens geht. Durch die Spaltung werden die Histonmethyltransferasen MLL1 (KMT2A) und MLL2 (KMT2B) aktiviert. Diese induzieren wiederum die *HOX*- und *Cyclin*-Genexpression.¹²⁴ Die proteolytische Spaltung von MLL ist ein essenzieller Schritt für die Funktionalität des MLL Proteins, dadurch wird die Bildung des Multiproteinkomplexes initiiert und die Regulation von vielen Genen.^{124–126} Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Taspase1 in vielen soliden Tumoren überexprimiert wird.^{131,132}

Aufgrund des hohen medizinischen Bedarfs rückt die Entwicklung eines spezifischen Hemmmechanismus oder ein potenzieller Arzneistoff bzw. Inhibitor für die Taspase1 immer mehr in den Fokus. Bis heute wurden nur einige wenige Taspase1-Inhibitoren beschrieben. Diese zeigten jedoch jeweils nur eine schwache Hemmung der Taspase1 und daher hat bisher kein Inhibitor Eingang in die klinische Forschung gefunden.^{135,139,142,146,147}

Taspase1 ist kein klassisches Enzym, da es Substratproteine stöchiometrisch hydrolysiert. Klassische Hemmstoffe für Enzym adressieren entweder das katalytische Zentrum des Enzyms oder binden allosterisch. In dieser Arbeit wurden verschiedene, chemische Verbindungen getestet, darunter 1200 FDA zugelassene Arzneistoffe. Zugelassene Arzneistoffe haben den Vorteil, dass sie bereits in klinischen Studien untersucht worden sind. Zudem stehen sie unter ständiger Beobachtungen/Kontrolle der FDA (U.S. Food and Drug Administration) oder der zuständigen Arzneimittelbehörde in Deutschland BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) und anderen Behörden EU-weit. Dabei achten die Behörden auf das Nutzen-Risiken-Verhältnisses der einzelnen medizinischen Produkte, wird das Nutzen-Risiken-Verhältnis des Arzneimittels nach erteilter Zulassung ungünstig, muss das Arzneimittel vom Markt genommen werden. Für die Zulassung von einzelnen Arzneimitteln wird eine angemessene Wirksamkeit des Arzneimittels in der angestrebten Indikation gefordert. Hierfür müssen Pharma-Firmen viele Nachweise, klinische Studien und Kontrollen des Wirkstoffes durchführen. All diese Dokumente enthalten wesentlichen Informationen bezüglich des Wirkstoffes, darunter sind Informationen wie Indikation, Kontraindikation, Dosierung, Wechselwirkungen und Nebenwirkungen einschließlich der Bewertung und Abwägung vorzufinden.

Ein möglicher Inhibitor, der in einer bereits zugelassenen Arzneistoff-Bibliothek gefunden werden könnte, hätte den großen Vorteil, dass hierfür schon viele wichtige Informationen vorliegen. Die bereits existierenden Informationen der Wirksamkeit einer Verbindung könnte dann in vielerlei Hinsicht zu der Aufklärung des Wirkmechanismus bezüglich der Inhibition der Taspase1 beitragen.

In dem hier verwendeten HTRF Screening Assay wurde das *superfolder* GFP über eine Taspase1 Erkennungsstelle (CS1 oder CS2) mit einem SNAP-Terbium-Cryptat fusioniert und damit FRET Akzeptor und FRET Donor in einem Substratprotein kombiniert. Dies erlaubte die Etablierung eines HTRF-basierten Screening-Assay, bei der eine Taspase1-vermittelte Spaltung über sehr lange Zeiträume beobachtet werden konnte (mehrere Tage). In dem HTRF Screening Assay wurde anschliessend mit der in *E.coli* exprimierten wtTaspase1 getestet. Die in *E.coli*-exprimierte wtTaspase1 war bereits autokatalytisch aktiviert. Wird der Assay mit bereits aktivierter Taspase1 durchgeführt, können folglich jedoch nur Substanzen identifiziert werden, die entweder mit der Bindung des Substrates oder dessen proteolytischer Spaltung

interferieren. Die Untersuchung der Inhibition wäre aber am Effektivsten, wenn Taspase1 als Proenzym in dem vorliegenden Testsystem analysiert werden könnte, damit ein möglicher Inhibitor mit alle bereits skizzierten Stufen der Aktivierung (Dimerisierung, Autokatalyse, Substratbindung und Hydrolyse) interferieren könnte. Leider kann das nicht mit wtTaspase1 aus *E.coli* durchgeführt werden, da die Prozedur von der Proteinexpression bis zur anschließenden Aufreinigung mindestens 2 Tagen in Anspruch nimmt. Damit in dem HTRF Screening Assay Taspase1 Pro-Enzym eingesetzt werden kann, wurde ein zellfreies System zur Expression der Taspase1 angewendet. Das verwendete System basiert auf einem *E.coli* Extrakt von Promega namens *S30 T7 High-Yield Protein Expression System*.¹⁷⁶ Dieses zellfreie System ermöglichte die Expression der Taspase1 als Proenzym, bestätigt durch verschiedene WB und die direkte Nutzung des Proteins in dem Testsystem ohne eine zeitaufwendige Aufreinigung wie in einer *E.coli*-basierten rekombinanten Expression. Um sicherzugehen, dass das Proenzym nicht direkt nach der Expression aktiv wird, wurde nach der Expression der Taspase1 stündlich und nach 24 h eine Probe entnommen und über WB verifiziert. In dem WB (s. Abbildung 22) ist deutlich zu entnehmen, dass in den ersten 4 h die Taspase1 nur als Proenzym vorhanden ist und somit genügend Zeit vorhanden wäre, um diese im Testsystem mit den zu testenden Molekülen zu untersuchen. Interessanterweise ist in dem Western Blot nach 24 h eine leichte Bande der β -Untereinheit bei 22 kDa der Taspase1 zu erkennen, was dafür spricht, dass die Taspase1 bereits begonnen hat zu dimerisieren und autoproteolytisch aktiviert zu werden.

Da die Expression der Taspase1 als Pro-Enzym durch den Western Blot verifiziert wurde, konnte die exprimierte cfs-Taspase1 ohne jegliche Aufreinigung direkt im Testsystem integriert werden, jedoch stellte sich ziemlich schnell heraus, dass in dem Expressionsansatz aus dem Kit von Promega irgendeine Komponente vorhanden ist, die die Taspase1 hindert das CS2 Substrat zu prozessieren (s. Abbildung 23). Deshalb wurde als nächstes direkt nach der zellfreien Expression des Proenzym eine Proteinaufreinigung mittels Metallchelataffinitätschromatographie mit optionalem Dialyse-Schritt durchgeführt (s. Abbildung 24 und Abbildung 25). Der Test ergab sehr gute Ergebnisse, dabei war nach 24 h mit der *E.coli*-produzierten wtTaspase1 bereits ein vollständiger Verdau des Konstruktes in einem Verhältnis von 1:10 (CS2 Substrat:Taspase1) zu erkennen, während die cfs-wtTaspase1 das CS2 Substrat erst bei einem Verhältnis von zu 1:100 geschnitten hatte. Die cfs-wtTaspase1 war demnach innerhalb der ersten 24 h um ein 10-faches weniger aktiv, somit hatte ein möglicher Inhibitor genügend Zeit in den essenziellen Katalyseschritten eingreifen zu können. Dadurch ergaben sich optimale Bedingungen um ein Inhibitorscreening durchführen zu können. Nach 96 h hat die cfs-wtTaspase1 das Konstrukt bei einem Verhältnis von 1:30 vollständig verdaut im Vergleich zu 1:4 mit *E.coli*-produzierter wtTaspase1.

Ein Nachteil dieses zellfrei basierten Systems ist die geringe Proteinmenge aus der Expression, die nicht ausreicht, um die Tests an der cfs-wtTaspase1 zusammen mit allen möglichen Inhibitoren gleichzeitig durchzuführen. Die Proteinkonzentration ist zudem nach einer zellfreien Expression bei einem 50 μ l-Ansatz im 1-3 mikromolaren Bereich, leider nicht genug, um aus dieser Proteinexpression so zu verdünnen, dass damit dann ein Screen gemacht werden könnte. Um die Expression um ein Vielfaches zu steigern, wurde eine codon-optimierte Taspase1 in dem zellfreien System verwendet. Leider erwies sich dieser Schritt als eher aussichtslos, da zwar die Expression des Proenzym wie erhofft gesteigert wurde (s. Abbildung 26), jedoch führte diese Erhöhung der Proteinexpression zu einer schnelleren Aktivierung der Taspase1, da nun mehr Protein produziert wurde und die Monomere sich schneller in der Lösung gefunden haben und dimerisieren konnten (s. Abbildung 28). Somit wurde letztendlich

das Volumen für die zellfreie Expression von Taspase1 auf das 9-fache Volumen erhöht, ausgehend von dem eigentlich vom Hersteller angegebenen Standardvolumen von 50 µl je Ansatz. Damit es von dem Volumen ausreicht eine 384-Well Platte zu füllen, wird diese nach der Aufreinigung in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Somit ergeben sich folgende finale Arbeitsschritte, zunächst wird die 9-fache Menge des cf-System (450 µl) eingesetzt, um genug Protein zu exprimieren, danach folgt ein 30 minütiger Verdau mit RNase A und DNase I und dann eine His-tag Aufreinigung in deren letzten Schritt die Taspase1 in 450 µl eluiert wird. Nach der Aufreinigung wird das Protein 1:10 verdünnt und direkt im HTRF Screening Assay eingesetzt. Dieser Ablauf erwies sich für das HTRF Screening Assay als äußerst effektiv.

Zusammenfassend berücksichtigt das Testsystem den molekularen Mechanismus der Taspase1. Dadurch, dass die Wirkstoffe bereits vor deren auto-proteolytischer Reifung mit der Taspase1 in Kontakt kommen, kann ein potenzieller Inhibitor die Taspase1 in verschiedenen Schritten blockieren. Hierbei könnte die Taspase1 in ihrer inaktiven Vorläuferform gestört werden, indem der Inhibitor kovalent bindet oder durch van-der-Waals Wechselwirkung mit dem Monomer interagiert, oder aber während der Dimerisierung und/oder der autokatalytischen Reifung eingreift. Mit dem Testsystem wurden zwei Voraussetzungen geschaffen: ein sensitives Assay-System, das es ermöglicht, die Taspase1-Aktivität über 2 – 24 h zu überwachen (HTRF-Assay) sowie die Produktion von Taspase1 in einem zellfreien System zur Erzeugung mit einem noch nicht ausgereiftem Enzym. Beim Screening auf potenzielle Inhibitoren wird die cfs-wtTaspase1 verwendet, die zunächst eine Autoaktivierung durchlaufen muss, bevor eine CS2-Spaltung erfolgen kann.

5.2 Vielversprechender Inhibitor Closantel sodium

Lee et al. untersuchte 2009 Inhibitoren für die Taspase1, basierend auf Vinylsulfon und Vinylketon-Verbindungen. Diese Studie demonstrierte, dass Taspase1 in der Lage ist Inhibitoren zu binden, die eine reaktive funktionelle Gruppe entweder am Hauptpeptid-rückgrat oder an der P1-Seitenkette besitzen. Die Verbindungen entpuppten sich als nicht hochwirksam, dienten jedoch als Ausgangspunkt für das Design von weiteren Inhibitoren.¹³⁹

Ein weiterer Inhibitor für Taspase1 ist (4-[(4-arsonophenyl)methyl]phenyl) Arsensäure (NSC48300). Abgesehen von seiner Toxizität, ist NSC48300 als ein reversibler, nicht kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von 4,22 µM charakterisiert worden. In einem MMTV-neu-Mausmodell für Brustkrebs und im U251-Xenotransplantatmodell für Hirntumor erzeugte NSC48300 eine wirksame Hemmung des Tumorwachstums.¹³⁵ Getestet wurde ebenfalls eine erzwungene Expression inaktiver Taspase1-Mutanten mit dem Ziel hierdurch die Bildung aktiver Taspase1-Dimere zu hemmen, jedoch erwies sich diese Strategie als nicht erfolgreich.¹⁴⁰ *Van den Boom et al.* haben Taspase1-Inhibitoren beschrieben, die auf einem Peptidylsuccinimidylpeptidmotiv basierten. Diese Inhibitoren wurden an die Substratspaltungssequenz des MLLs angepasst, bei der die aktivste Verbindung Taspase1 im submikromolaren Bereich hemmte.¹⁴¹ *Van den Boom et al.* zeigten kürzlich ebenfalls, dass amorphe Silica-Nanopartikel Taspase1 nicht nur binden, sondern auch die proteolytische Aktivität von inhibieren kann. Bemerkenswert ist die Bindung und Hemmung von Taspase1 im nanomolaren Konzentrationsbereich, was darauf deutet, dass jedes Taspase1-Molekül an ein Nanopartikel gebunden ist und in seiner biologischen Aktivität stark beeinträchtigt ist.¹⁴²

Ziel dieser Arbeit war es einen möglichen Inhibitor für die Taspase1 zu finden, erreicht werden sollte dies durch das vorherige entwickeln und etablieren eines auf HTRF basierenden

Testsystems. Tatsächlich ermöglichte dieses Testsystem die Untersuchung der Hemmung von Taspase1 bzw. die Identifizierung eines möglichen Inhibitors. In dem HTRF Testsystem, bei der die Taspase1 zuvor zellfrei als Proenzym exprimiert wird, kann über einen längeren Zeitraum (bis zu 96 h) die Untersuchung überwacht werden. Mit diesem Testsystem wurden mehrere Substanzbibliotheken untersucht. Die vielversprechendsten Verbindungen entstammten der Bibliothek der FDA zugelassener Medikamente, welche auch Closantel sodium enthält, das als potenzieller Inhibitor identifiziert wurde. Closantel sodium wurde mit einigen anderen Medikamenten wie Primaquine oder Tetracyclin-Derivate als positiver Treffer identifiziert (s. Abbildung 31). Die einzelnen Wirkstoffe wurde erworben, um damit weitere Untersuchung durchzuführen. Leider erwiesen sich die Tetracyclin-Derivate und Tetracyclin selbst als falsch positive Treffer. Bei genauerer Auswertung der Screening Daten zeigten Tetracycline HCl und Derivate ein verstärktes Akzeptor- & Donorsignal. Das verstärkte Signal wurde durch die zusätzliche Anregung des Tetracyclins und Derivate selbst bei 340 nm verursacht (Absorption des Tetracyclins bei ca. 320 nm). Im späteren Verlauf erwies sich Primaquine ebenfalls als falsch positiv. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass im ersten Testdurchlauf mögliche Abbauprodukte vorhanden waren, ausgelöst durch physiologischen pH oder durch Sauerstoff abhängige Reaktionsmechanismen¹⁸⁹⁻¹⁹¹, die zu einer partiellen Hemmung der Taspase1-Aktivität führten. Da die meisten Treffer sich als falsch positiv oder als nicht mehr effektiv erwiesen, blieb nur noch Closantel sodium übrig. Closantel ist ein von der FDA zugelassenes Breitspektrum Salicylsäureanilid. Das antiparasitäre Medikament wirkt gegen mehrere adulte und in verschiedenen Entwicklungsstadien von Trematoden, Nematoden und Arthropoden. Eingesetzt wird es der Bekämpfung von *Fascioliasis* (Leberegel) bei Schafen und Rindern.¹⁵⁶ Closantel wirkt über den Energiestoffwechsel, indem es die oxidative Phosphorylierung in Leberegeln entkoppelt.¹⁵⁷ Nach oraler Aufnahme bei Tieren wird die maximale Plasmakonzentration in 8–48 Stunden erreicht und die Verbindung hat eine Eliminationshalbwertszeit von etwa 2–3 Wochen. Closantel wird schlecht metabolisiert und seine Gewebeverteilung ist durch seine starke Proteinbindung begrenzt.¹⁵⁸ Seine Pharmakokinetik beim Menschen ist noch unbekannt.¹⁵⁹ Es gab mehrere Berichte, dass eine Überdosierung von Closantel bei Menschen und verschiedenen Tieren Spezies eine Netzhautdegeneration induzieren kann.^{157,159,170,171} 2016 veröffentlichte *Zhu et al.* einen interessanten Artikel, bei dem Closantel die Angiogenese in Zebrafischen (Tg (fli1a: EGFP) Zebrafischlinie¹⁹² bei der verstärkte endothel-spezifische Expression im Gefäßsystem durch ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP) sichtbar ist) mit einem IC₅₀ von 1,69 µM unterbindet, während bei intersegmentalen und subintestinal Gefäße mit 1,45 µM inhibiert. Zudem erwies sich Closantel in der Studie als Antikrebsmittel. Um das Antikrebspotenzial von Closantel durch Antiangiogenese im Prozess des Krebswachstums und der Metastasierung zu untersuchen, wurden xenotransplantierte-Zebrafische mit menschlichen Ramos-, HeLa-, PANC-1- oder HepG2-Zellen verwendet. Nach der Behandlung mit Closantel, zeigten sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe, kleinere Metastasierungsbereiche. Alle xenotransplantierten Krebszellen, die behandelt worden sind durch Zugabe von Closantel in das Fischwasser, hatten eine offensichtlich verringerte Fluoreszenzintensität, was darauf hinweist, dass Closantel die Migration, Proliferation und/oder Metastasierung von menschlichen Ramos-, HeLa-, PANC-1- und HepG2-Krebszellen in xenotransplantierten-Zebrafischen unterdrücken kann.¹⁶⁹

5.3 Charakterisierung der Interaktion von Closantel sodium und Taspase1

Im Screening wurden niedermolekulare Substanzen getestet, um deren biologische Aktivität auf Taspase1 zu bestimmen. Als am vielversprechendsten erwies sich das FDA zugelassene Medikament Closantel sodium, welches bereits im Screen äußerst effektiv die Taspase1 hemmte. Nach dem Screening wurde eine Dosis-Wirkungskurve aufgenommen, um den IC_{50} von Closantel sodium sowohl für cfs-wtTaspase1 als auch für in *E.coli*-produzierte wtTaspase1 zu bestimmen. Closantel sodium wurde in einem Bereich zwischen 0 und 12,5 μM (Verdünnungsreihe 12.5 μM > 1:2) getestet und hemmte beide Taspase1-Präparate, cfs-wtTaspase1 mit einer IC_{50} von ca. 1.6 μM und die *E.coli*-produzierte wtTaspase1 mit einem IC_{50} von ca. 3.9 μM . Eingesetzt wurde 1 nM CS2-Konstrukt und ca. 30 nM cfs-wtTaspase1 und 100 nM *E.coli*-produzierte wtTaspase1. Die Konzentrationen von den Taspasen konnte vorher nicht angepasst werden, da in dem zellfrei basierten System vorher nicht bekannt ist, wie viel Protein genau exprimiert wird. Nach der Expression und Aufreinigung wird das Protein direkt im HTRF Assay eingesetzt und die exakte Konzentration wird erst im Nachhinein über eine BCA Proteinbestimmung genau bestimmt.

Closantel sodium hemmte also die Spaltung des CS2-Substratproteins mit einem IC_{50} zwischen 1,6 und 3,9 μM , je nachdem, welches Taspase1-Präparat wir in unserem Assay verwendeten (cfs- oder *E.coli*-produziert). Die Hemmung konnte ebenfalls durch einen Western Blot verifiziert werden, der deutlich demonstriert, dass ab einer Konzentration von 3.1 μM das CS2 Substrat mit einer Größe von 47 kDa nicht mehr von der Taspase1 verdaut wird (Abbildung 34). Closantel sodium hemmte eindeutig bereits autoaktivierte Taspase1, zeigte jedoch eine wesentlich höhere Wirksamkeit bei noch nicht durchgereifter Taspase1. Zudem fällt auf, dass die Hemmung der cfs-produzierten Taspase1 durch einen sehr hohen *Hillslope* gekennzeichnet ist (s. Abbildung 33), was auf Kooperation hindeutet. Der *Hillslope* beschreibt die Steigung der sigmoidalen Kurve in der Dosis-Wirkungskurve. Eine Steigung von mehr als 1 zeigt eine positive Kooperativität zwischen dem Enzym und dem Liganden an, während eine Steigung von weniger als eins eine negativ kooperative Bindung anzeigt. Ein *Hillslope* $\gg 1$ ist ein Hinweis darauf, dass der beobachtete Effekt (hier in diesem Fall der Verdau von CS2 bzw. Hemmung dessen) durch Prozesse beeinflusst wird, die sich kooperativ verstärken.

Aufgenommene MALDI Spektren von Taspase1 in Kombination mit Closantel sodium als auch vom CS2 Substrat in Kombination mit Closantel sodium zeigten keine Adduktbildung, was darauf schließen lässt, dass Closantel sodium weder an Taspase1 noch an das CS2 Substrat kovalent bindet. ITC Versuche weisen ebenfalls darauf hin, dass keine kovalente Bindung zwischen Taspase1 und Closantel sodium herrscht. Die ITC Versuche zeigten, dass die Anwesenheit von 12.5 μM Closantel sodium eine drastisch verminderte Bindung von CS2 durch Taspase1 bewirkt; Verringerung der Bindungsenthalpie auf etwa 1/3 (s. Abbildung 39). Die Verringerung der Bindungsenthalpie ist ein Hinweis darauf, dass Closantel sodium in irgendeiner Art und Weise Taspase1 daran hindert das Substrat zu binden, wie genau muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Weiterhin sollte die Spaltung eines CS2-Substrats in einem zellbasierten Experiment untersucht werden. Hierfür HEK293T-Zellen mit der wtTaspase1 (Proteinexpression wird mit Doxycyclin induziert) und dem GFP-CS2-BFP Substrat-Konstrukt (konstitutive Expression) stabil transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Substrat-Konstrukt und ohne wtTaspase1 transfiziert. Die Zellen wurden über 48 h mit Closantel sodium behandelt, dann geerntet und mittels Western Blot die Proteinexpression analysiert. Der Western Blot zeigt, dass die Behandlung mit Closantel sodium zu einer Verringerung des Anteils an gespaltenem Substratprotein führt. Je höher die Konzentration ist, desto mehr nimmt die Intensität der 26 kDa Bande ab. Die positive Kontrolle bestätigt den Verdau des Substrats

(siehe 26 kDa GFP-CS2 gespaltenes Proteinfoagment), während die negative Kontrolle eine verringerte 26 kDa Bandenintensität zeigt. Die leichte 26 kDa Bande bei der Negativkontrolle erklärt sich aus der endogenen Taspase1, die in den HEK293T natürlicherweise exprimiert wird und dementsprechend ebenfalls das CS2 Substrat prozessieren kann. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass Closantel sodium auf intakten Zellen wirkt, da es offensichtlich in das Zellinnere gelangt und dort die Taspase1 in niedrigen mikromolaren Konzentrationen (MW 685.1) hemmt.

Aus den Daten ergibt sich die These, dass mehrere Hemmmechanismen miteinander verbunden sein müssen, die nur bei der noch nicht durchgereiften Taspase1 relevant sind. Höchstwahrscheinlich verhindert Closantel sodium entweder die Dimerisierung oder die Konformationsumlagerungen, die für die Aktivierung der intrinsischen Serinproteasefunktion erforderlich sind, die zur Spaltung der p50-Taspase1 in die p28- und p22-Untereinheiten des aktivierten Taspase1-Enzyms führt. In Anbetracht der Tatsache, dass das Pro-Enzym die noch nicht aktive Zentrum der durchgereiften, aktivierten Taspase1 besitzt, weisen die Daten darauf hin, dass Closantel sodium höchstwahrscheinlich als allosterischer Inhibitor fungiert. Bei einer allosterischen Hemmung bindet der Inhibitor nicht im aktiven Zentrum, sondern in der Nähe des aktiven Zentrums. Dadurch wird die Konformation des Enzyms gestört, sodass das Substrat nur erschwert oder gar nicht prozessiert werden kann.

Zukünftige Arbeit muss getan werden, um diesen Hemmmechanismus weiter zu untersuchen. Zum einen sollte eine hochauflösende Struktur von Taspase1 im Komplex mit Closantel sodium erzielt werden. Dies könnte Einblicke in den Wirkmechanismus geben und neue Wege eröffnen, um wirksamere Inhibitoren zu designen. Closantel sodium ist bereits ein zugelassenes Medikament, und daher sind Daten zur pharmakologischen Charakterisierung leicht verfügbar. Zusammenfassend wurde Closantel sodium als erster allosterischer Inhibitor der humanen Taspase1 identifiziert.

Closantel sodium wird als erster allosterisch wirkender und gut zellgängiger Inhibitor der Taspase1 sehr nützlich für zukünftige Studien sein in denen das pharmakologische Potenzial einer Inhibition von Taspase1 nun weiter untersucht und validiert werden kann.

6 Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau eines Röhrenknochens. Modifiziert nach ⁸	3
Abbildung 2 Hämatopoetisches System	4
Abbildung 3 Relative Häufigkeiten der an das DKKR gemeldeten Erkrankungsfälle nach Diagnose- Hauptgruppen Säuglinge, Kinder und Jugendliche < 18 Jahren, Daten aus dem Jahresbericht ¹	5
Abbildung 4 Chromosomale Translokation t(9;22) alias Philadelphia Chromosom	6
Abbildung 5 Schemata der t(4;11) Translokation mit entsprechendem Karyogramm.....	7
Abbildung 6 Verteilung der MLL-Translokationen in Säuglingen, Kindern und Erwachsenen	8
Abbildung 7 Aufbau des MLL-Proteins mit den Schnittstellen CS1 und CS2 und der <i>Breakpoint Cluster Region</i>	9
Abbildung 8 Proteolytische Spaltung des MLL-Proteins	10
Abbildung 9 Taspase1 Heterotetramer.....	17
Abbildung 10 Konformationsänderung der Taspase1 auf Basis der Kristallstruktur nach Khan et al. (2005).....	18
Abbildung 11 Die Dimerisierung als Schlüsselereignis für den Aktivierungsmechanismus	19
Abbildung 12 Absorptionsspektrum von Terbium und Europium Cryptat ¹⁵¹	21
Abbildung 13 Strukturformel Closantel sodium	21
Abbildung 14: FRET-Schema im HTRF Assay	41
Abbildung 15 Substratkonstrukt Tb-SNAP-CS2-sGFP für die HTRF-Methode	48
Abbildung 16 Auswertung des etablierten HTRF Screening Assay.....	49
Abbildung 17 Beobachtung des katalytischen Zustands der wtTaspase1 in Abhängigkeit der Zeit.....	50
Abbildung 18 Zustandsmöglichkeiten während der HTRF Screening Assays	51
Abbildung 19 Getestete PPI Verbindungen.....	52
Abbildung 20 Nickelaffinitätschromatographie (NiIDA) und Größenausschlusschromatographie (SEC)	53
Abbildung 21 Zeitspanne einer rekombinanten Proteinexpression im Vergleich zu dem zellfrei basiertem System	54
Abbildung 22 Western Blot der Proteinexpression durch das zellfrei basierte System	54
Abbildung 23 Integration des cf-System in das HTRF Screening Assay	55
Abbildung 24 Arbeitsschritte mit dem integrierten zell-frei basierten System	56
Abbildung 25 Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivität der cfs-wtTaspase1 im Vergleich zu der <i>E.coli</i> -produzierten wtTaspase1 im HTRF Screening Assay	57
Abbildung 26 HTRF Screening Assay mit coTaspase1, cfs-wtTaspase1 und <i>E.coli</i> -wtTaspase1 bei unterschiedlichen Zeitpunkten	59
Abbildung 27 Western Blot von coTaspase1 und wtTaspase1 aus dem cf-System.....	60
Abbildung 28 Zeitverlauf der Autoproteolyse der coTaspase1 in dem zellfrei exprimierten System	60
Abbildung 29 Auswirkung des Dialyse-Schrittes im HTRF Screening Assay	62
Abbildung 30 Optimierter endgültiger HTRF Screening Assay.....	63
Abbildung 31 FDA zugelassene Arzneimittel die HTRF Screening einen positiven Effekt aufwiesen....	65
Abbildung 32 Dose Response mit den positiven Treffern aus dem HTRF Screening Assay	66
Abbildung 33 Dose Response für die cfs-wtTaspase1 und für die <i>E.coli</i> -produzierte wtTaspase1	67
Abbildung 34 Verifizierung der proteolytischen CS2-Spaltung über Western Blot.....	68

Abbildung 35 Einfluss verschiedene Closantel sodium Konzentration auf die <i>E.coli</i> -produzierte wtTaspase1.....	69
Abbildung 36 Methode nach MALDI-TOF	70
Abbildung 37 Massenspektrum von dem wtTaspase1 ohne und mit Closantel sodium.....	70
Abbildung 38 Massenspektrum von dem CS2 Konstrukt ohne und mit Closantel sodium.....	71
Abbildung 39 ITC Messung von CS2 mit wtTaspase1 mit und ohne Closantel sodium	72
Abbildung 40 Transfizierte Zelllinien für den zellbasierten Versuch	73
Abbildung 41 Zytotoxizitätstest von Closantel sodium auf HEK293T	74
Abbildung 42 Nachweis des inhibitorischen Effekts von Closantel sodium auf wtTaspase1.....	75
Abbildung 43 Mikroskop Bilder aus den Kristallisationsplatten.....	77
Abbildung 44 Konformationsänderung basierend auf die publizierten Kristallstrukturen.....	78
Abbildung 45 Amber Codon Suppression	79
Abbildung 46 Ortsspezifische Mutationen - Amber Stopcodon.....	79
Abbildung 47 Duetvektor mit pET29b mit wtTaspase1 (59/203 TAG Mutationen)-linker-coTaspase1 [S291A oder C163E/S291A]	81
Abbildung 48 Vektor 10xHis-TEV-SNAP(T7)tag2-CS2(MLL)-sGFP	102
Abbildung 49 Vektor pET22b(+) wtTaspase1	103
Abbildung 50 Vektor pET22b(+) coTaspase1.....	104
Abbildung 51 Vektor pITR EZP BFP-CS2-GFP	105
Abbildung 52 Vektor pITR TCTH wtTaspase1	106
Abbildung 53 ITC Spektrum von wtTaspase1 in HTRF Puffer mit/ohne Closantel sodium.....	108
Abbildung 54 ITC Spektrum von CS2 und wtTaspase1 mit/ohne Closantel sodium.....	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auftretende Chromosomenmutationenen	6
Tabelle 2 Zusammensetzung von Tricin-SDS Trenngel (12%) und Sammelgel (für 4 Gele)	31
Tabelle 3 PCR-Ansatz bei einer gerichteten Mutagenese, sowie thermozyklische Konditionen	35
Tabelle 4 Thermozyklisches Programm für die Amplifizierung der DNA in der DNA-Sequenzierung.....	36
Tabelle 5 Messkonditionen für das HTRF Assay	42
Tabelle 6 Zusammensetzung für das Screening-Assay (in Triplikaten, mit 112 FDA AM).....	43
Tabelle 7 Expressionsansatz von S30 T7 High-Yield Protein Expression System.....	43
Tabelle 8 Getesteten Standardpufferbedingungen auf Kristallisationsplatten (vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp erworben)	45
Tabelle 9 Transfektionsansatz mit Metafecten	46
Tabelle 10 Zusammensetzung der Komponenten im HTRF Screening Assay	64
Tabelle 11 Getesteten Standardpufferbedingungen auf Kristallisationsplatten (vom Arbeitskreis Prof. Dr. Knapp erworben)	76

Formelverzeichnis

Formel 1 Berechnung der Energietransferrate und Energieeffizienz	20
Formel 2 – Berechnung des HTRF-Signals.....	42
Formel 3 – Berechnung des z-Faktors.....	43
Formel 4 Berechnung ungeschnittenes Substrat im HTRF Assay	64

7 Abkürzungsverzeichnis

aa oder AS	amino acid oder Aminosäure
Abb	Abbildung
AF4	Humane Gene
Amp	Ampicillin
BCR	Break Cluster Region
Bp	Base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CDK-Inhibitor	Cyclin dependent kinase
cfs	<i>Cell-free</i> System
Chloramp	Chloramphenicol
coTaspase1	Codon optimierte Taspase1
CHAPS	Chaperone
CS	Cleavage site
Da	Dalton
D.h.	Dass heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et. al.	Und andere
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDA AM	FDA Arzneimittel
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FT	Flowthrough
g	Gramm
h	Stunde
HEK293t	Human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTRF	Homogeneous time resolved fluorescence
H3K4	Histon3-Lysine4
IC50	Inhibitory concentration for 50%
InChI	International Chemical Identifier
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
	Kanamycin

Kan	Kaliumfluorid
KF	Konzentration
Konz.	Long-Distance Polymerase Kettenreaktion
LDI-PCR	Luria-Bertani
LB	Proteinmarker
M	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Mes	Minute
Min	Magnesiumsulfat
MgSO ₄	Mixed lineage leukemia
MLL	Natriumchlorid
NaCl	Natriumdihydrogenphosphat
NaP _i	Non-homologous end joining-System
NHEJ-System	Nanometer
nm	Optische Dichte
OD	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAGE	Polymerase Kettenreaktion
PCR	Rotation per minutes
rpm	Raumtemperatur
RT	Siehe
s.	sodium dodecyl sulfate;
SDS	Sekunde
Sec	Superfolder Green Fluorescent Protein
sGFP	Salz-optimiertes Medium mit Glukose
SOC	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SMILES	Trans-dominat negative
Tdn	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEMED	Tobacco Etch Virus
TEV	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris	Volumen pro Volumen
v/v	Wildtyp
Wt	Wildtyp Taspase1
wtTasp	Masse pro Volumen
W/v	Mikromolar
μM	Mikroliter
μL	

8 Literaturverzeichnis

1. DeutschesKinderkrebsregister. *Jahresbericht / Annual Report 2019 German Childhood Cancer Registry*. (2020).
2. Oshimura, M., Freeman, A. I. & Sandberg, A. A. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXVI. Binding studies in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer* **40**, 1161–1172 (1977).
3. Zhou, H. *et al.* Uncleaved TFIIA Is a Substrate for Taspase 1 and Active in Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2728–2735 (2006).
4. DKMS GmbH. Über die DKMS. <https://www.dkms.de/informieren/ueber-die-dkms> (2021).
5. Kampen, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk. Res.* **36**, 6–13 (2012).
6. Prinz, C. *Basiswissen Innere Medizin: mit 81 Tabellen ; [Fallquiz]*. (Springer, 2012).
7. Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. *Immunologie für Einsteiger*. (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-662-44843-4.
8. Aufbau eines Röhrenknochens. <https://online.seterra.com/de-an/vgp/3832> (2021).
9. Boujard, D., Anselme, B., Cullin, C. & Raguénès-Nicol, C. *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-41761-0.
10. Lilleyman, J. S., Hann, I. M., Stevens, R. F., Eden, O. B. & Richards, S. M. French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance. *J. Clin. Pathol.* **39**, 998–1002 (1986).
11. Slany, R. K. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* **94**, 984–993 (2009).
12. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
13. Vardiman, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 16–20 (2010).
14. Lyengar, V. & Shimanovsky, A. Leukemia. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
15. Nowell, P. C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* **8**, 65–66 (1962).
16. Rowley, J. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 245–250 (2001).
17. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
18. de Klein, A. *et al.* A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **300**, 765–767 (1982).
19. Reichel, M. *et al.* Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* **17**, 3035–3044 (1998).
20. Buselmaier, W. & Tariverdian, G. *Humangenetik: mit 162 Tabellen*. (Springer Medizin, 2007).
21. *Spezieller Teil: solide Tumoren, Lymphome, Leukämien ; mit 483 Tabellen*. (Hiddemann, 2010).
22. Marschalek, R. Genetische Grundlagen von Leukämie-Erkrankungen: Gravierende Folgen chromosomaler Translokationen. *Pharm. Unserer Zeit* **41**, 190–195 (2012).
23. Ford, A. M. *et al.* In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* **363**, 358–360 (1993).
24. Hayne, C. C. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia with 4;11 translocation analyzed by a multi-modal strategy of conventional cytogenetics, FISH, morphology, flow cytometry and molecular genetics, and review of the literature. *Exp. Mol. Pathol.* **81**, 62–71 (2006).

25. Montes, R. *et al.* Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* **117**, 4746–4758 (2011).
26. Bursen, A. *et al.* The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* **115**, 3570–3579 (2010).
27. Gale, K. B. *et al.* Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13950–13954 (1997).
28. Pui, C. H. Acute leukemias with the t(4;11)(q21;q23). *Leuk. Lymphoma* **7**, 173–179 (1992).
29. Behm, F. G. *et al.* Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* **87**, 2870–2877 (1996).
30. Schoch, C. *et al.* AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* **102**, 2395–2402 (2003).
31. Tamai, H. & Inokuchi, K. 11q23/MLL Acute Leukemia : Update of Clinical Aspects. *J. Clin. Exp. Hematop.* **50**, 91–98 (2010).
32. Felix, C. A. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 233–255 (1998).
33. Meyer, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* **32**, 273–284 (2018).
34. Heerema, N. A. *et al.* Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children’s cancer group. *Blood* **94**, 4036–4045 (1999).
35. Meyer, C. *et al.* New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **23**, 1490–1499 (2009).
36. Reichel, M. *et al.* Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res.* **59**, 3357–3362 (1999).
37. Reichel, M. *et al.* Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* **20**, 2900–2907 (2001).
38. Grimwade, D. *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children’s Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**, 2322–2333 (1998).
39. Meyer, C. *et al.* Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 449–454 (2005).
40. Guenther, M. G. *et al.* Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8603–8608 (2005).
41. Zeleznik-Le, N. J., Harden, A. M. & Rowley, J. D. 11q23 translocations split the ‘AT-hook’ cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10610–10614 (1994).
42. Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E. & Korsmeyer, S. J. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10632–10636 (1998).
43. Tkachuk, D. C., Kohler, S. & Cleary, M. L. Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**, 691–700 (1992).
44. Marschalek, R. *et al.* The Structure of the Human ALL-1/MLL/HRX Gene. *Leuk. Lymphoma* **27**, 417–428 (1997).
45. Nilson, I. *et al.* Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br. J. Haematol.* **93**, 966–972 (1996).
46. Meyer, C. *et al.* Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biotechnol. J.* **1**, 656–663 (2006).

47. Marschalek, R. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Ann. Lab. Med.* **36**, 85–100 (2016).
48. Rössler, T. & Marschalek, R. An alternative splice process renders the MLL protein either into a transcriptional activator or repressor. *Pharm.* **68**, 601–607 (2013).
49. Yokoyama, A. & Cleary, M. L. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* **14**, 36–46 (2008).
50. Yano, T. *et al.* Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7286–7291 (1997).
51. Ayton, P. M., Chen, E. H. & Cleary, M. L. Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10470–10478 (2004).
52. Muntean, A. G. *et al.* The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell* **17**, 609–621 (2010).
53. Fair, K. *et al.* Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3589–3597 (2001).
54. García-Alai, M. M., Allen, M. D., Joerger, A. C. & Bycroft, M. The structure of the FYR domain of transforming growth factor beta regulator 1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **19**, 1432–1438 (2010).
55. Milne, T. A. *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell* **10**, 1107–1117 (2002).
56. Eidahl, J. O. *et al.* Structural basis for high-affinity binding of LEDGF PWWP to mononucleosomes. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3924–3936 (2013).
57. Cosgrove, M. S. & Patel, A. Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J.* **277**, 1832–1842 (2010).
58. Chang, P.-Y. *et al.* Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription. *J. Mol. Biol.* **400**, 137–144 (2010).
59. Hsieh, J. J.-D., Cheng, E. H.-Y. & Korsmeyer, S. J. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**, 293–303 (2003).
60. Slany, R. K. The molecular mechanics of mixed lineage leukemia. *Oncogene* **35**, 5215–5223 (2016).
61. Domer, P. H. *et al.* Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. **90**, 7884-7888. (1993).
62. Gu, Y. *et al.* The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* **71**, 701–708 (1992).
63. Tkachuk, D. C., S. Kohler. & Cleary., M. L. Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**:691–700. *Cell* **71** 671–700 (1992).
64. Chan, A. K. N. & Chen, C.-W. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 81 (2019).
65. Felix, C. A. *et al.* Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Mol. Diagn. J. Devoted Underst. Hum. Dis. Clin. Appl. Mol. Biol.* **4**, 269–283 (1999).
66. Strick, R., Strissel, P. L., Borgers, S., Smith, S. L. & Rowley, J. D. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4790–4795 (2000).
67. Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A. & Korsmeyer, S. J. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**, 505–508 (1995).
68. Mishra, B. P. *et al.* The histone methyltransferase activity of MLL1 is dispensable for hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell Rep.* **7**, 1239–1247 (2014).
69. Li, Y. *et al.* Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature* **530**, 447–452 (2016).

70. Rao, R. C. & Dou, Y. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 334–346 (2015).
71. Chen, Y. *et al.* MLL2, Not MLL1, Plays a Major Role in Sustaining MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **31**, 755-770.e6 (2017).
72. Butler, L. H., Slany, R., Cui, X., Cleary, M. L. & Mason, D. Y. The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* **89**, 3361–3370 (1997).
73. Hess, J. L., Yu, B. D., Li, B., Hanson, R. & Korsmeyer, S. J. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**, 1799–1806 (1997).
74. Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A. J., Zon, L. I. & Korsmeyer, S. J. An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr. Biol. CB* **14**, 2063–2069 (2004).
75. McMahon, K. A. *et al.* Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **1**, 338–345 (2007).
76. Yagi, H. *et al.* Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* **92**, 108–117 (1998).
77. Nguyen, A. T., He, J., Taranova, O. & Zhang, Y. Essential role of DOT1L in maintaining normal adult hematopoiesis. *Cell Res.* **21**, 1370–1373 (2011).
78. Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I. & Cleary, M. L. A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer Cell* **17**, 198–212 (2010).
79. Bernt, K. M. *et al.* MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell* **20**, 66–78 (2011).
80. Lin, C. *et al.* AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol. Cell* **37**, 429–437 (2010).
81. Shilatifard, A., Lane, W. S., Jackson, K. W., Conaway, R. C. & Conaway, J. W. An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* **271**, 1873–1876 (1996).
82. Luo, Z., Lin, C. & Shilatifard, A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 543–547 (2012).
83. Yamaguchi, Y. *et al.* NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41–51 (1999).
84. Peterlin, B. M. & Price, D. H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol. Cell* **23**, 297–305 (2006).
85. Smith, E., Lin, C. & Shilatifard, A. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev.* **25**, 661–672 (2011).
86. Marschalek, R. DCAL-Homepage. <http://web.uni-frankfurt.de/fb14/dcal/page1.html> (2013).
87. Burmeister, T. *et al.* NUP214-ABL1 in adult T-ALL: the GMALL study group experience. *Blood* **108**, 3556–3559 (2006).
88. Burmeister, T. *et al.* The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. *Blood* **113**, 4011–4015 (2009).
89. Van der Velden, V. H. J. *et al.* Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* **23**, 1073–1079 (2009).
90. Stam, R. W. *et al.* Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **101**, 1270–1276 (2003).
91. Pieters, R. *et al.* Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia--implications for treatment of infants. *Leukemia* **12**, 1344–1348 (1998).
92. Ramakers-van Woerden, N. L. *et al.* In vitro drug-resistance profile in infant acute lymphoblastic leukemia in relation to age, MLL rearrangements and immunophenotype. *Leukemia* **18**, 521–529 (2004).

93. White, J. C., Rathmell, J. P. & Capizzi, R. L. Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J. Clin. Invest.* **79**, 380–387 (1987).
94. Wiley, J. S., Jones, S. P., Sawyer, W. H. & Paterson, A. R. Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J. Clin. Invest.* **69**, 479–489 (1982).
95. Spijkers-Hagelstein, J. a. P., Mimoso Pinhanços, S., Schneider, P., Pieters, R. & Stam, R. W. Src kinase-induced phosphorylation of annexin A2 mediates glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **27**, 1063–1071 (2013).
96. Marschalek, R. *Akute Hochrisiko-Leukämie bei Kindern*. 40–42 <https://core.ac.uk/download/pdf/14506763.pdf> (2004).
97. Mackarehtschian, K. *et al.* Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**, 147–161 (1995).
98. Stirewalt, D. L. & Radich, J. P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 650–665 (2003).
99. Stam, R. W. *et al.* Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **106**, 2484–2490 (2005).
100. Salzer, W. L. *et al.* Decreased induction morbidity and mortality following modification to induction therapy in infants with acute lymphoblastic leukemia enrolled on AALL0631: a report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* **62**, 414–418 (2015).
101. Cooper, T. M. *et al.* A Phase I Study of Quizartinib Combined with Chemotherapy in Relapsed Childhood Leukemia: A Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 4014–4022 (2016).
102. Brown, P., Levis, M., McIntyre, E., Griesemer, M. & Small, D. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* **20**, 1368–1376 (2006).
103. Prelle, C., Bursen, A., Dingermann, T. & Marschalek, R. Secondary mutations in t(4;11) leukemia patients. *Leukemia* **27**, 1425–1427 (2013).
104. Driessen, E. M. C. *et al.* Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* **98**, 937–944 (2013).
105. Kerstjens, M. *et al.* MEK inhibition is a promising therapeutic strategy for MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia patients carrying RAS mutations. *Oncotarget* **8**, 14835–14846 (2017).
106. Garrido Castro, P. *et al.* The HDAC inhibitor panobinostat (LBH589) exerts in vivo anti-leukaemic activity against MLL-rearranged acute lymphoblastic leukaemia and involves the RNF20/RNF40/WAC-H2B ubiquitination axis. *Leukemia* **32**, 323–331 (2018).
107. Tonelli, R. *et al.* G1 cell-cycle arrest and apoptosis by histone deacetylase inhibition in MLL-AF9 acute myeloid leukemia cells is p21 dependent and MLL-AF9 independent. *Leukemia* **20**, 1307–1310 (2006).
108. Stumpel, D. J. P. M. *et al.* Connectivity mapping identifies HDAC inhibitors for the treatment of t(4;11)-positive infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **26**, 682–692 (2012).
109. Bhatla, T. *et al.* Epigenetic reprogramming reverses the relapse-specific gene expression signature and restores chemosensitivity in childhood B-lymphoblastic leukemia. *Blood* **119**, 5201–5210 (2012).
110. Schafer, E. *et al.* Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: biology and therapeutic targeting. *Blood* **115**, 4798–4809 (2010).
111. Stumpel, D. J. P. M. *et al.* Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood* **114**, 5490–5498 (2009).
112. El Chaer, F., Keng, M. & Ballen, K. K. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **15**, 83–89 (2020).
113. Deshpande, A. J. *et al.* Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l. *Blood* **121**, 2533–2541 (2013).

114. Daigle, S. R. *et al.* Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* **122**, 1017–1025 (2013).
115. Campbell, C. T. *et al.* Mechanisms of Pinometostat (EPZ-5676) Treatment-Emergent Resistance in MLL-Rearranged Leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 1669–1679 (2017).
116. Ortega, S., Malumbres, M. & Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1602**, 73–87 (2002).
117. van der Linden, M. H. *et al.* MLL fusion-driven activation of CDK6 potentiates proliferation in MLL-rearranged infant ALL. *Cell Cycle Georget. Tex* **13**, 834–844 (2014).
118. Baker, A. *et al.* The CDK9 Inhibitor Dinaciclib Exerts Potent Apoptotic and Antitumor Effects in Preclinical Models of MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* **76**, 1158–1169 (2016).
119. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).
120. Stamatiadis-Smidt, H. & Hausen, H. *Thema Krebs: Fragen und Antworten.* (1998).
121. Poreba, M. Protease-activated prodrugs: strategies, challenges, and future directions. *FEBS J.* **287**, 1936–1969 (2020).
122. Natarajan, T. G. *et al.* Epigenetic regulator MLL2 shows altered expression in cancer cell lines and tumors from human breast and colon. *Cancer Cell Int.* **10**, 13 (2010).
123. Bier, C. *et al.* The Importin-Alpha/Nucleophosmin Switch Controls Taspase1 Protease Function. *Traffic* **12**, 703–714 (2011).
124. Hsieh, J. J.-D., Cheng, E. H.-Y. & Korsmeyer, S. J. Taspase1. *Cell* **115**, 293–303 (2003).
125. Takeda, S. Proteolysis of MLL family proteins is essential for Taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev.* **20**, 2397–2409 (2006).
126. Nakamura, T. *et al.* ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* **10**, 1119–1128 (2002).
127. Oyama, T. *et al.* Cleavage of TFIIA by Taspase1 Activates TRF2-Specified Mammalian Male Germ Cell Programs. *Dev. Cell* **27**, 188–200 (2013).
128. Takeda, S. *et al.* Taspase1-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting Cdkn2a locus transcription. *J. Clin. Invest.* **125**, 1203–1214 (2015).
129. Niizuma, H., Cheng, E. H. & Hsieh, J. J. Taspase 1: A protease with many biological surprises. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e999513 (2015).
130. Bier, C. *et al.* Cell-based Analysis of Structure-Function Activity of Threonine Aspartase 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 3007–3017 (2011).
131. Bier, C. *et al.* Overexpression of the Catalytically Impaired Taspase1T234V or Taspase1D233A Variants Does Not Have a Dominant Negative Effect in T(4;11) Leukemia Cells. *PLoS ONE* **7**, e34142 (2012).
132. Chen, D. Y. *et al.* Taspase1 Functions as a Non-Oncogene Addiction Protease that Coordinates Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Cancer Res.* **70**, 5358–5367 (2010).
133. Pless, B. *et al.* The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC--are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* **25**, 663–670 (2011).
134. Dong, Y. *et al.* Taspase1 cleaves MLL1 to activate cyclin E for HER2/neu breast tumorigenesis. *Cell Res.* **24**, 1354–1366 (2014).
135. Chen, D. Y. *et al.* A Pharmacologic Inhibitor of the Protease Taspase1 Effectively Inhibits Breast and Brain Tumor Growth. *Cancer Res.* **72**, 736–746 (2012).
136. Suleiman, J., Mundt, M., Sampath, S. & El-Hattab, A. W. *TASP1* is deleted in an infant with developmental delay, microcephaly, distinctive facial features, and multiple congenital anomalies. *Clin. Genet.* (2018) doi:10.1111/cge.13258.
137. Suleiman, J. *et al.* Homozygous loss-of-function variants of *TASP1*, a gene encoding an activator of the histone methyltransferases KMT2A and KMT2D, cause a syndrome of developmental delay, happy demeanor, distinctive facial features, and congenital anomalies. *Hum. Mutat.* (2019) doi:10.1002/humu.23844.

138. Balkin, D. M. *et al.* TASP1 mutation in a female with craniofacial anomalies, anterior segment dysgenesis, congenital immunodeficiency and macrocytic anemia. *Mol. Genet. Genomic Med.* (2019) doi:10.1002/mgg3.818.
139. Lee, J. T. *et al.* Design, syntheses, and evaluation of Taspase1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5086–5090 (2009).
140. Bier, C. *et al.* Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization *in vivo*. *FASEB J.* **26**, 3421–3429 (2012).
141. van den Boom, J. *et al.* Peptidyl Succinimidyl Peptides as Taspase 1 Inhibitors. *ChemBioChem* **15**, 2233–2237 (2014).
142. van den Boom, J. *et al.* The other side of the corona: nanoparticles inhibit the protease taspase1 in a size-dependent manner. *Nanoscale* 10.1039/D0NR01631D (2020) doi:10.1039/D0NR01631D.
143. Hsieh, J. J.-D., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Korsmeyer, S. J. Proteolytic Cleavage of MLL Generates a Complex of N- and C-Terminal Fragments That Confers Protein Stability and Subnuclear Localization. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 186–194 (2003).
144. Khan, J. A., Dunn, B. M. & Tong, L. Crystal Structure of Human Taspase1, a Crucial Protease Regulating the Function of MLL. *Structure* **13**, 1443–1452 (2005).
145. Nagaratnam, N. *et al.* Structural insights into the function of the catalytically active human Taspase1. *Struct. Lond. Engl.* 1993 (2021) doi:10.1016/j.str.2021.03.008.
146. Sabiani, S. *et al.* Unraveling the Activation Mechanism of Taspase1 which Controls the Oncogenic AF4–MLL Fusion Protein. *EBioMedicine* **2**, 386–395 (2015).
147. van den Boom, J., Trusch, F., Hoppstock, L., Beuck, C. & Bayer, P. Structural Characterization of the Loop at the Alpha-Subunit C-Terminus of the Mixed Lineage Leukemia Protein Activating Protease Taspase1. *PLoS One* **11**, e0151431 (2016).
148. Khan, J. A., Dunn, B. M. & Tong, L. Crystal Structure of Human Taspase1, a Crucial Protease Regulating the Function of MLL. *Structure* **13**, 1443–1452 (2005).
149. Soini, E. J. *et al.* Lanthanide chelates as new fluorochrome labels for cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **36**, 1449–1451 (1988).
150. Cisbio Bioassays. *HTRF Technology*. <https://www.cisbio.eu/content/htrf-technology> (2021).
151. Degorce, F. *et al.* HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr. Chem. Genomics* **3**, 22–32 (2009).
152. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2010).
153. Alpha, B. *et al.* ANTENNA EFFECT IN LUMINESCENT LANTHANIDE CRYPTATES: A PHOTOPHYSICAL STUDY. *Photochem. Photobiol.* **52**, 299–306 (1990).
154. Mathis, G. Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. *Clin. Chem.* **41**, 1391–1397 (1995).
155. Mathis, G. HTRF Technology. *J. Biomolecular Screen.* **4**, 309–314 (1999).
156. Devreese, M., Maes, A., De Baere, S., De Backer, P. & Croubels, S. Comparative method validation for closantel determination in cattle and sheep milk according to European Union Volume 8 and Veterinary International Conference on Harmonization guidelines. *J. Chromatogr. A* **1353**, 106–113 (2014).
157. Tabatabaei, S. A. *et al.* Closantel; a veterinary drug with potential severe morbidity in humans. *BMC Ophthalmol.* **16**, 207 (2016).
158. Michiels, M., Meuldermans, W. & Heykants, J. The metabolism and fate of closantel (Flukiver) in sheep and cattle. *Drug Metab. Rev.* **18**, 235–251 (1987).
159. Koziulek, M. J., Patschan, D., Desel, H., Wallbach, M. & Callizo, J. Closantel Poisoning Treated With Plasma Exchange. *JAMA Ophthalmol.* **133**, 718 (2015).
160. Gill, P. A. *et al.* Optic neuropathy and retinopathy in closantel toxicosis of sheep and goats. *Aust. Vet. J.* **77**, 259–261 (1999).
161. Segura-Cabrera, A. *et al.* A computational analysis of the binding mode of closantel as inhibitor of the *Onchocerca volvulus* chitinase: insights on macrofilaricidal drug design. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **25**, 1107–1119 (2011).

162. Garner, A. L. *et al.* Design, Synthesis, and Biological Activities of Closantel Analogues: Structural Promiscuity and Its Impact on *Onchocerca volvulus*. *J. Med. Chem.* **54**, 3963–3972 (2011).
163. Gooyit, M., Tricoche, N., Lustigman, S. & Janda, K. D. Dual protonophore-chitinase inhibitors dramatically affect *O. volvulus* molting. *J. Med. Chem.* **57**, 5792–5799 (2014).
164. Rajamuthiah, R. *et al.* Whole animal automated platform for drug discovery against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **9**, e89189 (2014).
165. Matsubara, K. *et al.* An improved thyroid hormone reporter assay to determine the thyroid hormone-like activity of amiodarone, bithionol, closantel and rafoxanide. *Toxicol. Lett.* **208**, 30–35 (2012).
166. Zhang, C. Y., Kim, S., Harney, J. W. & Larsen, P. R. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology* **139**, 1156–1163 (1998).
167. Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P. & Yen, P. M. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **14**, 947–955 (2000).
168. Na, S. Y. *et al.* Bcl3, an I κ B protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **274**, 28491–28496 (1999).
169. Zhu, X.-Y. *et al.* Closantel Suppresses Angiogenesis and Cancer Growth in Zebrafish Models. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **14**, 282–290 (2016).
170. Asoklis, R., Cimbaldas, A., Augyte, A., Jasinskiene, E. & Strupaite, R. Late ocular changes after closantel poisoning in five women. *Eye Lond. Engl.* **32**, 1800–1802 (2018).
171. Essabar, L., Meskini, T., Ettair, S., Erreimi, N. & Mouane, N. Harmful Use of Veterinary Drugs: Blindness Following Closantel Poisoning in a 5-Year-Old Girl. *Asia Pac. J. Med. Toxicol.* **3**, (2014).
172. Kumar, K., Mishra, C., Anjanamurthy, R., Kannan, N. B. & Ramasamy, K. Reversible blindness in a patient with closantel toxicity. *Indian J. Ophthalmol.* **67**, 1768–1771 (2019).
173. Guo, Y., Zhang, Y. & Hu, K. Sleeping Beauty transposon integrates into non-TA dinucleotides. *Mob. DNA* **9**, 8 (2018).
174. Luciano, V. Etablierung eines HTRF-Screening-Assays zur Identifizierung potentieller Taspase1-Inhibitoren. (2017).
175. Sabiani, S. Dimerisierung der Taspase1 ist eine Voraussetzung für ihre funktionelle Aktivierung. (Goethe Universität Frankfurt, 2011).
176. Promega GmbH. TECHNICAL MANUAL S30 T7 High-Yield Protein Expression System - Instructions for Use of Products. (2021).
177. TECHNICAL MANUAL ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay - Instructions for Use of Products. <https://www.promega.de/products/luciferase-assays/reporter-assays/one-glo-tox-luciferase-reporter-and-cell-viability-assay/?catNum=E7110> 21.06.2021 (2021).
178. Welch, M., Villalobos, A., Gustafsson, C. & Minshull, J. You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. *J. R. Soc. Interface* **6**, (2009).
179. Promega GmbH. TECHNICAL MANUAL pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Instructions for Use of Products. <https://www.promega.de/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360> 23.06.2021 (2021).
180. FDA. U.S. Food and Drug Administration Mission. <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do#mission> 30.06.2021.
181. Betuela, I. *et al.* Primaquine treatment for *Plasmodium vivax*--an essential tool for malaria control and elimination in Papua New Guinea. *P. N. G. Med. J.* **57**, 68–74 (2014).
182. Fasinu, P. S. *et al.* Formation primaquine-5,6-orthoquinone, the putative active and toxic metabolite of primaquine via direct oxidation in human erythrocytes. *Malar. J.* **18**, 30 (2019).
183. Harris, D. C. & Harris, D. C. *Lehrbuch der quantitativen Analyse*. (Springer Spektrum, 2014).
184. Heil, C. S., Rittner, A., Goebel, B., Beyer, D. & Grininger, M. Site-Specific Labelling of Multidomain Proteins by Amber Codon Suppression. *Sci. Rep.* **8**, (2018).

185. Mitra, N. Incorporating Unnatural Amino Acids into Recombinant Proteins in Living Cells. *Mater. Methods* **3**, (2013).
186. Zhao, Z. *et al.* Regulation of MLL/COMPASS stability through its proteolytic cleavage by *taspase1* as a possible approach for clinical therapy of leukemia. *Genes Dev.* **33**, 61–74 (2019).
187. Wang, J., Muntean, A. G. & Hess, J. L. ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation. *Blood* **119**, 1151–1161 (2012).
188. Liang, K. *et al.* Therapeutic Targeting of MLL Degradation Pathways in MLL-Rearranged Leukemia. *Cell* **168**, 59-72.e13 (2017).
189. Kristensen, S. Photoreactivity of biologically active compounds. XVII. Influence of solvent interactions on spectroscopic properties and photostability of primaquine. *Pharm.* **60**, 426–433 (2005).
190. Kristensen, S., Edge, R., Tønnesen, H. H., Bisby, R. H. & Navaratnam, S. Photoreactivity of biologically active compounds. XIX: Excited states and free radicals from the antimalarial drug primaquine. *J. Photochem. Photobiol. B* **94**, 147–157 (2009).
191. Kristensen, S., Nord, K., Orsteen, A. L. & Tønnesen, H. H. Photoreactivity of biologically active compounds, XIV: influence of oxygen on light induced reactions of primaquine. *Pharm.* **53**, 98–103 (1998).
192. Lawson, N. D. & Weinstein, B. M. In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307–318 (2002).

9 Anhang

9.1 Plasmidkarten

10xHis-TEV-SNAP(T7)tag2-CS2(MLL)-sGFP

Der Vektor pET29BH4 enthält einen N-terminalen His₁₀-Tag, gefolgt von einer TEV-Schnittstelle, zusätzlich trägt es eine Resistenz gegenüber Kanamycin. Die Expression ist durch IPTG induzierbar, anhand des T7 Promotors. Der Replikationsursprung liegt bei pBR322. Der Vektor wurde während meiner Masterarbeit (s. Masterarbeit Vanessa Luciano) kloniert und in der Promotionszeit ohne weitere Veränderung genutzt.

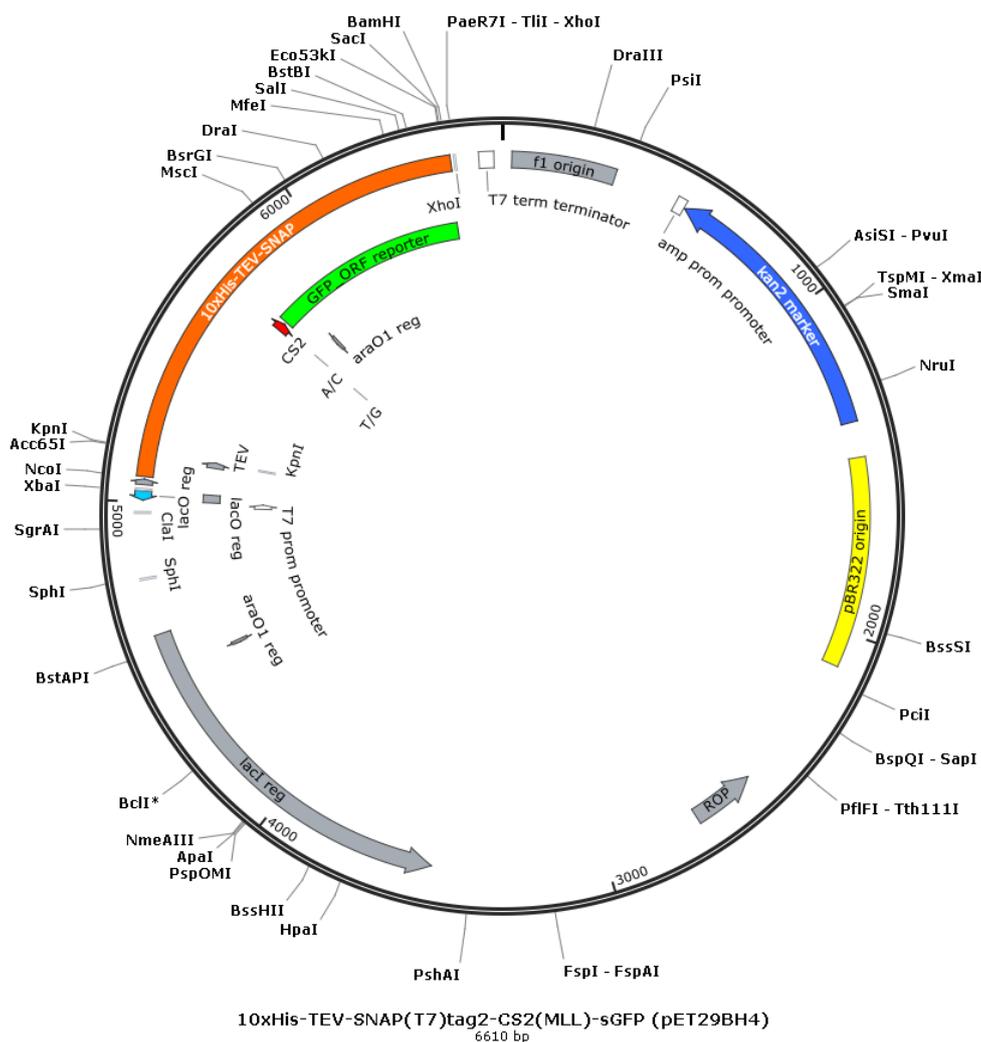


Abbildung 48 Vektor 10xHis-TEV-SNAP(T7)tag2-CS2(MLL)-sGFP

wtTaspase1 #1424 in pET22b+

Der bakterielle Expressionsvektor wurde von Jens Rabenstein während seiner Promotionszeit kloniert. Die wtTaspase1 Sequenz wurde durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und NdeI in den pET22b(+) Vektor kloniert. pET22b(+) hat eine N-terminale pelB Signal Sequenz, trägt zudem einen C-terminalen His6-Tag, hat eine Resistenz gegenüber Ampicillin und die Expression ist durch IPTG induzierbar, trägt T7 Promoter.

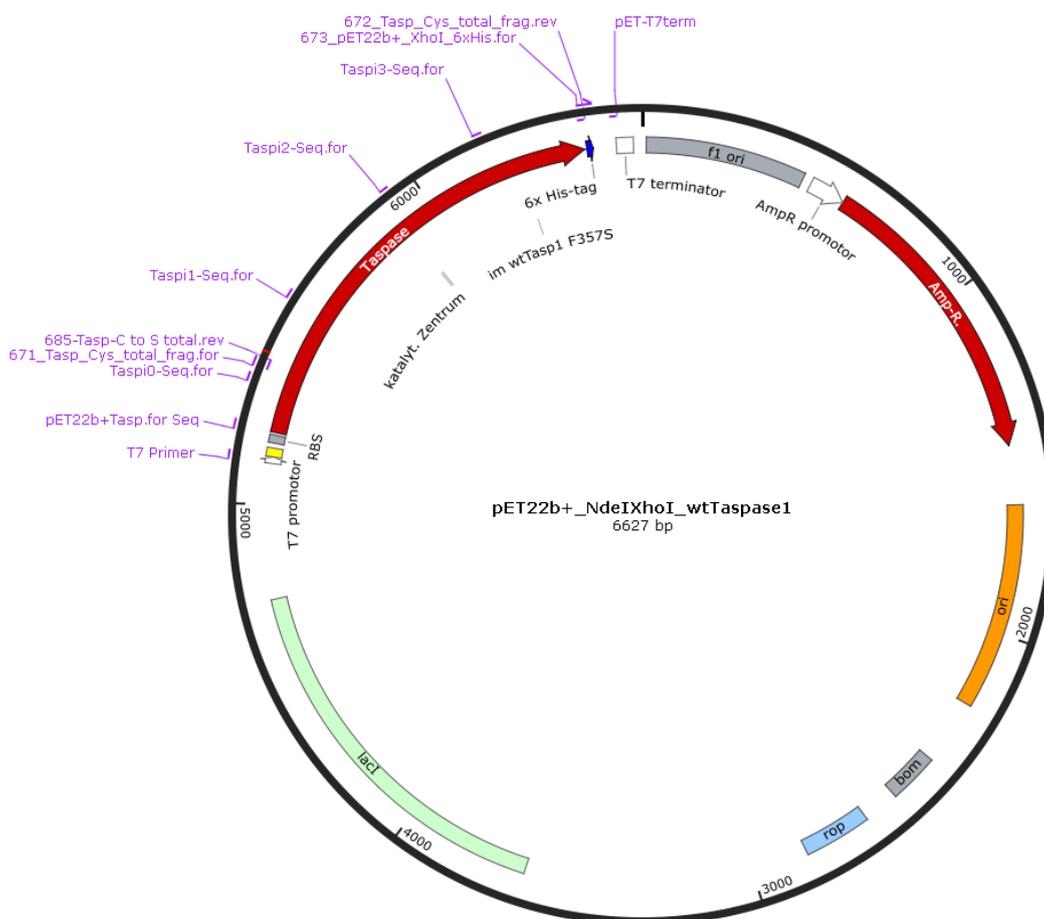


Abbildung 49 Vektor pET22b(+) wtTaspase1

coTaspase1 in pET22b(+)

Der bakterielle Expressionsvektor bei dem eine codon-optimierte Taspase1 über die Schnittstellen *XhoI* und *NdeI* in den pET22b(+) Vektor kloniert wurde. Die codon-optimierte Sequenz wurde bei GeneArt Synthesis bestellt und über PCR, anschließend nach Erhalt, amplifiziert. Ebenfalls in dem Vektor enthalten ein T7 Promotor und in einem getrennten ORF das Ampicillin als Selektionsmarker.

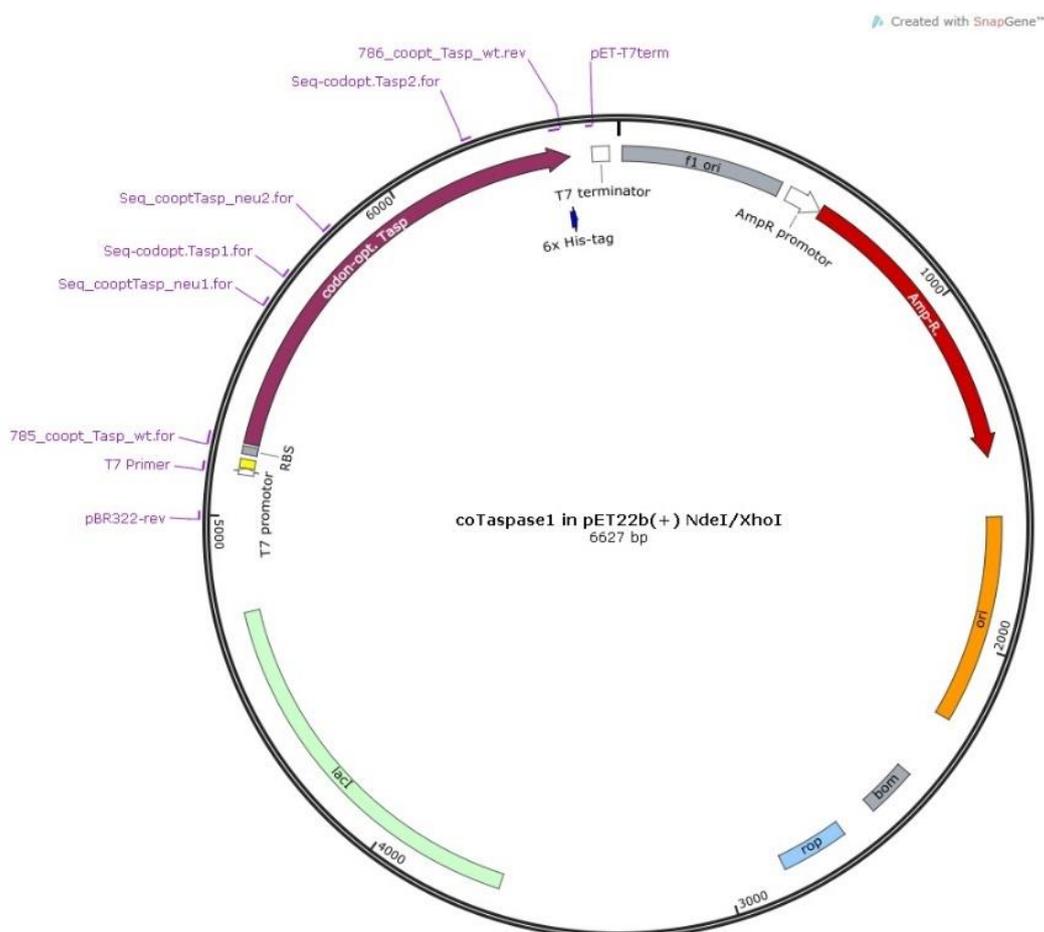


Abbildung 50 Vektor pET22b(+) coTaspase1

pITR EZP GFP-CS2-BFP

(EF1 α -Promotor/ZsGreen/Puromycin-Resistenz): Bei diesem Vektor handelt es sich um ein konstitutives Expressionsplasmid. Die Expressionskassete (Transposon) in ITR (inverted tandem repeats) wird über die Sleeping-Beauty Transposase das Genom stabil in die Zellen integriert. Über einen EF1 α -Promotor wird die Expression des *gene of interest* (GOI) induziert, zudem ist ebenfalls eine SV40 polyA-Sequenz enthalten. Ebenfalls in dem Vektor enthalten jedoch in einem getrennten ORF (*open reading frame*) das ZsGreen Protein (Z) als Transfektionsreporter sowie für die Puromycin N-acetyl-transferase (P) als Selektionsmarker.

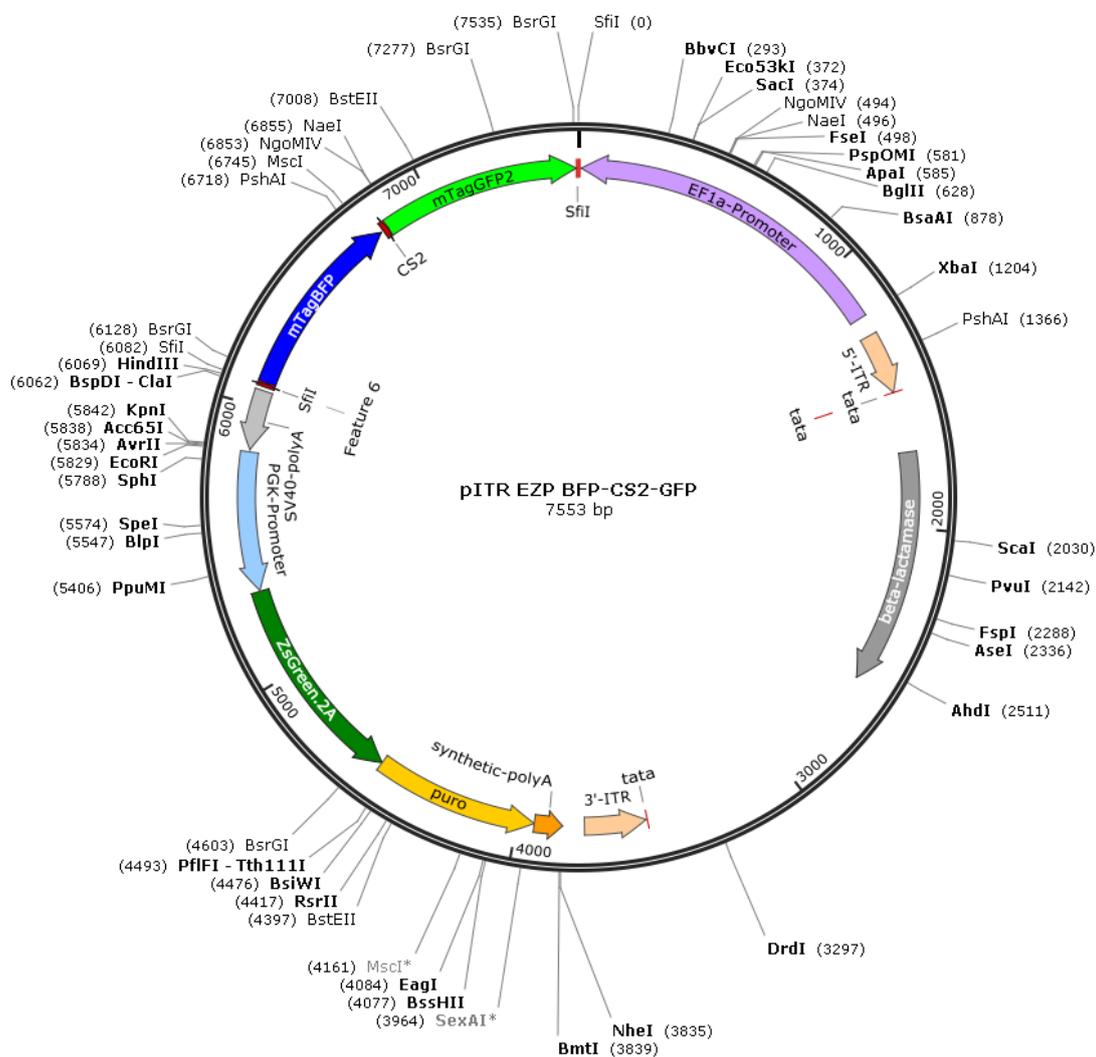
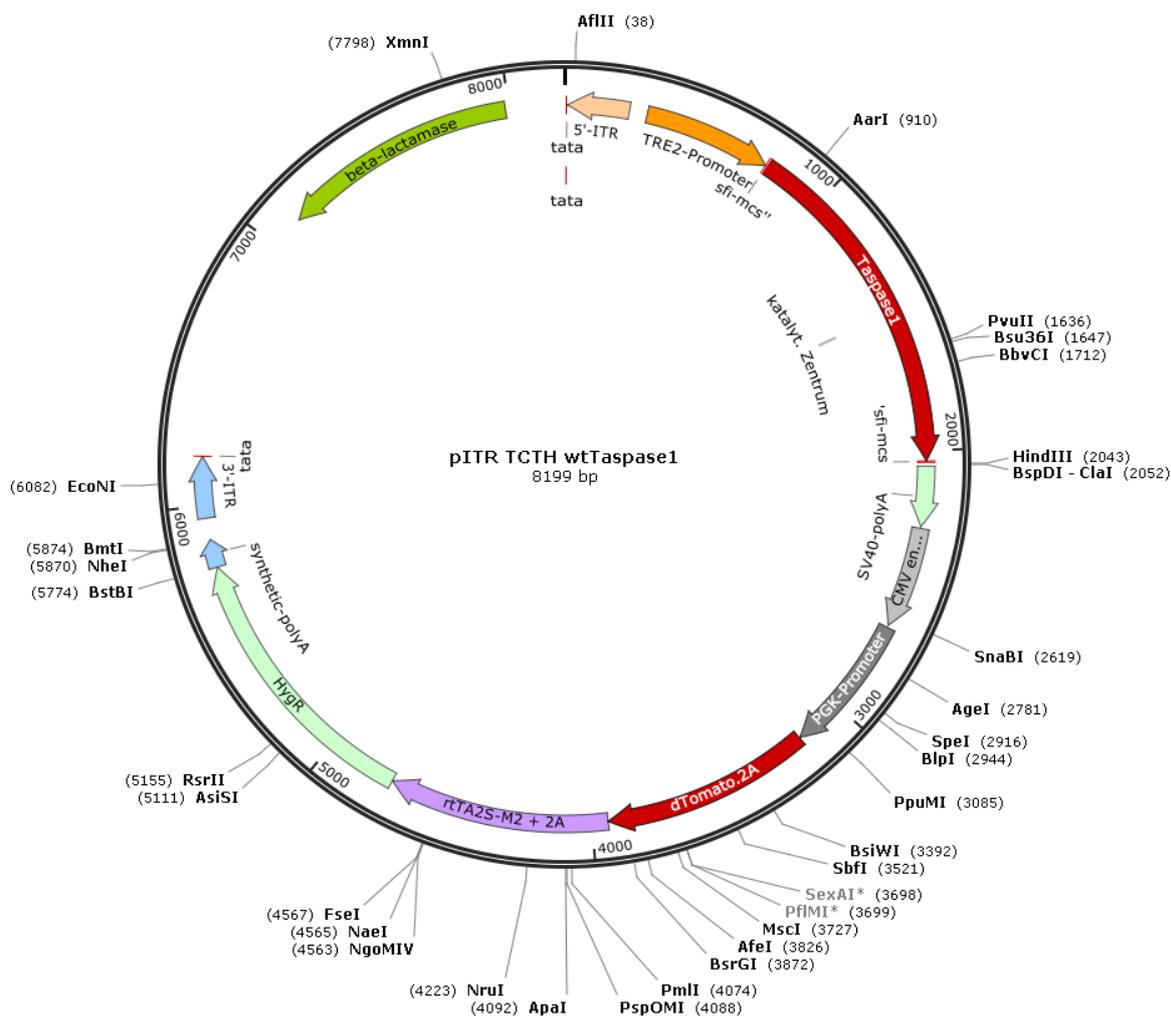


Abbildung 51 Vektor pITR EZP BFP-CS2-GFP

pITR TCTH wtTaspase1

Dieser Vektor ist analog zu pITR-EZP, enthält jedoch anstelle des EF1 α -Promotors einen durch Doxycyclin induzierbaren TRE2-Promotor (T) sowie einen CMV-Enhancer strangabwärts der polyA Sequenz. Ebenfalls in dem Vektor enthalten jedoch in einem getrennten ORF das dTomato Protein (T) als Transfektionsreporter sowie für die Hygromycin (H) als Selektionsmarker.

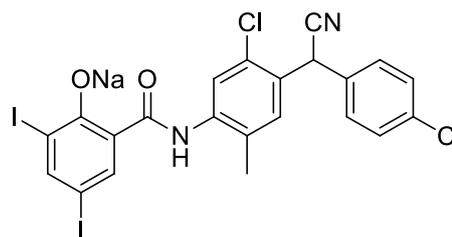


9.2 Chemische/physikalische Eigenschaften Closantel sodium & Primaquine biphosphate

Chemical Formula: C₂₂H₁₃Cl₂I₂N₂NaO₂

Exact Mass: 683,83

Molecular Weight: 685,06 g/mol



Closantel sodium

m/z: 683.83 (100.0%), 685.83 (64.1%), 684.84 (24.0%), 686.83 (15.7%), 687.83 (10.3%), 685.84 (3.2%), 688.83 (2.5%), 687.84 (2.0%)

Elemental Analysis: C, 38.57; H, 1.91; Cl, 10.35; I, 37.05; N, 4.09; Na, 3.36; O, 4.67

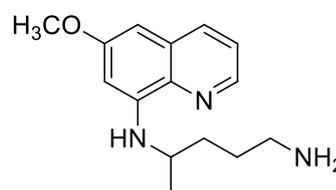
Chemical Formula: C₁₅H₂₁N₃O

Exact Mass: 259,17

Molecular Weight: 259,35 g/mol

m/z: 259.17 (100.0%), 260.17 (17.6%), 261.18 (1.3%)

Elemental Analysis: C, 69.47; H, 8.16; N, 16.20; O, 6.17



Primaquine

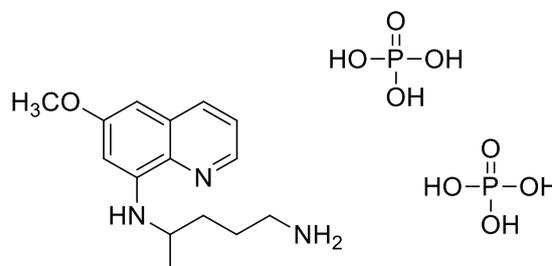
Chemical Formula: C₁₅H₂₇N₃O₉P₂

Exact Mass: 455,12

Molecular Weight: 455,34 g/mol

m/z: 455.12 (100.0%), 456.13 (16.9%), 457.13 (3.2%), 456.12 (1.1%)

Elemental Analysis: C, 39.57; H, 5.98; N, 9.23; O, 31.62; P, 13.60



Primaquine biphosphate

9.3 ITC Graphen

Gemessen wurden die eigentlichen Versuche und die dazugehörigen Blankmessungen. Die Blankmessungen wurden von den Rohdaten des jeweiligen Experiment miteinbezogen, sodass man hier in den Abbildungen die absoluten Daten dargestellt sind.

1) Versuchsmessung: CS2 mit wtTaspase1 (*E.coli*)

Messung mit 20 μM CS2 in der Titrationspritze und in der Messzelle 1 μM wtTaspase1 (alles in HTRF Puffer) - Injektionsvolumen (0.5 μl , 2 μl , 4 μl) à 60 s 4x8 μl à 120 s bei 25°C

Blankmessung: CS2 mit HTRF Puffer

Messung mit CS2 in der Titrationspritze und in der Messzelle HTRF Puffer

Injektionsvolumen (0.5 μl , 2 μl , 4 μl) à 60 s 4x8 μl à 120 s bei 25°C

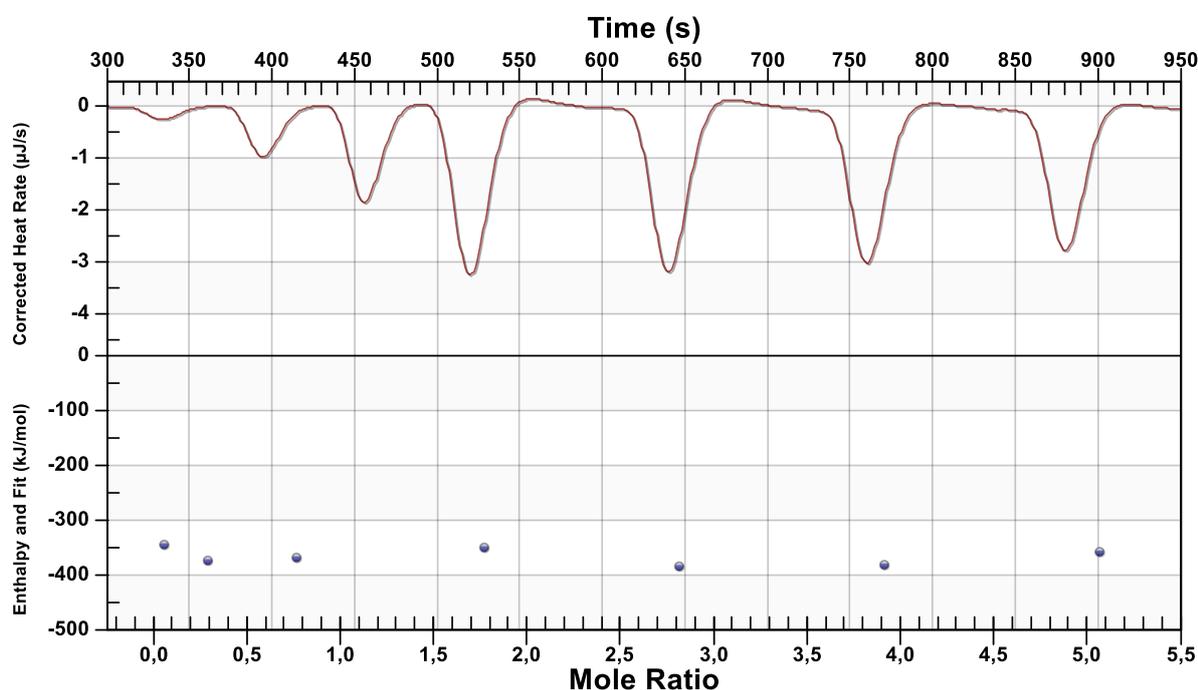


Abbildung 53 ITC Spektrum von wtTaspase1 in HTRF Puffer mit/ohne Closantel sodium

2) Versuchsmessung: CS2 mit wtTaspase1 (*E.coli*) und Closantel sodium

Messung mit 20 μM CS2 in der Titrationspritze und in der Messzelle 1 μM wtTaspase1+ 12.5 μM Closantel sodium (alles in HTRF Puffer) - Injektionsvolumen (0.5 μl , 2 μl , 4 μl) à 60 s 4x8 μl à 120 s bei 25°C

Blankmessung: CS2 mit HTRF Puffer und Closantel sodium

Messung mit CS2 in der Titrationspritze und in der Messzelle HTRF Puffer + 12.5 μM Closantel sodium (alles in HTRF Puffer) - Injektionsvolumen (0.5 μl , 2 μl , 4 μl) à 60 s 4x8 μl à 120 s bei 25°C

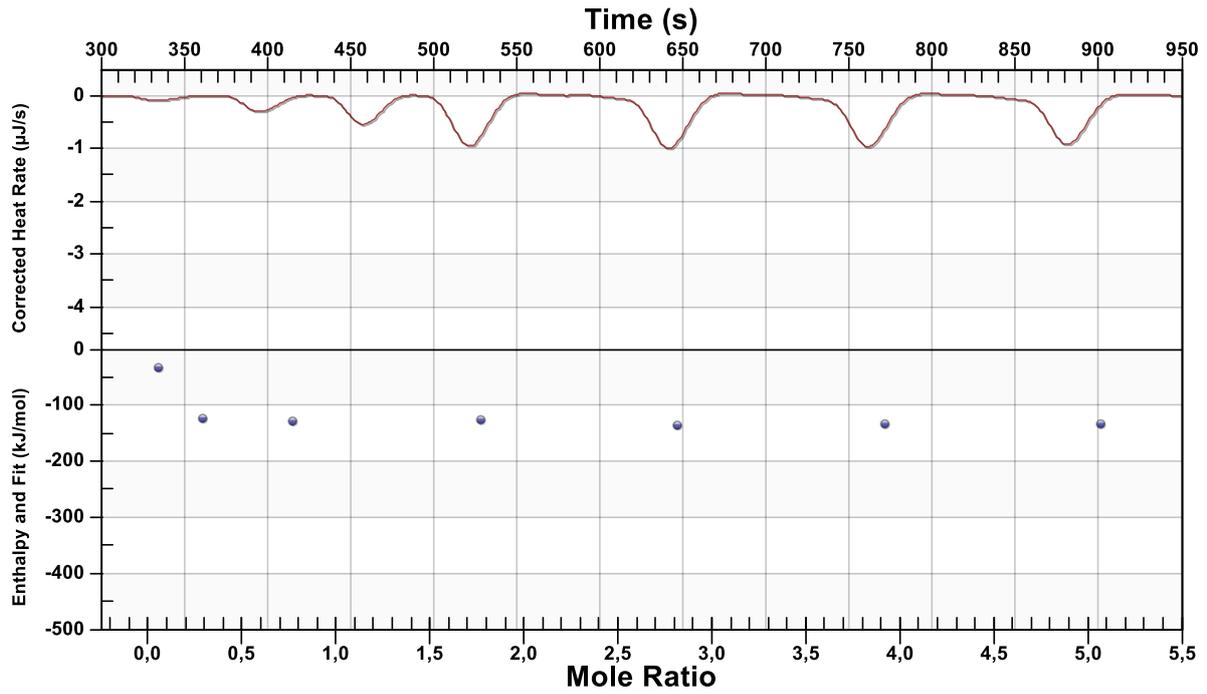


Abbildung 54 ITC Spektrum von CS2 und wtTaspase1 mit/ohne Closantel sodium

9.4 Getestete FDA Library

Name	M.W. [g/mol]	CAS Nummer	Indikation
Axitinib	386,47	319460-85-0	Cancer
Amisulpride	369,48	71675-85-9	Neurological Disease
Lapatinib Ditosylate (Tykerb)	925,46	388082-77-7	Cancer
Camptothecin	348,35	7689-03-4	Cancer
Vandetanib (Zactima)	475,35	443913-73-3	Cancer
Megestrol Acetate	384,51	595-33-5	Infection
Pemetrexed	471,37	471,37	Cancer
Ellagic acid	302,19	476-66-4	Cancer
Valproic acid sodium salt (Sodium valproate)	166,19	1069-66-5	Cardiovascular Disease
Gabapentin Hydrochloride	207,7	60142-95-2	Immunology
Exemestane	296,4	107868-30-4	Endocrinology
Levetiracetam	170,21	102767-28-2	Neurological Disease
Doxorubicin (Adriamycin)	579,98	25316-40-9	Cancer
Doripenem Hydrate	438,52	364622-82-2	Infection
Clofarabine	303,68	123318-82-1	Cancer
Mianserin hydrochloride	300,83	21535-47-7	Neurological Disease
Fludarabine Phosphate (Fludara)	365,21	75607-67-9	Cancer
Pizotifen malate	429,53	5189-11-7	Inflammation
Leflunomide	270,21	75706-12-6	Inflammation
Trilostane	329,43	13647-35-3	Endocrinology
Prasugrel (Effient)	373,44	150322-43-3	Cardiovascular Disease
Repaglinide	452,59	135062-02-1	Endocrinology
Tranilast (SB 252218)	327,33	53902-12-8	Respiratory Disease
Telbivudine (Sebivo, Tyzeka)	242,23	3424-98-4	Infection
Ofloxacin (Floxin)	361,37	82419-36-1	Cancer
Estrone	270,37	53-16-7	Endocrinology
Naratriptan HCl	371,93	143388-64-1	Neurological Disease
Chloramphenicol (Chloromycetin)	323,13	56-75-7	Infection
Dyphylline (Dilor)	254,24	479-18-5	Respiratory Disease
Betamethasone valerate (Betnovate)	476,58	2152-44-5	Inflammation
Cidofovir (Vistide)	279,19	113852-37-2	Infection
Divalproex sodium	310,41	76584-70-8	Neurological Disease
Pomalidomide	273,24	19171-19-8	Cancer
Piroxicam (Feldene)	331,35	36322-90-4	Inflammation
Olmesartan medoxomil (Benicar)	558,59	144689-63-4	Cardiovascular Disease

Paliperidone (Invega)	426,48	144598-75-4	Neurological Disease
Silodosin (Rapaflo)	495,53	160970-54-7	Cardiovascular Disease
Meloxicam (Mobic)	351,4	71125-38-7	Inflammation
Acetylcysteine	163,19	616-91-1	Respiratory Disease
Nevirapine (Viramune)	266,3	129618-40-2	Infection
Zafirlukast (Accolate)	575,68	107753-78-6	Inflammation
Enoxacin (Penetrex)	320,32	74011-58-8	Infection
Methyldopa (Aldomet)	211,21	555-30-6	Cardiovascular Disease
Cefditoren pivoxil	620,72	117467-28-4	Infection
Afatinib (BIBW2992)	485,94	439081-18-2	Cancer
Aniracetam	219,24	72432-10-1	Neurological Disease
Lenalidomide	259,26	191732-72-6	Cardiovascular Disease
Carmofur	257,26	61422-45-5	Cancer
Vorinostat (SAHA)	264,3	149647-78-9	Cancer
Mercaptopurine	152,18	50-44-2	Cancer
Malotilate	288,38	59937-28-9	Metabolic Disease
Etodolac (Lodine)	287,35	41340-25-4	Inflammation
Regorafenib (BAY 73-4506)	482,82	755037-03-7	Cancer
Gatifloxacin	375,39	112811-59-3	Infection
Finasteride	372,54	98319-26-7	Endocrinology
Lidocaine (Alphacaine)	234,34	137-58-6	Neurological Disease
Adrucil (Fluorouracil)	130,08	51-21-8	Cancer
Dorzolamide HCL	360,9	130693-82-2	Cancer
Dacarbazine (DTIC-Dome)	182,18	4342-03-4	Cancer
Minoxidil	209,25	38304-91-5	Cardiovascular Disease
Topotecan HCl	457,91	119413-54-6	Cancer
Resveratrol	228,24	501-36-0	Infection
Vinblastine	824,96	865-21-4	Neurological Disease
Vecuronium Bromide	637,73	50700-72-6	Neurological Disease
Ramelteon (TAK-375)	259,34	196597-26-9	Neurological Disease
Risedronate sodium	305,09	115436-72-1	Metabolic Disease
Varenicline tartrate	361,35	375815-87-5	Neurological Disease
Monobenzone (Benoquin)	200,23	103-16-2	Metabolic Disease
Marbofloxacin	362,36	115550-35-1	Infection
Flucytosine (Ancobon)	129,09	2022-85-7	Infection
Ponatinib (AP24534)	532,56	943319-70-8	Cancer
Flurbiprofen (Ansaid)	244,26	5104-49-4	Inflammation
Aztreonam (Azactam, Cayston)	435,43	78110-38-0	Infection

Praziquantel (Biltricide)	312,41	55268-74-1	Vermifuge
Natamycin (Pimaricin)	665,73	7681-93-8	Infection
Emtricitabine (Emtriva)	247,25	143491-57-0	Infection
Tazarotene (Avage)	351,46	118292-40-3	Inflammation
Gemcitabine (Gemzar)	263,2	95058-81-4	Metabolic Disease
Cefdinir (Omnicef)	395,41	91832-40-5	Infection
Terbinafine (Lamisil, Terbinex)	291,43	91161-71-6	Infection
Riluzole (Rilutek)	234,2	1744-22-5	Neurological Disease
Mesna (Uromitexan, Mesnex)	164,18	19767-45-4	Cancer
Alendronate (Fosamax)	326,13	121268-17-5	Metabolic Disease
Esomeprazole magnesium (Nexium)	713,12	161973-10-0	Digestive system disease
Erythromycin (E-Mycin)	733,93	114-07-8	Infection
Pitavastatin calcium (Livalo)	880,98	147526-32-7	Cardiovascular Disease
Ursodiol (Actigal Urso)	392,57	128-13-2	Metabolic Disease
Sulfadiazine	250,28	68-35-9	Infection
Bortezomib (Velcade)	384,24	179324-69-7	Cancer
Artemisinin	282,33	63968-64-9	Infection
Nilotinib (AMN-107)	529,52	641571-10-0	Cancer
Cetirizine Dihydrochloride	461,81	83881-52-1	Inflammation
Masitinib (AB1010)	498,64	790299-79-5	Respiratory Disease
Pamidronate Disodium	279,03	57248-88-1	Metabolic Disease
Ivacaftor (VX-770)	392,49	873054-44-5	Respiratory disease
Etomidate	244,29	33125-97-2	Neurological Disease
Ritonavir	720,94	155213-67-5	Infection
Genistein	270,24	446-72-0	Cancer
Irinotecan	586,68	97682-44-5	Cancer
Loratadine	382,88	79794-75-5	Inflammation
Abitrexate (Methotrexate)	454,44	59-05-2	Cancer
Gestodene	310,43	60282-87-3	Endocrinology
Dexrazoxane Hydrochloride	304,73	149003-01-0	Cardiovascular Disease
Mizoribine (Bredinin)	259,22	50924-49-7	Cancer
2-Methoxyestradiol	302,41	362-07-2	Cancer
Rocuronium bromide	609,68	119302-91-9	Neurological Disease
MDV3100 (Enzalutamide)	464,44	915087-33-1	Cancer
Bimatoprost	415,57	155206-00-1	Cardiovascular Disease
AMG-073 HCl (Cinacalcet hydrochloride)	393,87	364782-34-3	Endocrinology
Rolipram	275,34	61413-54-5	Inflammation
Venlafaxine	313,86	99300-78-4	Neurological Disease

Tretinoin (Aberela)	300,4	302-79-4	Cancer
Moxifloxacin hydrochloride	437,89	186826-86-8	Infection
Trichlormethiazide (Achletin)	380,66	133-67-5	Cardiovascular Disease
Fludarabine (Fludara)	285,23	21679-14-1	Cancer
Disulfiram (Antabuse)	296,54	97-77-8	Neurological Disease
Perindopril Erbumine (Aceon)	441,6	107133-36-8	Cardiovascular Disease
Busulfan (Myleran, Busulfex)	246,3	55-98-1	Cardiovascular Disease
Ibuprofen Lysine (NeoProfen)	352,47	57469-77-9	Inflammation
Progesterone (Prometrium)	314,46	57-83-0	Endocrinology
Sulfasalazine (Azulfidine)	398,39	599-79-1	Inflammation
Glipizide (Glucotrol)	445,54	29094-61-9	Endocrinology
Clotrimazole (Canesten)	344,84	23593-75-1	Infection
Levodopa (Sinemet)	197,19	59-92-7	Neurological Disease
Risperidone (Risperdal)	410,48	106266-06-2	Neurological Disease
Methocarbamol (Robaxin)	241,24	532-03-6	Neurological Disease
Ethinyl Estradiol	296,4	57-63-6	Endocrinology
Niacin (Nicotinic acid)	123,11	59-67-6	Metabolic Disease
Amphotericin B (Abelcet)	924,08	1397-89-3	Infection
Rifapentine (Priftin)	877,03	61379-65-5	Infection
Nitrofurazone (Nitrofurazone)	198,14	59-87-0	Infection
Chlorprothixene	315,86	113-59-7	Neurological Disease
Bosutinib (SKI-606)	530,45	380843-75-4	Cancer
Asenapine	401,84	85650-56-2	Neurological Disease
Pazopanib HCl	473,98	635702-64-6	Cancer
Cilnidipine	492,52	132203-70-4	Cardiovascular Disease
Crizotinib (PF-02341066)	450,34	877399-52-5	Cancer
Streptozotocin (Zanosar)	265,22	18883-66-4	Cancer
Docetaxel (Taxotere)	807,88	114977-28-5	Cancer
Felbamate	238,24	25451-15-4	Neurological Disease
Anastrozole	293,37	120511-73-1	Endocrinology
Glimepiride	490,62	93479-97-1	Metabolic Disease
Cladribine	285,69	4291-63-8	Cancer
Losartan potassium	462,01	124750-99-8	Cardiovascular Disease
Imiquimod	240,3	99011-02-6	Immunology
Drospirenone	366,49	67392-87-4	Endocrinology
Epirubicin Hydrochloride	579,98	56390-09-1	Cancer
Mosapride citrate	614,02	112885-42-4	Neurological Disease

Letrozole	285,3	112809-51-5	Endocrinology
Stavudine	224,21	3056-17-5	Infection
Dienogest	311,42	65928-58-7	Endocrinology
Linezolid (Zyvox)	337,35	165800-03-3	Infection
Celecoxib	381,37	169590-42-5	Inflammation
Sildenafil citrate	666,7	171599-83-0	Cardiovascular Disease
Voriconazole	349,31	137234-62-9	Infection
Phenylbutazone (Butazolidin, Butatron)	308,37	50-33-9	Cancer
Calcitriol (Rocaltrol)	416,64	32222-06-3	Endocrinology
Loteprednol etabonate	466,95	82034-46-6	Inflammation
Pralatrexate (Folotyn)	477,47	146464-95-1	Metabolic Disease
Mesalamine (Lialda)	153,14	89-57-6	Inflammation
Irbesartan (Avapro)	428,53	138402-11-6	Cardiovascular Disease
Carbamazepine (Carbatrol)	236,27	298-46-4	Neurological Disease
Telaprevir (VX-950)	679,85	402957-28-2	Infection
Lamivudine (Epivir)	229,26	134678-17-4	Infection
Candesartan (Atacand)	440,45	139481-59-7	Cardiovascular Disease
Glyburide (Diabeta)	494	10238-21-8	Endocrinology
Rizatriptan Benzoate (Maxalt)	391,47	145202-66-0	Neurological Disease
Levonorgestrel (Levonelle)	312,45	797-63-7	Endocrinology
Sulfapyridine (Dagenan)	249,29	144-83-2	Infection
Prednisolone (Hydroretrocortine)	360,44	50-24-8	Infection
Naproxen (Aleve)	252,24	26159-34-2	Inflammation
Nimodipine (Nimotop)	418,44	66085-59-4	Cardiovascular Disease
Docosanol (Abreva)	326,6	661-19-8	Infection
Suprofen (Profenal)	260,31	40828-46-4	Inflammation
Ketoprofen (Actron)	254,28	22071-15-4	Inflammation
Oxytetracycline (Terramycin)	460,43	79-57-2	Infection
Dasatinib (BMS-354825)	488,01	302962-49-8	Cancer
Benazepril hydrochloride	460,95	86541-74-4	Cardiovascular Disease
Rapamycin (Sirolimus)	914,18	53123-88-9	Immunology
Cilostazol	369,46	73963-72-1	Cardiovascular Disease
Vismodegib (GDC-0449)	421,3	879085-55-9	Cancer
Zoledronic Acid (Zoledronate)	272,09	118072-93-8	Cancer
Gemcitabine HCl (Gemzar)	299,66	122111-03-9	Cancer
Fluconazole	306,27	86386-73-4	Infection
Aprepitant (MK-0869)	534,43	170729-80-3	Neurological Disease

Granisetron HCl	348,87	107007-99-8	Neurological Disease
Decitabine	228,21	2353-33-5	Cardiovascular Disease
Acitretin	326,43	55079-83-9	Infection
Bendamustine HCL	394,72	3543-75-7	Cancer
Ruxolitinib (INCB018424)	306,37	941678-49-5	Cancer
Oxaliplatin (Eloxatin)	397,29	61825-94-3	Cancer
Nafamostat mesylate	539,58	82956-11-4	Cardiovascular Disease
Leucovorin Calcium	601,58	6035-45-6	Metabolic Disease
Teicoplanin	1709,39	61036-62-2	Infection
Entecavir hydrate	295,29	209216-23-9	Infection
Alfuzosin hydrochloride (Uroxatral)	425,91	81403-68-1	Cardiovascular Disease
Vemurafenib (PLX4032)	489,92	918504-65-1	Cancer
Sumatriptan succinate	413,49	103628-48-4	Neurological Disease
Febuxostat (Uloric)	316,37	144060-53-7	Inflammation
Ezetimibe (Zetia)	409,4	163222-33-1	Cardiovascular Disease
Doxercalciferol (Hectorol)	412,65	54573-75-0	Endocrinology
Aminocaproic acid (Amicar)	131,17	60-32-2	Cardiovascular Disease
Bentiromide	404,42	37106-97-1	Digestive system disease
Ipratropium bromide	412,37	22254-24-6	Respiratory Disease
Alprostadil (Caverject)	354,48	745-65-3	Endocrinology
Hydrocortisone (Cortisol)	362,46	50-23-7	Infection
Saxagliptin (BMS-477118, Onglyza)	315,41	361442-04-8	Infection
Eplerenone	414,49	107724-20-9	Cardiovascular Disease
Ubenimex (Bestatin)	308,37	58970-76-6	Cancer
Adefovir Dipivoxil (Preveon, Hepsera)	501,47	142340-99-6	Infection
Pyridostigmine Bromide (Mestinon)	261,12	101-26-8	Cardiovascular Disease
Gemfibrozil (Lopid)	250,33	25812-30-0	Cardiovascular Disease
Sulfameter (Bayrena)	280,3	651-06-9	Infection
Telmisartan (Micardis)	514,62	144701-48-4	Cardiovascular Disease
Nitazoxanide (Alinia, Annita)	307,28	55981-09-4	Vermifuge
Nisoldipine (Sular)	388,41	63675-72-9	Cardiovascular Disease
Ibuprofen (Advil)	206,28	15687-27-1	Inflammation
Pyrazinamide (Pyrazinoic acid amide)	123,11	98-96-4	Infection

Ketorolac (Toradol)	376,4	74103-07-4	Neurological Disease
Thioguanine	167,19	154-42-7	Cancer
Erlotinib HCl	429,9	183319-69-9	Cancer
Biperiden HCl	347,92	1235-82-1	Neurological Disease
Sorafenib (Nexavar)	637,03	475207-59-1	Cancer
Floxuridine	246,19	50-91-9	Cancer
XL-184 (Cabozantinib)	501,51	849217-68-1	Cancer
Dexamethasone	392,46	50-02-2	Inflammation
Paclitaxel (Taxol)	853,91	33069-62-4	Cancer
Flumazenil	303,29	78755-81-4	Neurological Disease
Bicalutamide (Casodex)	430,37	90357-06-5	Endocrinology
Ivermectin	875,09	70288-86-7	Vermifuge
Dutasteride	528,53	164656-23-9	Endocrinology
Biapenem	350,39	120410-24-4	Infection
Nelarabine (Arranon)	297,27	121032-29-9	Cancer
Isotretinoin	300,44	4759-48-2	Metabolic Disease
Etoposide (VP-16)	588,56	33419-42-0	Cancer
Omeprazole (Prilosec)	345,42	73590-58-6	Metabolic Disease
Methazolastone	194,15	85622-93-1	Cancer
Tenofovir Disoproxil Fumarate	635,51	202138-50-9	Infection
Nepafenac	254,28	78281-72-8	Inflammation
Clopidogrel (Plavix)	419,9	120202-66-6	Cardiovascular Disease
Acarbose	645,6	56180-94-0	Metabolic Disease
Tianeptine sodium	458,93	30123-17-2	Neurological Disease
Ziprasidone hydrochloride	449,4	122883-93-6	Neurological Disease
Enalaprilat dihydrate	348,4	84680-54-6	Cardiovascular Disease
Alfacalcidol	400,64	41294-56-8	Endocrinology
Aminoglutethimide (Cytadren)	232,28	125-84-8	Endocrinology
Betamethasone (Celestone)	392,46	378-44-9	Inflammation
Sulfanilamide	172,2	63-74-1	Infection
Norfloxacin (Norxacin)	319,33	70458-96-7	Infection
Torsemide (Demadex)	348,42	56211-40-6	Cardiovascular Disease
Zileuton	236,29	111406-87-2	Respiratory Disease
Hydrochlorothiazide	297,74	58-93-5	Cardiovascular Disease
Zalcitabine	211,22	7481-89-2	Infection
Methimazole (Tapazole, Northyx)	114,17	60-56-0	Endocrinology
Indapamide (Lozol)	365,83	26807-65-8	Cardiovascular Disease

Prilocaine	220,31	721-50-6	Neurological Disease
Thiabendazole	201,25	148-79-8	Vermifuge
Triamcinolone Acetonide	434,5	76-25-5	Inflammation
L-Glutamine	146,14	56-85-9	Metabolic Disease
Amprenavir (Agenerase)	505,63	161814-49-9	Infection
Quetiapine fumarate (Seroquel)	883,09	111974-72-2	Neurological Disease
Adenosine (Adenocard)	267,24	58-61-7	Cardiovascular Disease
Toremifene Citrate (Fareston, Acapodene)	598,08	89778-27-8	Endocrinology
Gefitinib (Iressa)	446,9	184475-35-2	Cancer
Budesonide	430,53	51333-22-3	Endocrinology
Sunitinib Malate (Sutent)	532,56	341031-54-7	Cancer
Ftorafur	200,17	17902-23-7	Cancer
Everolimus (RAD001)	958,22	159351-69-6	Cancer
Doxazosin mesylate	547,58	77883-43-3	Cardiovascular Disease
Capecitabine (Xeloda)	359,35	154361-50-9	Cancer
Fluoxetine HCl	345,79	56296-78-7	Neurological Disease
Fulvestrant (Faslodex)	606,77	129453-61-8	Cancer
Ketoconazole	531,43	65277-42-1	Infection
Melatonin	232,28	73-31-4	Endocrinology
Cefoselis sulfate	620,64	122841-12-7	Infection
Bleomycin sulfate	1512,62	9041-93-4	Cancer
Lopinavir (ABT-378)	628,8	192725-17-0	Infection
Evista (Raloxifene Hydrochloride)	510,04	82640-04-8	Endocrinology
Ondansetron hydrochloride (Zofran)	329,82	99614-01-4	Infection
Vincristine	923,04	2068-78-2	Cancer
Tenofovir (Viread)	287,21	147127-20-6	Infection
Rufinamide (Banzel)	238,19	106308-44-5	Neurological Disease
Prazosin HCl	419,86	19237-84-4	Cardiovascular Disease
Adapalene	412,52	106685-40-9	Inflammation
Tizanidine HCl	290,17	64461-82-1	Neurological Disease
Zonisamide	212,23	68291-97-4	Neurological Disease
Dofetilide (Tikosyn)	441,56	115256-11-6	Cardiovascular Disease
Calcifediol	400,64	19356-17-3	Endocrinology
Aminophylline (Truphylline)	420,43	317-34-0	Respiratory Disease
Mycophenolate mofetil (CellCept)	433,49	128794-94-5	Immunology
Betamethasone Dipropionate (Diprolene)	504,59	5593-20-4	Inflammation
Tadalafil (Cialis)	389,4	171596-29-5	Cardiovascular Disease

Desonide	416,51	638-94-8	Inflammation
Nebivolol (Bystolic)	441,9	152520-56-4	Cardiovascular Disease
Estradiol	272,38	50-28-2	Endocrinology
Reserpine	608,68	50-55-5	Cardiovascular Disease
Azathioprine (Azasan, Imuran)	277,26	446-86-6	Immunology
Metolazone (Zaroxolyn)	365,83	17560-51-9	Cardiovascular Disease
Mitotane (Lysodren)	320,04	53-19-0	Cancer
Darunavir Ethanolate (Prezista)	593,73	635728-49-3	Infection
Guaifenesin (Guaiphenesin)	198,22	93-14-1	Respiratory Disease
Orlistat (Alli, Xenical)	495,73	96829-58-2	Metabolic Disease
Gadodiamide (Omniscan)	591,67	122795-43-1	Cancer
Albendazole (Albenza)	265,33	54965-21-8	Vermifuge
Rifampin (Rifadin, Rimactane)	822,94	13292-46-1	Infection
Cytarabine	243,22	147-94-4	Cancer
Ethionamide	166,24	536-33-4	Infection
Imatinib Mesylate	589,71	220127-57-1	Cancer
Bumetanide	364,42	28395-03-1	Cardiovascular Disease
Temsirolimus (Torisel)	1030,29	162635-04-3	Cancer
Ifosfamide	261,09	3778-73-2	Cancer
Abiraterone (CB-7598)	349,51	154229-19-3	Endocrinology
Edaravone (MCI-186)	174,2	89-25-8	Cardiovascular Disease
Cisplatin	300,05	15663-27-1	Cancer
Fluvoxamine maleate	434,41	61718-82-9	Neurological Disease
Thalidomide	258,23	50-35-1	Immunology
Lansoprazole	369,36	103577-45-3	Infection
Bisoprolol	441,52	104344-23-2	Cardiovascular Disease
Daptomycin	1620,67	103060-53-3	Infection
Carboplatin	371,25	41575-94-4	Cancer
Meropenem	383,46	96036-03-2	Infection
Brucine	510,56	652154-10-4	
Oxcarbazepine	252,27	28721-07-5	Neurological Disease
Agomelatine	243,3	138112-76-2	Neurological Disease
Tigecycline	585,65	220620-09-7	Infection
Posaconazole	700,78	171228-49-2	Infection
Ranolazine dihydrochloride	500,46	95635-56-6	Cardiovascular Disease
Altretamine (Hexalen)	210,28	645-05-6	Cancer

Topiramate	339,36	97240-79-4	Neurological Disease
Atazanavir sulfate	802,93	229975-97-7	Cancer
Isradipine (Dynacirc)	371,39	75695-93-1	Neurological Disease
lloperidone (Fanapt)	426,48	133454-47-4	Neurological Disease
Amorolfine Hydrochloride	353,97	78613-38-4	Infection
Cephalexin (Cefalexin)	347,39	15686-71-2	Infection
Betapar (Meprednisone)	372,455	1247-42-3	Inflammation
Cyclosporine (Neoral)	1202,61	79217-60-0	Immunology
Didanosine (Videx)	236,23	69655-05-6	Infection
Pimobendan (Vetmedin)	334,37	74150-27-9	Cardiovascular Disease
Deferasirox (Exjade)	373,36	201530-41-8	Endocrinology
Furosemide (Lasix)	330,74	54-31-9	Cardiovascular Disease
Indomethacin (Indocid, Indocin)	357,79	53-86-1	Inflammation
Cefoperazone (Cefobid)	645,67	62893-19-0	Infection
Methylprednisolone	374,47	83-43-2	Immunology
Prednisone (Adasone)	358,43	53-03-2	Immunology
Rifabutin (Mycobutin)	847	72559-06-9	Infection
Allopurinol (Zyloprim)	136,11	315-30-0	Neurological Disease
Oxybutynin (Ditropan)	357,49	5633-20-5	Neurological Disease
Chlorothiazide	295,72	58-94-6	Cardiovascular Disease
Beta Carotene	536,87	7235-40-7	Endocrinology
Zolmitriptan (Zomig)	287,36	139264-17-8	Neurological Disease
Trifluridine (Viroptic)	296,2	70-00-8	Infection
Azacitidine (Vidaza)	244,2	320-67-2	Cancer
Isoniazid (Tubizid)	137,14	54-85-3	Infection
Fenofibrate (Tricor, Trilipix)	360,83	49562-28-9	Cardiovascular Disease
Sulfamethizole (Proklar)	270,33	144-82-1	Infection
Amiloride hydrochloride (Midamor)	266,09	2016-88-8	Metabolic Disease
Nicorandil (Ikorel)	211,17	65141-46-0	Cardiovascular Disease
Pranlukast	481,5	103177-37-3	Immunology
Adenine sulfate	368,33	321-30-2	Cancer
Chloroxine	214,05	773-76-2	Infection
Lacidipine (Lacipil, Motens)	455,54	103890-78-4	Cardiovascular Disease
Penicillamine (Cuprimine)	149,21	52-67-5	Immunology
Maraviroc	513,67	376348-65-1	Inflammation
Dapoxetine hydrochloride (Priligy)	341,87	129938-20-1	Neurological Disease

Benidipine hydrochloride	542,02	91599-74-5	Cardiovascular Disease
Sparfloxacin	392,4	110871-86-8	Infection
Uridine	244,2	58-96-8	Vermifuge
Potassium iodide	166	7681-11-0	Endocrinology
Nimesulide	308,31	51803-78-2	Cardiovascular Disease
Metronidazole (Flagyl)	171,15	443-48-1	Infection
Strontium ranelate (Protelos)	513,49	135459-87-9	Inflammation
Sulfisoxazole	267,3	127-69-5	Infection
Terazosin HCl (Hytrin)	459,92	70024-40-7	Infection
Clindamycin hydrochloride (Dalacin)	461,44	21462-39-5	Neurological Disease
Fenbendazole (Panacur)	299,35	43210-67-9	Infection
Manidipine (Manyper)	610,7	89226-50-6	Metabolic Disease
Rasagiline mesylate	267,34	161735-79-1	Cardiovascular Disease
Novobiocin sodium (Albamycin)	634,61	1476-53-5	Cardiovascular Disease
Lapatinib	581,06	231277-92-2	Neurological Disease
Propafenone (Rytmonorm)	377,9	34183-22-7	Cardiovascular Disease
Licofelone	379,88	156897-06-2	Metabolic Disease
Sotalol (Betapace)	308,82	959-24-0	Neurological Disease
Atropine	694,83	5908-99-6	Respiratory Disease
Naphazoline hydrochloride (Naphcon)	246,74	550-99-2	Neurological Disease
BIBR 953 (Dabigatran etexilate, Pradaxa)	471,51	211914-51-1	Neurological Disease
Dopamine hydrochloride (Inotropin)	189,64	62-31-7	Infection
Esomeprazole sodium (Nexium)	367,4	161796-78-7	Cancer
Riboflavin (Vitamin B2)	376,36	83-88-5	Infection
Tolterodine tartrate (Detrol LA)	475,57	124937-52-6	Neurological Disease
Tolbutamide	270,35	64-77-7	Cancer
Amiloride hydrochloride dihydrate	302,12	17440-83-4	Cardiovascular Disease
Vidarabine (Vira-A)	267,24	5536-17-4	Infection
Levamisole Hydrochloride (Ergamisol)	240,75	16595-80-5	Vermifuge
Ranolazine (Ranexa)	427,54	95635-55-5	Cardiovascular Disease
Sulbactam	233,24	68373-14-8	Infection
Amlodipine besylate (Norvasc)	567,05	111470-99-6	Cardiovascular Disease
Tamoxifen Citrate (Nolvadex)	563,64	54965-24-1	Endocrinology
Oxfendazole	315,35	53716-50-0	Vermifuge
Adenine hydrochloride	171,59	2922-28-3	Cancer

Lomustine (CeeNU)	233,7	13010-47-4	Cancer
Procarbazine HCl (Matulane)	257,76	366-70-1	Cancer
Bifonazole	310,39	60628-96-8	Infection
Raltegravir (MK-0518)	444,42	518048-05-0	Immunology
Risedronic acid (Actonel)	283,11	105462-24-6	Metabolic Disease
Formoterol hemifumarate	402,4	43229-80-7	Neurological Disease
Felodipine (Plendil)	384,25	72509-76-3	Cardiovascular Disease
Flunarizine 2HCl	477,42	30484-77-6	Cancer
Tropisetron	320,81	105826-92-4	Neurological Disease
Dyclonine HCl	325,87	536-43-6	Inflammation
Flutamide (Eulexin)	276,21	13311-84-7	Cancer
Captopril (Capoten)	217,29	62571-86-2	Metabolic Disease
Crystal violet	407,98	548-62-9	Infection
Bromhexine HCl	412,59	611-75-6	Cardiovascular Disease
Mitiglinide calcium	668,88	145525-41-3	Cardiovascular Disease
Clonidine hydrochloride (Catapres)	266,5	4205-91-8	Infection
Fleroxacin (Quinodis)	369,34	79660-72-3	Vermifuge
Milrinone (Primacor)	211,22	78415-72-2	Cardiovascular Disease
Naltrexone HCl	377,86	16676-29-2	Neurological Disease
Olanzapine (Zyprexa)	312,43975	132539-06-1	Infection
Blonanserin (Lonasen)	367,5	132810-10-7	Cancer
Quinine hydrochloride dihydrate	396,91	6119-47-7	Cardiovascular Disease
Dextrose (D-glucose)	180,16	50-99-7	Infection
Spectinomycin hydrochloride	405,27	21736-83-4	Cardiovascular Disease
Roflumilast (Daxas)	403,21	162401-32-3	Neurological Disease
Epinephrine bitartrate (Adrenalinium)	333,29	51-42-3	Cancer
Aliskiren hemifumarate	609,83	173334-58-2	Cardiovascular Disease
Ritodrine hydrochloride (Yutopar)	323,81	23239-51-2	Infection
Fesoterodine fumarate (Toviaz)	527,65	286930-03-8	Immunology
Clomipramine hydrochloride (Anafranil)	351,31	17321-77-6	Infection
Sorbitol (Glucitol)	182,17	50-70-4	Digestive system disease
Sulbactam sodium (Unasyn)	255,22	69388-84-7	Infection
Levosimendan	280,28	141505-33-1	Metabolic Disease
Clomifene citrate (Serophene)	598,08	50-41-9	Cancer
Verteporfin (Visudyne)	718,79	129497-78-5	Endocrinology

Levofloxacin (Levaquin)	361,37	100986-85-4	Infection
Ranitidine (Zantac)	350,86	66357-59-3	Metabolic Disease
Tolfenamic acid	261,7	13710-19-5	Inflammation
Chlorpheniramine Maleate	390,86	113-92-8	Neurological Disease
Meglumine	195,21	6284-40-8	
Carvedilol	406,47	72956-09-3	Cardiovascular Disease
Ticlopidine HCl	300,25	53885-35-1	Cardiovascular Disease
Chenodeoxycholic acid	392,57	474-25-9	Infection
Ondansetron (Zofran)	293,36	99614-02-5	Digestive system disease
Pefloxacin mesylate	429,46	70458-95-6	Infection
Pyrimethamine	248,71	58-14-0	Immunology
Tranexamic acid (Transamin)	157,21	1197-18-8	Cardiovascular Disease
Chlormezanone (Trancopal)	273,74	80-77-3	Respiratory Disease
Deflazacort (Calcort)	441,52	14484-47-0	Endocrinology
Fenticonazole nitrate	518,41	73151-29-8	Neurological Disease
Nicotinamide (Niacinamide)	122,12	98-92-0	Neurological Disease
Memantine HCl (Namenda)	215,76	41100-52-1	Neurological Disease
Fluvastatin sodium (Lescol)	433,45	93957-55-2	Cardiovascular Disease
Oxytetracycline dihydrate	496,46	6153-64-6	Infection
Haloperidol (Haldol)	375,86	52-86-8	Neurological Disease
Lovastatin (Mevacor)	404,54	75330-75-5	Respiratory Disease
Clozapine (Clozaril)	326,82	5786-21-0	Cardiovascular Disease
Fluocinolone acetonide (Flucort-N)	452,4999	67-73-2	Infection
Fosinopril sodium (Monopril)	585,64	88889-14-9	Cardiovascular Disease
Mitoxantrone Hydrochloride	517,4	70476-82-3	Cardiovascular Disease
Olopatadine hydrochloride (Opatanol)	373,87	140462-76-6	Neurological Disease
Cisatracurium besylate (Nimbex)	1243,48	96946-42-8	Neurological Disease
Racecadotril (Acetorphan)	385,48	81110-73-8	Infection
Xylose	150,13	25990-60-7	Metabolic Disease
Sulfadoxine (Sulphadoxine)	310,33378	2447-57-6	Infection
Gabapentin (Neurontin)	171,24	60142-96-3	Respiratory Disease
L-Adrenaline (Epinephrine)	183,2	51-43-4	Cardiovascular Disease
OSI-420 (Desmethyl Erlotinib)	415,87	183320-51-6	Cancer
Isoconazole nitrate (Travogen)	479,14	24168-96-5	Infection

Abiraterone Acetate (CB7630)	391,55	154229-18-2	Cancer
Phenformin hydrochloride	241,72	834-28-6	Metabolic Disease
Cephalomannine	831,9	71610-00-9	Cancer
Azelastine hydrochloride (Astelin)	418,36	79307-93-0	Neurological Disease
Amantadine hydrochloride (Symmetrel)	187,7	665-66-7	Cardiovascular Disease
Hydralazine hydrochloride	196,64	304-20-1	Immunology
Teniposide (Vumon)	656,65	29767-20-2	Cancer
Enalapril maleate (Vasotec)	492,52	76095-16-4	Cardiovascular Disease
Acadesine	258,23	2627-69-2	Cardiovascular Disease
Pranoprofen	255,27	52549-17-4	Inflammation
Acetarson	275,09	97-44-9	
Aripiprazole (Abilify)	448,39	129722-12-9	Neurological Disease
Atracurium besylate	1243,48	64228-81-5	Neurological Disease
ATP (Adenosine-Triphosphate)	551,14	987-65-5	Endocrinology
Cimetidine (Tagamet)	252,34	51481-61-9	Inflammation
Liranaftate	328,43	88678-31-3	Infection
Metoprolol tartrate	684,81	392-17-7	Cardiovascular Disease
Sulindac (Clinoril)	356,41	38194-50-2	Cancer
Valaciclovir HCl	360,8	124832-27-5	Infection
Ketotifen fumarate (Zaditor)	425,5	34580-14-8	Neurological Disease
Nizatidine	331,46	76963-41-2	Metabolic Disease
Rebamipide	370,79	90098-04-7	Infection
Talc	379,27	14807-96-6	
Cyproheptadine HCl (Periactin)	323,86	969-33-5	Neurological Disease
Tioconazole	387,71	65899-73-2	Infection
Cytidine	243,22	65-46-3	Cardiovascular Disease
Phenindione (Rectadione)	222,24	83-12-5	Cardiovascular Disease
Tiopronin (Thiola)	163,19	1953-02-2	Cardiovascular Disease
Pramipexole (Mirapex)	211,33	104632-26-0	Neurological Disease
Gallamine triethiodide (Flaxedil)	891,53	65-29-2	Inflammation
Moroxydine	207,66	3160-91-6	Cancer
Azasetron HCl (Y-25130)	386,27	123040-16-4	Neurological Disease
Oxymetazoline hydrochloride	296,84	2315-02-8	Immunology
Dronedarone HCl (Multaq)	593,22	141625-93-6	Neurological Disease
Ribavirin (Copegus)	244,20864	36791-04-5	Metabolic Disease
Mestranol	310,43	72-33-3	Endocrinology

Tenoxicam (Mobiflex)	337,37832	59804-37-4	Infection
Sitafloxacin hydrate	436,84	163253-35-8	Neurological Disease
DL-Adrenaline	183,2	329-65-7	Cardiovascular Disease
DAPT (GSI-IX)	432,46	208255-80-5	Cancer
Econazole nitrate (Spectazole)	444,7	24169-02-6	Neurological Disease
Artemether (SM-224)	298,37	71963-77-4	Cancer
Ceftiofur hydrochloride	560,02	103980-44-5	Infection
10-DAB (10-Deacetylbaecatin)	544,59	32981-86-5	Cancer
5-Aminolevulinic acid hydrochloride	167,59	5451-09-2	Neurological Disease
Amfebutamone (Bupropion)	276,2	31677-93-7	Infection
Oxacillin sodium monohydrate	441,43	7240-38-2	Endocrinology
Rifaximin (Xifaxan)	785,88	80621-81-4	Infection
Menadione	172,18	58-27-5	Endocrinology
Acetylcholine chloride	181,66	60-31-1	Neurological Disease
Sulphadimethoxine	310,33	122-11-2	Infection
Fenoprofen calcium	522,6	34597-40-5	Inflammation
Sarafloxacin HCl	421,83	91296-87-6	Infection
Butoconazole nitrate	474,79	64872-77-1	Infection
Meclizine 2HCl	463,87	1104-22-9	Neurological Disease
Clemastine Fumarate	459,96	14976-57-9	Immunology
D-Cycloserine	102,09	68-41-7	Infection
Etidronate (Didronel)	206,03	2809-21-4	Endocrinology
Taurine	125,15	107-35-7	Infection
Ganciclovir	255,23	82410-32-0	Infection
Urapidil HCl	423,94	64887-14-5	Respiratory Disease
Carbidopa	226,23	28860-95-9	Neurological Disease
Epalrestat	319,4	82159-09-9	Inflammation
Vitamin B12	1355,37	68-19-9	Metabolic Disease
Doxifluridine	246,19	3094-09-5	Immunology
Disodium Cromoglycate	512,33	15826-37-6	Respiratory Disease
Orphenadrine citrate (Norflex)	461,5	4682-36-4	Infection
Alibendol	251,28	26750-81-2	Neurological Disease
Balofloxacin	389,42	127294-70-6	Metabolic Disease
Lisinopril (Zestril)	405,49	83915-83-7	Metabolic Disease
Domperidone (Motilium)	425,91	57808-66-9	Neurological Disease
Imatinib (Gleevec)	493,6	152459-95-5	Neurological Disease
Ambrisentan	378,42	177036-94-1	Neurological Disease
Mycophenolic (Mycophenolate)	320,34	24280-93-1	Infection
Ozagrel	228,25	82571-53-7	Cardiovascular Disease

Conivaptan HCl (Vaprisol)	535,04	168626-94-6	Cardiovascular Disease
Rosiglitazone maleate	473,5	155141-29-0	Infection
Naftopidil (Flivas)	392,49	57149-07-2	Endocrinology
Tobramycin	467,52369	32986-56-4	Inflammation
BIBR-1048 (Dabigatran)	627,73	211915-06-9	Infection
Phenytoin sodium (Dilantin)	274,25	630-93-3	Metabolic Disease
Irinotecan HCl Trihydrate (Campto)	677,18	136572-09-3	Neurological Disease
Miconazole (Monistat)	416,13	22916-47-8	Neurological Disease
DL-Carnitine hydrochloride	197,66	461-05-2	Cardiovascular Disease
Cefprozil hydrate (Cefzil)	407,44	121123-17-9	Neurological Disease
Paeoniflorin	480,46	23180-57-6	Cancer
Clarithromycin (Biaxin, Klacid)	747,95	81103-11-9	Neurological Disease
Benserazide	293,7	14919-77-8	Neurological Disease
Cloxacillin sodium (Cloxacap)	475,88	7081-44-9	Cardiovascular Disease
Bacitracin zinc	1486,07	1405-89-6	Cancer
Metformin hydrochloride (Glucophage)	165,62	1115-70-4	Endocrinology
Acipimox	154,12	51037-30-0	Cardiovascular Disease
Primidone (Mysoline)	218,25	125-33-7	Neurological Disease
Erdosteine	249,31	84611-23-4	Respiratory Disease
Methscopolamine (Pamine)	398,29	155-41-9	Neurological Disease
Azithromycin (Zithromax)	748,98	83905-01-5	Cancer
Mometasone furoate	521,43	83919-23-7	Inflammation
Curcumin	368,38	458-37-7	
Sodium butyrate	110,09	156-54-7	Cancer
Diethylstilbestrol (Stilbestrol)	268,35	56-53-1	Cancer
Pramipexole dihydrochloride monohydrate	302,26	191217-81-9	Neurological Disease
Roxatidine acetate HCl	384,9	93793-83-0	Digestive system disease
Bendroflumethiazide	421,41	73-48-3	Cardiovascular Disease
Valsartan (Diovan)	435,52	137862-53-4	Cardiovascular Disease
Aspartame	294,3	22839-47-0	Metabolic Disease
Diclofenac	318,13	15307-79-6	Neurological Disease
Pioglitazone hydrochloride (Actos)	392,9	112529-15-4	Metabolic Disease
Tropicamide	284,35	1508-75-4	Neurological Disease
Gimeracil	145,54	103766-25-2	Neurological Disease
Irsogladine	256,09	57381-26-7	Neurological Disease

Lafutidine	431,55	118288-08-7	Infection
Atorvastatin calcium (Lipitor)	1155,34	134523-03-8	Cardiovascular Disease
Donepezil HCl (Aricept)	416	120011-70-3	Metabolic Disease
Ivabradine HCl (Procoralan)	505,05	148849-67-6	Neurological Disease
Itraconazole (Sporanox)	705,65031	84625-61-6	Cancer
Bexarotene	348	153559-49-0	Cardiovascular Disease
Nateglinide (Starlix)	317,42	105816-04-4	Immunology
Flunixin meglumin	491,46	42461-84-7	Immunology
Pancuronium (Pavulon)	732,67	15500-66-0	Cardiovascular Disease
Ibutilide fumarate	885,23	122647-32-9	Cardiovascular Disease
Roxithromycin (Roxl-150)	837,06727	80214-83-1	Metabolic Disease
S-(+)-Rolipram	275,34	85416-73-5	Cardiovascular Disease
Vardenafil (Vivanza)	579,11	224785-90-4	Infection
Tebipenem pivoxil (L-084)	497,63	161715-24-8	Cardiovascular Disease
Phenytoin (Lepitoin)	252,27	57-41-0	Endocrinology
Apatinib (YN968D1)	493,58	811803-05-1	Cancer
Secnidazole (Flagentyl)	185,18	3366-95-8	Infection
Nalidixic acid (NegGram)	232,24	389-08-2	Infection
Scopine	155,19	498-45-3	Metabolic Disease
Geniposide	388,37	24512-63-8	
Rosiglitazone (Avandia)	357,43	122320-73-4	Cancer
Bupivacaine hydrochloride (Marcain)	324,89	18010-40-7	Neurological Disease
Amoxicillin sodium (Amox)	387,39	34642-77-8	Infection
Simvastatin (Zocor)	418,57	79902-63-9	Cardiovascular Disease
Methoxsalen (Oxsoralen)	216,19	298-81-7	Inflammation
Acyclovir (Aciclovir)	225,2	59277-89-3	Infection
Rimantadine (Flumadine)	179,3	13392-28-4	Infection
Betaxolol hydrochloride (Betoptic)	343,89	63659-19-8	Cardiovascular Disease
Amiodarone HCl	681,77	19774-82-4	Cardiovascular Disease
Albendazole Oxide (Ricobendazole)	281,33	54029-12-8	Infection
Propylthiouracil	170,23	51-52-5	Endocrinology
Daidzein	254,24	486-66-8	Cardiovascular Disease
Sodium orthovanadate	183,91	13721-39-6	Cancer

Diltiazem HCl (Tiazac)	450,98	33286-22-5	Cardiovascular Disease
Suplatast tosylate	499,64	94055-76-2	Cardiovascular Disease
Protionamide (Prothionamide)	180,27	14222-60-7	Infection
Ciprofloxacin (Cipro)	331,34	85721-33-1	Neurological Disease
Dipyridamole (Persantine)	504,63	58-32-2	Cardiovascular Disease
Candesartan cilexetil (Atacand)	610,66	145040-37-5	Cardiovascular Disease
Avobenzon (Parsol 1789)	310,39	70356-09-1	
Lornoxicam (Xefo)	371,82	70374-39-9	Inflammation
Pregnenolone	316,48	145-13-1	Neurological Disease
Cyclophosphamide monohydrate	279,1	6055-19-2	Cancer
Triamcinolone (Aristocort)	394,43	124-94-7	Inflammation
Moxonidine	241,68	75438-57-2	Digestive system disease
Estriol	288,39	50-27-1	Neurological Disease
Lincomycin hydrochloride (Lincocin)	443	859-18-7	Cancer
Neostigmine bromide (Prostigmin)	303,2	114-80-7	Endocrinology
Imidapril (Tanatril) HCl	441,91	89396-94-1	Cardiovascular Disease
Pantothenic acid (pantothenate)	219,23954	79-83-4	Neurological Disease
Probucol	516,84	23288-49-5	Cardiovascular Disease
Salbutamol sulfate (Albuterol)	337,39	51022-70-9	Infection
Bazedoxifene HCl	507,06	198480-56-7	Metabolic Disease
Xylazine HCl	256,79	23076-35-9	Cardiovascular Disease
Rosuvastatin calcium (Crestor)	500,57	147098-20-2	Infection
Methacycline hydrochloride (Physiomycine)	478,88	3963-95-9	Cancer
TAME	342,41	901-47-3	Cancer
Acetanilide (Antifebrin)	135,16	103-84-4	Neurological Disease
Ammonium Glycyrrhizinate (AMGZ)	839,96	1407-03-0	Infection
Tiotropium Bromide hydrate	490,43	139404-48-1	Infection
Genipin	226,23	6902-77-8	
Terbinafine hydrochloride (Lamisil)	327,89	78628-80-5	Infection
Bethanechol chloride	196,68	590-63-6	Neurological Disease
Isoprenaline hydrochloride	247,72	51-30-9	Infection
Ramipril (Altace)	416,51	87333-19-5	Cardiovascular Disease
Miconazole nitrate	479,14	22832-87-7	Infection

Nifedipine (Adalat)	346,33	21829-25-4	Cardiovascular Disease
Nefiracetam (Translon)	246,3	77191-36-7	Neurological Disease
Proparacaine HCl	330,85	5875-06-9	Neurological Disease
Adenine	135,13	73-24-5	Cancer
Flubendazole (Flutelmium)	313,28	31430-15-6	Vermifuge
Fluticasone propionate (Flonase, Veramyst)	500,57	80474-14-2	Inflammation
Oxibendazole	249,27	20559-55-1	Vermifuge
Elvitegravir (GS-9137)	447,88	697761-98-1	Immunology
Diphenhydramine HCl (Benadryl)	291,82	147-24-0	Immunology
Mirtazapine (Remeron, Avanza)	265,35	85650-52-8	Immunology
Idoxuridine	354,1	54-42-2	Infection
Diclazuril	407,64	101831-37-2	Infection
Hydroxyurea (Cytodrox)	76,05	127-07-1	Cancer
Phentolamine mesilate	377,46	65-28-1	Cardiovascular Disease
Amlodipine (Norvasc)	408,88	88150-42-9	Cardiovascular Disease
Clindamycin phosphate	504,96	24729-96-2	Infection
Sulfamethoxazole	253,28	723-46-6	Infection
Tolnaftate	307,41	2398-96-1	Cancer
Nystatin (Mycostatin)	926,09	1400-61-9	Infection
Ozagrel HCl	264,71	78712-43-3	Cardiovascular Disease
Moexipril HCl	535,03	82586-52-5	Digestive system disease
Famciclovir (Famvir)	321,33863	104227-87-4	Cancer
Gabexate mesylate	417,48	56974-61-9	Cardiovascular Disease
Loperamide hydrochloride	513,5	34552-83-5	Infection
Vinpocetine (Cavinton)	350,45	42971-09-5	Inflammation
Nitrendipine	360,3699	39562-70-4	Neurological Disease
Arbidol HCl	513,88	131707-23-8	Cardiovascular Disease
Phenoxybenzamine HCl	340,3	63-92-3	Endocrinology
Fudosteine	179,24	13189-98-5	Neurological Disease
Scopolamine hydrobromide	384,26	114-49-8	Respiratory Disease
Dichlorphenamide (Diclofenamide)	305,16	120-97-8	Cardiovascular Disease
Maprotiline hydrochloride	313,86	10347-81-6	Neurological Disease
Eltrombopag (SB-497115-GR)	442,47	496775-61-2	Cancer
Ciclopirox (Penlac)	207,27	29342-05-0	Neurological Disease

D-Mannitol (Osmitrol)	182,17	69-65-8	Cardiovascular Disease
Lomefloxacin hydrochloride (Maxaquin)	387,81	98079-52-8	Infection
Geniposidic acid	374,34	27741-01-1	Cancer
Trospium chloride (Sanctura)	427,96	10405-02-4	Cardiovascular Disease
Chlorpromazine (Sonazine)	355,33	69-09-0	Neurological Disease
Cortisone acetate (Cortone)	402,48	50-04-4	Cancer
Medroxyprogesterone acetate	386,52	71-58-9	Infection
Neomycin sulfate	712,72	1405-10-3	Endocrinology
(R)-baclofen	213,66	69308-37-8	Inflammation
Phenacetin	179,22	62-44-2	Infection
2-Thiouracil	128,15	141-90-2	Endocrinology
Calcium levofolate (Calcium Folate)	511,5	80433-71-2	Immunology
Oxybutynin chloride	393,95	1508-65-2	Neurological Disease
Gliclazide (Diamicon)	323,41	21187-98-4	Neurological Disease
Sodium salicylate	161,11	54-21-7	Infection
Lonidamine	321,16	50264-69-2	Cardiovascular Disease
Estradiol valerate	356,5	979-32-8	Endocrinology
Dabrafenib (GSK2118436)	519,56	1195765-45-7	Infection
Tylosin tartrate	1066,19	74610-55-2	Neurological Disease
Zanamivir (Relenza)	332,31	139110-80-8	Infection
Atomoxetine HCl	291,82	82248-59-7	Neurological Disease
Cabazitaxel (Jevtana)	835,93	183133-96-2	Neurological Disease
(+,-)-Octopamine HCl	189,64	770-05-8	Immunology
Vildagliptin (LAF-237)	303,4	274901-16-5	Metabolic Disease
Meptazinol HCl	269,81	59263-76-2	Neurological Disease
Cinepazide maleate	533,57	26328-04-1	Inflammation
Doxycycline HCl	480,9	10592-13-9	Metabolic Disease
Azilsartan Medoxomil (TAK-491)	568,53	863031-21-4	Cardiovascular Disease
Sodium Monofluorophosphate	143,95	10163-15-2	Inflammation
Probenecid (Benemid)	285,36	57-66-9	Metabolic Disease
Decoquinat	417,54	18507-89-6	Vermifuge
Diphemanil methylsulfate	389,51	62-97-5	Neurological Disease
D-Phenylalanine	165,19	673-06-3	Neurological Disease
tetrahydrozoline hydrochloride	236,74	522-48-5	Inflammation
Doxofylline	266,25	69975-86-6	Metabolic Disease
Netilmicin Sulfate	1441,55	56391-57-2	Infection
1-Hexadecanol	242,44	36653-82-4	
Ronidazole	200,15	7681-76-7	Neurological Disease

Nicardipine HCl	515,99	54527-84-3	Neurological Disease
Guanidine HCl	95,53	50-01-1	Vermifuge
Cyclandelate	276,37	456-59-7	Neurological Disease
Ticagrelor	522,57	274693-27-5	Cardiovascular Disease
Aminothiazole	100,14	96-50-4	Infection
Flumethasone	410,45	2135-17-3	Endocrinology
Clofibric acid	214,65	882-09-7	Metabolic Disease
Dydrogesterone	312,45	152-62-5	Endocrinology
Liothyronine Sodium	672,96	55-06-1	Endocrinology
Clofazimine	473,4	2030-63-9	Infection
Fidaxomicin	1058,04	873857-62-6	Infection
Troxipide	294,35	30751-05-4	Digestive system disease
Primaquine Diphosphate	455,34	63-45-6	Infection
Phenylephrine HCl	203,67	61-76-7	Endocrinology
Caspofungin acetate	1213,42	179463-17-3	Infection
Zidovudine (Retrovir)	267,24	30516-87-1	Cardiovascular Disease
Creatinine	113,12	60-27-5	Cardiovascular Disease
Miglitol (Glyset)	207,22	72432-03-2	Neurological Disease
Ornidazole	219,63	16773-42-5	Endocrinology
Acemetacin (Emflex)	415,82	53164-05-9	Infection
Methylthiouracil	142,18	56-04-2	Infection
Ethisterone	312,45	434-03-7	Inflammation
Articaine HCl	320,84	23964-57-0	Neurological Disease
Clindamycin	424,98	18323-44-9	Infection
Benztropine mesylate	403,53	132-17-2	Infection
Zaltoprofen	298,36	74711-43-6	Inflammation
Betahistine 2HCl	209,12	5579-84-0	Inflammation
Bufexamac	223,27	2438-72-4	Metabolic Disease
Ropinirole HCl	296,84	91374-20-8	Neurological Disease
Daunorubicin HCl (Daunomycin HCl)	563,98	23541-50-6	Cancer
Fexofenadine HCl	538,12	153439-40-8	Neurological Disease
Azilsartan (TAK-536)	456,45	147403-03-0	Neurological Disease
Clinafloxacin (PD127391)	365,79	105956-97-6	Infection
Danofloxacin Mesylate	453,48	119478-55-6	Digestive system disease
Hyoscyamine (Daturine)	289,37	101-31-5	Neurological Disease
Procaine (Novocaine) HCl	272,77	51-05-8	Neurological Disease
Bacitracin	1408,67	1405-87-4	Infection

Vitamin D2	396,65	50-14-6	Endocrinology
Chlorzoxazone	169,57	95-25-0	Metabolic Disease
toltrazuril	425,38	69004-03-1	Infection
Benzydamine Hydrochloride	345,87	132-69-4	Inflammation
Sertraline HCl	342,69	79559-97-0	Inflammation
Sodium Gluconate	218,14	527-07-1	
Vitamin D3 (Cholecalciferol)	384,64	67-97-0	Cardiovascular Disease
Nifuroxazide	275,22	965-52-6	Infection
Decamethonium bromide	418,29	541-22-0	Neurological Disease
Cinchophen	249,26	132-60-5	Immunology
triamterene	253,26	396-01-0	Inflammation
Antazoline HCl	301,81	2508-72-7	Neurological Disease
Halobetasol Propionate	484,96	66852-54-8	Inflammation
Chromocarb	190,15	4940-39-0	Cardiovascular Disease
Dexlansoprazole	369,36	138530-94-6	Cardiovascular Disease
Amoxapine	313,78	14028-44-5	Neurological Disease
Clodronate Disodium	288,86	22560-50-5	Metabolic Disease
Fluorometholone Acetate	418,5	3801-06-7	Inflammation
Sevelamer HCl	186,08	152751-57-0	Cardiovascular Disease
Cepharanthine	606,71	481-49-2	Metabolic Disease
Prednisolone acetate (Omnipred)	402,48	52-21-1	Immunology
Dexmedetomidine	200,28	113775-47-6	Neurological Disease
Quinapril HCl (Accupril)	474,98	82586-55-8	Inflammation
Moguisteine	339,41	119637-67-1	Respiratory Disease
Pioglitazone (Actos)	356,44	111025-46-8	Cancer
Amikacin hydrate	603,6	1257517-67-1	Infection
Tioxolone	168,17	4991-65-5	Endocrinology
Methenamine (Mandelamine)	140,19	100-97-0	Inflammation
Clorsulon	380,66	60200-06-8	Cancer
Gliquidone	527,63	33342-05-1	Metabolic Disease
Carfilzomib (PR-171)	719,91	868540-17-4	Cardiovascular Disease
Abacavir sulfate	335,35	188062-50-2	Infection
Pazopanib	437,52	444731-52-6	Cardiovascular Disease
Brinzolamide	383,51	138890-62-7	Neurological Disease
Lamotrigine	256,09	84057-84-1	Cancer
Azlocillin sodium salt	484,48	37091-65-9	Neurological Disease
Pravastatin sodium	446,51	81131-70-6	Metabolic Disease

Amidopyrine	231,29	58-15-1	Neurological Disease
Otilonium Bromide	563,57	26095-59-0	Cardiovascular Disease
Pentamidine	413,34	50357-45-4	Infection
Enrofloxacin	359,39	93106-60-6	Infection
Cyclamic acid	179,24	100-88-9	Inflammation
Homatropine Bromide	356,25	51-56-9	Infection
Azithromycin Dihydrate	785,02	117772-70-0	Infection
Doxapram HCl	432,98	7081-53-0	Neurological Disease
Chlortetracycline HCl	515,34	64-72-2	Infection
Pheniramine Maleate	356,42	132-20-7	Neurological Disease
Chlorpropamide	276,74	94-20-2	Infection
Spirolactone	416,57	52-01-7	Infection
Sulfaguanidine	214,24	57-67-0	Infection
Escitalopram oxalate	414,43	219861-08-2	Infection
Paromomycin Sulfate	713,71	1263-89-4	Infection
Aminosalicylate sodium	211,15	6018-19-5	Neurological Disease
Betamipron	193,2	3440-28-6	Infection
sulfacetamide sodium	236,22	127-56-0	Cardiovascular Disease
Tolperisone HCl	281,82	3644-61-9	Neurological Disease
Fenspiride HCl	296,79	5053-08-7	Inflammation
Chlorocresol	142,58	59-50-7	
Esmolol HCl	331,83	81161-17-3	Cardiovascular Disease
Azaperone	327,4	1649-18-9	Neurological Disease
Dicloxacillin Sodium	510,32	343-55-5	Infection
Oxybuprocaine HCl	344,88	5987-82-6	Neurological Disease
Deoxyarbutin	194,23	53936-56-4	Cardiovascular Disease
Bergapten	216,19	484-20-8	Cancer
Streptomycin sulfate	1457,38	3810-74-0	Infection
Beclomethasone dipropionate	521,04	5534/9/8	Inflammation
Trazodone hydrochloride (Desyrel)	408,32	25332-39-2	Infection
Nadifloxacin	360,38	124858-35-1	Neurological Disease
Tolvaptan (OPC-41061)	448,94	150683-30-0	Metabolic Disease
Dexamethasone acetate	434,5	1177-87-3	Inflammation
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	288,42	53-43-0	Endocrinology
Milnacipran HCl	246,35	101152-94-7	Endocrinology
Arecoline	236,11	300-08-3	Endocrinology
Butenafine HCl	353,93	101827-46-7	Neurological Disease
Cobicistat (GS-9350)	776,02	1004316-88-4	Cancer

Altrenogest	310,43	850-52-2	Neurological Disease
Amoxicillin (Amoxycillin)	365,4	26787-78-0	Neurological Disease
Carbenicillin disodium	422,36	4800-94-6	Infection
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)	174,19	329-98-6	Inflammation
Azacyclonol	267,37	115-46-8	Neurological Disease
Bepotastine Besilate	547,06	190786-44-8	Cancer
Thiamine HCl (Vitamin B1)	337,27	67-03-8	Endocrinology
Solifenacin succinate	480,55	242478-38-2	Cardiovascular Disease
Pemiroloast (BMY 26517) potassium	266,3	100299-08-9	Infection
Medetomidine HCl	236,74	86347-15-1	Infection
Ouabain	728,77	630-60-4	Neurological Disease
Hydroxyzine 2HCl	447,83	2192-20-3	Neurological Disease
Ampicillin Trihydrate	403,45	7177-48-2	Infection
Dibucaine HCL	379,92	61-12-1	Endocrinology
Chloroquine Phosphate	515,86	50-63-5	Inflammation
Bisacodyl	361,39	603-50-9	Cardiovascular Disease
Cyromazine	166,18	66215-27-8	Vermifuge
Retapamulin	517,76	224452-66-8	Neurological Disease
Trometamol	121,14	77-86-1	
Guanabenz acetate	291,13	23256-50-0	Endocrinology
Penciclovir	253,26	39809-25-1	Infection
Sodium nitrite	69	7632-00-0	Neurological Disease
Chlorquinaldol	228,07	72-80-0	Infection
Spiramycin	843,05	8025-81-8	Infection
Florfenicol	358,21	73231-34-2	Infection
Pramoxine HCl	329,86	637-58-1	Neurological Disease
Benzocaine	165,19	94-09-7	Respiratory Disease
Voglibose	267,28	83480-29-9	Metabolic Disease
Benzbromarone	424,08	3562-84-3	
Triclabendazole	359,66	68786-66-3	Vermifuge
Oxaprozin	293,32	21256-18-8	Inflammation
Clorprenaline HCL	250,16	6933-90-0	Cardiovascular Disease
Doxylamine Succinate	388,46	562-10-7	Neurological Disease
Tetracaine hydrochloride (Pontocaine)	300,82	136-47-0	Endocrinology
Atovaquone (Atavaquone)	366,84	95233-18-4	Neurological Disease
Thiamphenicol (Thiophenicol)	356,22	15318-45-3	Cardiovascular Disease
Pidotimod	244,27	121808-62-6	Immunology
Pramiracetam	269,38	68497-62-1	Endocrinology

Trimethoprim	290,32	738-70-5	Infection
Idebenone	338,44	58186-27-9	Inflammation
Entacapone	305,29	130929-57-6	Neurological Disease
Noradrenaline bitartrate monohydrate (Levophed)	337,28	108341-18-0	Metabolic Disease
Mepivacaine HCl	282,81	1722-62-9	Metabolic Disease
Hygromycin B	527,52	31282-04-9	Cancer
Ampicillin sodium	371,39	69-52-3	Infection
Aspirin (Acetylsalicylic acid)	180,16	50-78-2	Cancer
Flumequine	261,25	42835-25-6	Metabolic Disease
Fenoprofen calcium hydrate	242,27	71720-56-4	Immunology
Reboxetine mesylate	409,5	98769-84-7	Neurological Disease
Fosaprepitant dimeglumine	1004,83	265121-04-8	Cardiovascular Disease
Moclobemide	268,74	71320-77-9	Neurological Disease
Palonosetron HCl	332,87	135729-62-3	Neurological Disease
Mirabegron (YM178)	396,51	223673-61-8	Cancer
Diclofenac Potassium	334,24	15307-81-0	Infection
Allylthiourea	116,18	109-57-9	Metabolic Disease
Flavoxate HCl	427,92	3717-88-2	Neurological Disease
Amfenac Sodium (monohydrate)	295,27	61618-27-7	Inflammation
Methazolamide	236,27	554-57-4	Neurological Disease
Bezafibrate	361,82	41859-67-0	Metabolic Disease
Carbimazole	186,23	22232-54-8	Infection
Teriflunomide	270,21	108605-62-5	Immunology
Methyclothiazide	360,24	135-07-9	Cardiovascular Disease
Uracil	112,09	66-22-8	
Dequalinium chloride	527,57	522-51-0	Endocrinology
Tiratricol	621,93	51-24-1	Endocrinology
Pyrithione zinc	317,7	13463-41-7	Infection
Azaguanine-8	152,11	134-58-7	Cancer
Lomerizine HCl	541,46	101477-54-7	Cardiovascular Disease
Furaltadone HCl	360,75	3759-92-0	Infection
Bismuth Subcitrate Potassium	782,67	880149-29-1	Infection
Montelukast Sodium	608,17	151767-02-1	Respiratory Disease
Eprosartan Mesylate	520,62	144143-96-4	Cardiovascular Disease
Piperacillin Sodium	539,54	59703-84-3	Infection
Isovaleramide	101,15	541-46-8	Neurological Disease
Pilocarpine HCl	244,72	54-71-7	Neurological Disease

Carprofen	273,71	53716-49-7	Inflammation
Cetrimonium Bromide	364,45	57-09-0	Infection
Tetracycline HCl	480,9	64-75-5	Infection
Etravirine (TMC125)	435,28	269055-15-4	Neurological Disease
Clobetasol propionate	466,97	25122-46-7	Neurological Disease
Pyridoxine hydrochloride	205,64	58-56-0	Endocrinology
Clindamycin palmitate HCl	699,85	25507-04-4	Infection
Biotin (Vitamin B7)	244,31	58-85-5	Infection
Bephenium Hydroxynaphthoate	443,53	3818-50-6	Vermifuge
Tripelennamine HCl	291,82	154-69-8	Neurological Disease
PCI-32765 (Ibrutinib)	440,5	936563-96-1	Neurological Disease
Naftifine HCl	323,86	65473-14-5	Infection
Carbazochrome sodium sulfonate	322,27	51460-26-5	Cancer
Anagrelide HCl	292,55	58579-51-4	Endocrinology
Niflumic acid	282,22	4394-00-7	Infection
Amitriptyline HCl	313,86	549-18-8	Infection
Niclosamide (Niclocide)	327,12	50-65-7	Neurological Disease
Triflusal	248,16	322-79-2	Infection
Droxidopa (L-DOPS)	213,19	23651-95-8	Immunology
Pergolide mesylate	410,59	66104-23-2	Neurological Disease
Azelnidipine	582,65	123524-52-7	Neurological Disease
Acebutolol HCl	372,89	34381-68-5	Neurological Disease
Diclofenac Diethylamine	369,29	78213-16-8	Neurological Disease
Avanafil	483,95	330784-47-9	Cardiovascular Disease
Colistin Sulfate	2801,26	1264-72-8	Infection
Orbifloxacin	395,38	113617-63-3	Infection
norethindrone	298,42	68-22-4	Neurological Disease
Benzylpenicillin sodium	356,37	69-57-8	Infection
Bextra (valdecoxib)	314,36	181695-72-7	Neurological Disease
Coumarin	146,14	91-64-5	
Ropivacaine HCl	310,86	132112-35-7	Infection
Climbazole	292,76	38083-17-9	Infection
Deferiprone	139,15	30652-11-0	Cardiovascular Disease
Domiphen Bromide	414,46	538-71-6	Infection
Propranolol HCl	295,8	318-98-9	Cardiovascular Disease
Broxyquinoline	302,95	521-74-4	Vermifuge
Levobetaxolol HCl	343,89	116209-55-3	Cardiovascular Disease
Isosorbide	146,14	652-67-5	

Tetramisole HCl	240,75	5086-74-8	Vermifuge
Dirithromycin	835,07	62013-04-1	Infection
Diminazene Aceturate	515,52	908-54-3	Vermifuge
Mevastatin	390,51	73573-88-3	Cardiovascular Disease
Histamine Phosphate	307,14	51-74-1	Cardiovascular Disease
Nithiamide	187,18	140-40-9	
Eprazinone 2HCl	453,44	10402-53-6	Respiratory Disease
Deoxycorticosterone acetate	372,5	56-47-3	Endocrinology
Vancomycin HCl (Vancocin)	1485,71	1404-93-9	Neurological Disease
Ulipristal	475,62	159811-51-5	Infection
Brompheniramine	435,31	980-71-2	Infection
Vitamin C (Ascorbic acid)	176,12	50-81-7	Respiratory Disease
Oseltamivir phosphate (Tamiflu)	410,4	204255-11-8	Cardiovascular Disease
Sulfamerazine	264,3	127-79-7	Infection
Buflomedil HCl	343,85	35543-24-9	Neurological Disease
Darifenacin HBr	507,46	133099-07-7	Infection
Peramivir Trihydrate	382,45	1041434-82-5	Cardiovascular Disease
Ethinodiol diacetate	384,51	297-76-7	Endocrinology
Rivaroxaban (Xarelto)	435,88	366789-02-8	Metabolic Disease
Antipyrine	188,23	60-80-0	Infection
Ciclopirox ethanolamine	268,35	41621-49-2	Infection
Adrenalone HCl	217,65	62-13-5	Cardiovascular Disease
Linagliptin (BI-1356)	472,54	668270-12-0	Cancer
Trifluoperazine 2HCl	480,42	440-17-5	Neurological Disease
Rofecoxib (Vioxx)	314,36	162011-90-7	Digestive system disease
Lithocholic acid	376,57	434-13-9	Neurological Disease
Alverine Citrate	473,56	5560-59-8	Digestive system disease
Ampiroxicam	447,46	99464-64-9	Cardiovascular Disease
Amikacin sulfate	781,76	39831-55-5	Infection
Sodium Picosulfate	481,41	10040-45-6	Metabolic Disease
Aclidinium Bromide	564,55	320345-99-1	Neurological Disease
Penfluridol	523,97	26864-56-2	Neurological Disease
olsalazine sodium	346,2	6054-98-4	Inflammation
Benzoic acid	122,12	65-85-0	
valganciclovir hydrochloride	390,82	175865-59-5	Endocrinology

Choline Chloride	139,62	67-48-1	
Sodium Nitroprusside	261,92	14402-89-2	Cardiovascular Disease
Mezlocillin Sodium	561,56	42057-22-7	Infection
tinidazole	247,27	19387-91-8	Infection
Salicylanilide	213,23	87-17-2	Infection
Mequinol	124,14	150-76-5	Infection
Ethacridine lactate monohydrate	361,39	6402-23-9	Infection
Loxapine Succinate	445,9	27833-64-3	Neurological Disease
Dibenzothiophene	184,26	132-65-0	
Difluprednate	508,55	23674-86-4	Endocrinology
Sucralose	397,63	56038-13-2	
Closantel Sodium	685,06	61438-64-0	Vermifuge
Mexiletine HCl	215,72	5370-01-4	Cardiovascular Disease
Sulconazole Nitrate	460,76	61318-91-0	Infection
Zoxazolamine	168,58	61-80-3	Neurological Disease
Dropropizine	236,31	17692-31-8	Respiratory Disease
Serotonin HCl	212,68	153-98-0	Neurological Disease
Xylometazoline HCl	280,84	1218-35-5	Infection
Indacaterol Maleate	508,56	753498-25-8	Infection
Dimethyl Fumarate	144,13	624-49-7	Inflammation
Sulfathiazole	255,32	72-14-0	Infection
L-Thyroxine	776,87	51-48-9	Neurological Disease
Sulfamethazine	278,33	57-68-1	Endocrinology
Fluocinonide (Vanos)	494,52	356-12-7	Endocrinology
Ibandronate sodium	360,23	138926-19-9	Neurological Disease
Nilvadipine (ARC029)	385,37	75530-68-6	Cancer
Sertaconazole nitrate	437,77	99592-39-9	Infection
Paroxetine HCl	365,83	78246-49-8	Infection
L-Arginine HCl	210,66	1119-34-2	Cancer
Rimonabant (SR141716)	463,79	168273-06-1	Inflammation
Azatadine dimaleate	522,55	3978-86-7	Infection
Bindarit	324,37	130641-38-2	Cancer
Catharanthine	336,43	2468-21-5	Inflammation
Lurasidone HCl	529,14	367514-88-3	Neurological Disease
Ethambutol HCl	277,23	1070-11-7	Neurological Disease
Besifloxacin HCl (Besivance)	430,3	405165-61-9	Cardiovascular Disease
Desloratadine	310,82	100643-71-8	Cardiovascular Disease
Naloxone HCl	363,84	357-08-4	Cancer

Tolcapone	273,24	134308-13-7	Metabolic Disease
Bismuth Subsalicylate	362,09	14882-18-9	Neurological Disease
nafcillin sodium monohydrate	454,47	7177-50-6	Endocrinology
Ethamsylate	263,31	2624-44-4	Cardiovascular Disease
Nabumetone	228,29	42924-53-8	Inflammation
Benzethonium chloride	448,08	121-54-0	Neurological Disease
Erythromycin Ethylsuccinate	862,05	1264-62-6	Infection
Cetylpyridinium Chloride	339,99	123-03-5	Infection
Hexamethonium bromide	362,19	55-97-0	Neurological Disease
Nefopam HCl	289,8	23327-57-3	Neurological Disease
Mefenamic acid	241,29	61-68-7	Cardiovascular Disease
Sasapyrine	258,23	552-94-3	Inflammation
Oxymetholone	332,48	434-07-1	Endocrinology
Bemegride	155,19	64-65-3	
Droperidol	379,43	548-73-2	Neurological Disease
Cysteamine HCl	113,61	156-57-0	Metabolic Disease
Closantel	663,07	57808-65-8	Vermifuge
Valnemulin HCl	601,28	133868-46-9	Infection
Tilmicosin	869,13	108050-54-0	Infection
Minocycline HCl	493,94	13614-98-7	Infection
Amprolium HCl	315,24	137-88-2	Metabolic Disease
Phenazopyridine HCl	249,7	136-40-3	Cardiovascular Disease
Sodium ascorbate	201,13	134-03-2	Endocrinology
Prochlorperazine Dimaleate	606,09	1984-2-6	Neurological Disease
Trimipramine Maleate	410,51	521-78-8	Neurological Disease
Sodium 4-aminohippurate Hydrate	216,17	94-16-6	
Famprofazone	377,52	22881-35-2	Inflammation
Metaproterenol Sulfate	520,59	5874-97-5	Respiratory Disease
Oxethazaine	467,64	126-27-2	Neurological Disease
Ractopamine HCl	337,84	90274-24-1	Neurological Disease
Camlylofin Chlorhydrate	393,39	54-30-8	Digestive system disease
Bekanamycin	483,51	4696-76-8	Infection
Mepenzolate Bromide	205,68	76-90-4	
Isoxicam	335,34	34552-84-6	Inflammation
Butacaine	306,44	149-16-6	Neurological Disease
Picrotoxinin	292,28	17617-45-7	
Guanethidine Sulfate	494,7	60-02-6	Cardiovascular Disease

Metaraminol Bitartrate	317,29	33402-03-8	
Pimecrolimus	810,45	137071-32-0	Cancer
Rolitetraacycline	527,57	751-97-3	Infection
Tolmetin Sodium	315,3	64490-92-2	Inflammation
Carbenoxolone Sodium	614,72	7421-40-1	Endocrinology
Aceclidine HCl	205,68	6109-70-2	
Alexidine HCl	581,71	22573-93-9	
Calcium Gluceptate	490,42	17140-60-2	
Diperodon HCl	433,93	537-12-2	Neurological Disease
Tofacitinib citrate (CP-690550 citrate)	504,49	540737-29-9	Cancer
Methapyrilene HCl	297,85	135-23-9	Neurological Disease
Pentoxifylline	278,31	6493-05-6	
Terfenadine	471,67	50679-08-8	Neurological Disease
Cinoxacin	262,22	28657-80-9	Infection
Fosfomycin Tromethamine	259,19	78964-85-9	
Imipramine HCl	316,87	113-52-0	Neurological Disease
9-Aminoacridine	194,23	90-45-9	
Carbadox	262,22	6804-07-5	Infection
Diphenylpyraline HCl	317,85	132-18-3	Neurological Disease
Isoetharine Mesylate	335,42	7279-75-6	Cardiovascular Disease
Methoxamine HCl	247,72	61-16-5	Cardiovascular Disease
Physostigmine Salicylate	413,47	57-64-7	Neurological Disease
Lofexidine HCl	295,59	21498-08-8	Cardiovascular Disease
Glafenine HCl	409,26	65513-72-6	Inflammation
Nicotine Ditartrate	462,46	65-31-6	Neurological Disease
Methylhydantoin-5-(D)	114,1	55147-68-7	
Anisindione	252,26	117-37-3	Cardiovascular Disease
Ceftazidime Pentahydrate	636,65	78439-06-2	Infection
Plerixafor (AMD3100)	502,78	110078-46-1	Immunology
Meclocycline Sulfosalicylate	695,05	73816-42-9	Infection
Metricrane	275,34	1084-65-7	Cardiovascular Disease
Pipenzolate Bromide	434,37	125-51-9	Neurological Disease
Thonzonium Bromide	591,71	553-08-2	Infection
Noscapine HCl	449,88	912-60-7	Cancer
Pridinol Methanesulfonate	391,52	6856-31-1	
Pyrilamine Maleate	401,46	59-33-6	Neurological Disease
Anisotropine Methylbromide	362,35	80-50-2	Neurological Disease

Clofoctol	365,34	37693-01-9	Infection
Pasiniazid	290,27	2066-89-9	Infection
Nifenazone	308,33	2139-47-1	Inflammation
Moxalactam Disodium	564,44	64953-12-4	Infection
Piromidic Acid	288,32	19562-30-2	Infection
Tolazamide	311,4	1156-19-0	Metabolic Disease
Difloxacin HCl	259,19	91296-86-5	Infection
Triflupromazine HCl	388,88	1098-60-8	Neurological Disease
Proadifen HCl	390,01	62-68-0	
Dichlorisone Acetate	455,37	79-61-8	Inflammation
Phosphatidylcholine	364,46	13492-01-8	
FK-506 (Tacrolimus)	804,02	104987-11-3	Cancer
Mepiroxol	125,13	6968-72-5	
Procodazole	190,2	23249-97-0	
Procyclidine HCl	323,9	1508-76-5	Neurological Disease
Tacrine HCl	234,72	1684-40-8	Neurological Disease
Phthalylsulfacetamide	362,36	131-69-1	
Dicyclomine HCl	345,95	67-92-5	Neurological Disease
Benzthiazide	431,94	91-33-8	Cardiovascular Disease
Oxeladin Citrate	527,6	52432-72-1	Respiratory Disease
Ethoxzolamide	258,32	452-35-7	Neurological Disease
Mesoridazine Besylate	544,75	32672-69-8	Neurological Disease
Nialamide	298,34	51-12-7	Neurological Disease
Tetraethylenepentamine 5HCl	371,61	4961-41-5	
Potassium Canrenoate	396,56	2181-04-6	Cardiovascular Disease
Lithium Citrate	281,98	6080-58-6	
Thioridazine HCl	407,04	130-61-0	Neurological Disease

9.5 Getesteten PPI Fragment-Library

Nr.	Compound_Supplier_ID	InChI
A01	Z30007882	InChI=1S/C11H11FN2OS/c12-9-3-1-2-8(6-9)7-10(15)14-11-13-4-5-16-11/h1-3,6H,4-5,7H2,(H,13,14,15)
A02	Z89120613	InChI=1S/C17H23N3O3/c1-12(21)20-9-4-13-10-14(2-3-16(13)20)18-17(23)11-19-7-5-15(22)6-8-19/h2-3,10,15,22H,4-9,11H2,1H3,(H,18,23)
A03	Z403317948	InChI=1S/C11H16N4O2/c16-10(8-15-7-3-6-13-15)14-9-4-1-2-5-12-11(9)17/h3,6-7,9H,1-2,4-5,8H2,(H,12,17)(H,14,16)
A04	Z982668562	InChI=1S/C14H17NO2/c16-14(10-7-8-10)15-12-5-3-9-17-13-6-2-1-4-11(12)13/h1-2,4,6,10,12H,3,5,7-9H2,(H,15,16)
A05	Z1265645309	InChI=1S/C15H20N2O2S/c18-20(19,16-10-4-1-5-11-16)17-12-15(8-9-15)13-6-2-3-7-14(13)17/h2-3,6-7H,1,4-5,8-12H2
A06	Z911411356	InChI=1S/C16H25NO2/c18-15(16(19)3-1-2-4-16)17-10-13-6-11-5-12(7-13)9-14(17)8-11/h11-14,19H,1-10H2
A07	Z1529862162	InChI=1S/C19H24N2O3/c1-12-18(19(23)20-8-7-13(10-20)11-22)16-9-15(24-2)5-6-17(16)21(12)14-3-4-14/h5-6,9,13-14,22H,3-4,7-8,10-11H2,1-2H3
A08	Z2055495904	InChI=1S/C17H22N2O4/c1-23-14-8-13(11-20)19(9-14)16(21)10-18-7-6-12-4-2-3-5-15(12)17(18)22/h2-5,13-14,20H,6-11H2,1H3/t13-,14+/m0/s1
A09	Z1609499673	InChI=1S/C13H15NO5/c15-11(9-1-2-10(19-9)12(16)17)14-5-3-13(7-14)4-6-18-8-13/h1-2H,3-8H2,(H,16,17)
A10	Z2058784616	InChI=1S/C18H29N3O3/c1-19-7-4-14(5-8-19)17-15(6-9-24-17)18(23)21-11-16(22)20(12-21)10-13-2-3-13/h13-15,17H,2-12H2,1H3/t15-,17+/m0/s1
A11	Z1728142409	InChI=1S/C13H19F3N2O3.ClH/c14-13(15,16)7-17-11(19)6-18-9-4-2-1-3-8(9)5-10(18)12(20)21;/h8-10H,1-7H2,(H,17,19)(H,20,21);1H
A12	Z2313686148	InChI=1S/C13H23N3OS/c1-14-4-6-15(7-5-14)13(17)2-3-16-9-12-8-11(16)10-18-12/h11-12H,2-10H2,1H3/t11-,12-/m0/s1
B01	Z1284919148	InChI=1S/C13H23NO4S/c1-19(16,17)10-5-12(15)14-8-9-18-13(11-14)6-3-2-4-7-13/h2-11H2,1H3
B02	Z2064126920	InChI=1S/C16H24N4O2/c1-18(2)13-4-6-17-10-12(13)16(21)20-8-9-22-15-5-7-19(3)11-14(15)20/h4,6,10,14-15H,5,7-9,11H2,1-3H3
B03	Z1995554428	InChI=1S/C15H20N2O3/c1-12-2-3-13(9-16-12)8-14(18)17-5-7-20-11-15(17)4-6-19-10-15/h2-3,9H,4-8,10-11H2,1H3
B04	Z1958069990	InChI=1S/C15H29N3O2S/c1-16-10-6-15-14(13-16)5-4-9-18(15)21(19,20)12-11-17-7-2-3-8-17/h14-15H,2-13H2,1H3
B05	Z1904474990	InChI=1S/C15H21NO2/c1-2-7-15(6-1)13(12-5-9-18-14(12)15)16-10-11-4-3-8-17-11/h3-4,8,12-14,16H,1-2,5-7,9-10H2/t12-,13?,14-/m1/s1
B06	Z1390620111	InChI=1S/C17H26N2O2S/c1-10(2)7-14-16(22-11(3)18-14)17(21)19-8-12-5-4-6-13(9-19)15(12)20/h10,12-13,15,20H,4-9H2,1-3H3
B07	Z1904489918	InChI=1S/C17H29N3O2/c18-14(21)11-20-8-3-12(4-9-20)19-15-13-5-10-22-16(13)17(15)6-1-2-7-17/h12-13,15-16,19H,1-11H2,(H2,18,21)/t13-,15?,16-/m1/s1

B08	Z1446847682	InChI=1S/C17H27N3O2/c1-13-10-15(20-16(18-13)12-21-2)19-14-6-9-22-17(11-14)7-4-3-5-8-17/h10,14H,3-9,11-12H2,1-2H3,(H,18,19,20)
B09	Z228587442	InChI=1S/C11H15N3O.2ClH/c15-11(10-2-5-13-6-3-10)14-8-1-4-12-7-9-14;;/h2-3,5-6,12H,1,4,7-9H2;2*1H
B10	Z647342438	InChI=1S/C12H13F3N2O/c13-12(14,15)9-3-4-10-8(6-9)2-1-5-17(10)7-11(16)18/h3-4,6H,1-2,5,7H2,(H2,16,18)
B11	Z886909626	InChI=1S/C17H22N2O3/c20-16(12-18-17(21)13-6-2-1-3-7-13)19-10-11-22-15-9-5-4-8-14(15)19/h1-3,6-7,14-15H,4-5,8-12H2,(H,18,21)
B12	Z645707880	InChI=1S/C15H23N5O2S/c1-16-14(22)12-3-2-5-20(12)13(21)11-18-6-8-19(9-7-18)15-17-4-10-23-15/h4,10,12H,2-3,5-9,11H2,1H3,(H,16,22)
C01	Z858480638	InChI=1S/C15H14F3N3O3S/c1-9-3-4-10(7-12(9)15(16,17)18)20-14(22)21-11-5-6-13(19-8-11)25(2,23)24/h3-8H,1-2H3,(H2,20,21,22)
C02	Z1219973411	InChI=1S/C18H20N2O3/c21-18(20-9-2-10-22-16-4-1-3-15(16)20)14-7-5-13(6-8-14)17-11-19-12-23-17/h5-8,11-12,15-16H,1-4,9-10H2
C03	Z1316795852	InChI=1S/C12H17N3O4S/c1-13-8-9(10(16)14(2)11(13)17)20(18,19)15-7-6-12(15)4-3-5-12/h8H,3-7H2,1-2H3
C04	Z1309401198	InChI=1S/C15H20N2O3/c18-15(16-6-10-2-1-5-19-10)9-17-7-11-12(8-17)14-4-3-13(11)20-14/h1-2,5,11-14H,3-4,6-9H2,(H,16,18)
C05	Z1547274387	InChI=1S/C18H23ClN2O3S/c1-12-2-4-14(19)10-17(12)25(23,24)20-9-8-16-13(11-20)3-7-18(22)21(16)15-5-6-15/h2,4,10,13,15-16H,3,5-9,11H2,1H3
C06	Z1231902921	InChI=1S/C16H23N3O2S/c1-11-10-22-15(17-11)16(8-4-2-3-5-9-16)19-14(21)12-6-7-13(20)18-12/h10,12H,2-9H2,1H3,(H,18,20)(H,19,21)
C07	Z1597783260	InChI=1S/C17H26N2O3S/c1-17(2)15(14-9-6-12-22-16(14)17)18-10-11-19-23(20,21)13-7-4-3-5-8-13/h3-5,7-8,14-16,18-19H,6,9-12H2,1-2H3
C08	Z1627767970	InChI=1S/C14H23NO2S/c1-13(2)11-5-6-14(13)9-18(16,17)15(12(14)7-11)8-10-3-4-10/h10-12H,3-9H2,1-2H3/t11-,12-,14+/m1/s1
C09	Z2034490709	InChI=1S/C12H15FN2O/c13-10-1-2-11(14-7-10)15-5-3-12(8-15)4-6-16-9-12/h1-2,7H,3-6,8-9H2
C10	Z1301348429	InChI=1S/C17H30N2O2/c1-14(16(20)18-15-5-3-2-4-6-15)19-10-7-17(13-19)8-11-21-12-9-17/h14-15H,2-13H2,1H3,(H,18,20)
C11	Z1396961645	InChI=1S/C16H19N3O2S/c1-19-11-14(10-17-19)22(20,21)18-9-13-8-16(13)7-6-12-4-2-3-5-15(12)16/h2-5,10-11,13,18H,6-9H2,1H3
C12	Z760072752	InChI=1S/C13H21N3O2.ClH/c17-12(15-9-5-6-9)11-4-2-8-16(11)13(18)10-3-1-7-14-10;/h9-11,14H,1-8H2,(H,15,17);1H/t10-,11?;/m0./s1
D01	Z1441244272	InChI=1S/C15H19F3N2O2/c16-15(17,18)11-22-13-2-1-12(7-19-13)8-20-5-3-14(9-20)4-6-21-10-14/h1-2,7H,3-6,8-11H2
D02	Z334883210	InChI=1S/C13H17NO/c1-2-4-13-11(3-1)12(7-8-15-13)14-9-10-5-6-10/h1-4,10,12,14H,5-9H2

D03	Z2058808973	InChI=1S/C19H24N4O3/c1-2-22-16(24)6-5-15(18(22)13-7-9-20-10-8-13)19(26)21-11-17(25)23(12-21)14-3-4-14/h7-10,14-15,18H,2-6,11-12H2,1H3/t15-,18+/m0/s1
D04	Z827414780	InChI=1S/C11H15N3O3/c1-9(15)13-4-2-5-14(7-6-13)11(16)10-3-8-17-12-10/h3,8H,2,4-7H2,1H3
D05	Z1956884299	InChI=1S/C9H18N2O4S/c1-8-5-11(16(10,12)13)6-9(15-8)3-2-4-14-7-9/h8H,2-7H2,1H3,(H2,10,12,13)
D06	Z1444321689	InChI=1S/C13H24N2O5S/c1-4-9(2)11(13(17)18)14-12(16)10-6-5-7-15(8-10)21(3,19)20/h9-11H,4-8H2,1-3H3,(H,14,16)(H,17,18)/t9-,10?,11-/m0/s1
D07	Z109715016	InChI=1S/C21H23N3O5/c1-12-7-13(2)23-21(27)16(12)10-22-20(26)14-8-19(25)24(11-14)15-3-4-17-18(9-15)29-6-5-28-17/h3-4,7,9,14H,5-6,8,10-11H2,1-2H3,(H,22,26)(H,23,27)
D08	Z437580758	InChI=1S/C9H11N3OS/c13-9(8-7-10-1-2-11-8)12-3-5-14-6-4-12/h1-2,7H,3-6H2
D09	Z595692196	InChI=1S/C16H14ClN5O/c17-13-6-3-7-14(15(13)22-10-4-9-20-22)21-16(23)19-11-12-5-1-2-8-18-12/h1-10H,11H2,(H2,19,21,23)
D10	Z804518928	InChI=1S/C18H21N3O2/c22-18(21-9-10-23-17-8-4-7-16(17)21)15-11-19-20(13-15)12-14-5-2-1-3-6-14/h1-3,5-6,11,13,16-17H,4,7-10,12H2
D11	Z979743300	InChI=1S/C12H12O3/c13-11(14)9-7-12(9)5-6-15-10-4-2-1-3-8(10)12/h1-4,9H,5-7H2,(H,13,14)
D12	Z1241467059	InChI=1S/C17H25N3O/c21-16(19-13-15-4-3-9-18-12-15)14-20-10-7-17(8-11-20)5-1-2-6-17/h3-4,9,12H,1-2,5-8,10-11,13-14H2,(H,19,21)
E01	Z1256681948	InChI=1S/C17H21N3O3S/c1-13-5-7-14(8-6-13)19-12-15(11-18-19)24(21,22)20-9-10-23-17-4-2-3-16(17)20/h5-8,11-12,16-17H,2-4,9-10H2,1H3
E02	Z1299854759	InChI=1S/C13H18N2O/c14-13(16)10-15-9-5-1-2-6-11-7-3-4-8-12(11)15/h3-4,7-8H,1-2,5-6,9-10H2,(H2,14,16)
E03	Z1621941214	InChI=1S/C15H23ClN4O.ClH/c1-3-11(2)13(17)15(21)20-9-7-19(8-10-20)14-12(16)5-4-6-18-14;/h4-6,11,13H,3,7-10,17H2,1-2H3;1H/t11-,13-;/m0./s1
E04	Z1459722805	InChI=1S/C18H25FN4O2.2ClH/c1-21(18(25)13-23-11-8-20-12-17(23)24)15-6-9-22(10-7-15)16-4-2-14(19)3-5-16;;/h2-5,15,20H,6-13H2,1H3;2*1H
E05	Z1994386632	InChI=1S/C12H20N2O3/c15-11(13-10-1-2-10)7-14-4-6-17-9-12(14)3-5-16-8-12/h10H,1-9H2,(H,13,15)
E06	Z1446845287	InChI=1S/C16H19FN2O2/c17-11-3-4-14-13(9-11)19-15(21-14)18-12-5-8-20-16(10-12)6-1-2-7-16/h3-4,9,12H,1-2,5-8,10H2,(H,18,19)
E07	Z1642770956	InChI=1S/C16H19ClN2O3/c1-16(9-22-10-16)15(21)18-12-6-4-8-19(14(12)20)13-7-3-2-5-11(13)17/h2-3,5,7,12H,4,6,8-10H2,1H3,(H,18,21)
E08	Z1932667897	InChI=1S/C17H23N3O3/c1-19-8-7-14(17(19)13-5-3-2-4-6-13)18-15(21)11-20-9-10-23-12-16(20)22/h2-6,14,17H,7-12H2,1H3,(H,18,21)
E09	Z1821392195	InChI=1S/C16H17N3O2S/c1-11-14(22-18-17-11)15(20)19-8-9-21-16(10-19)7-6-12-4-2-3-5-13(12)16/h2-5H,6-10H2,1H3

E10	Z1715842156	InChI=1S/C11H14N2O3S/c12-17(14,15)13-6-5-11(8-13)10-4-2-1-3-9(10)7-16-11/h1-4H,5-8H2,(H2,12,14,15)
E11	Z1666691269	InChI=1S/C17H22N2O3/c20-16(19-8-6-17(12-19)4-1-5-17)13-2-7-18-15(10-13)22-14-3-9-21-11-14/h2,7,10,14H,1,3-6,8-9,11-12H2
E12	Z1756368845	InChI=1S/C17H24N2O2S/c1-11-19-15-12(3-2-4-14(15)22-11)10-18-16(20)13-9-17(13)5-7-21-8-6-17/h12-13H,2-10H2,1H3,(H,18,20)
F01	Z1796749398	InChI=1S/C18H24N2O2/c1-15(17-4-2-3-16(11-17)12-19)20-7-10-22-14-18(13-20)5-8-21-9-6-18/h2-4,11,15H,5-10,13-14H2,1H3
F02	Z1486705591	InChI=1S/C8H15NO3S/c1-13(10,11)9-5-6-12-7-8(9)3-2-4-8/h2-7H2,1H3
F03	Z1892408066	InChI=1S/C18H26N2O4/c1-3-24-15-11-14(21)18(15)5-8-19(9-6-18)17(23)12-20-7-4-13(2)10-16(20)22/h4,7,10,14-15,21H,3,5-6,8-9,11-12H2,1-2H3
F04	Z1998580791	InChI=1S/C13H24N2O4S/c16-20(17,10-7-14-4-1-2-5-14)15-6-9-19-12-13(15)3-8-18-11-13/h1-12H2
F05	Z29526327	InChI=1S/C17H16F3N3O3S/c18-17(19,20)13-4-3-5-14(12-13)27(25,26)23-10-8-22(9-11-23)16(24)15-6-1-2-7-21-15/h1-7,12H,8-11H2
F06	Z226214914	InChI=1S/C18H21N3O4S/c1-12-3-7-15(26(23,24)21-14-5-6-14)9-16(12)18(22)20-11-13-4-8-17(25-2)19-10-13/h3-4,7-10,14,21H,5-6,11H2,1-2H3,(H,20,22)
F07	Z641668194	InChI=1S/C16H22N2O/c17-16(19)13-8-10-18(11-9-13)15-7-3-5-12-4-1-2-6-14(12)15/h1-2,4,6,13,15H,3,5,7-11H2,(H2,17,19)
F08	Z300070692	InChI=1S/C11H20N2O2.ClH/c14-11(13-5-7-15-8-6-13)9-10-1-3-12-4-2-10;/h10,12H,1-9H2;1H
F09	Z45715933	InChI=1S/C12H17NO4S/c1-3-9(2)11(12(14)15)13-18(16,17)10-7-5-4-6-8-10/h4-9,11,13H,3H2,1-2H3,(H,14,15)
F10	Z316325562	InChI=1S/C12H12ClNO3/c1-7-2-3-9(13)5-10(7)14-6-8(12(16)17)4-11(14)15/h2-3,5,8H,4,6H2,1H3,(H,16,17)
F11	Z1348592408	InChI=1S/C18H23ClN2O2/c19-14-2-1-3-15(12-14)21-8-4-16(17(21)22)20-9-5-18(13-20)6-10-23-11-7-18/h1-3,12,16H,4-11,13H2
F12	Z1408722346	InChI=1S/C17H18N2O3/c20-16(10-12-6-9-21-19-12)18-14-11-17(7-3-8-17)22-15-5-2-1-4-13(14)15/h1-2,4-6,9,14H,3,7-8,10-11H2,(H,18,20)
G01	Z1311428973	InChI=1S/C17H24N2OS/c1-11-10-21-16(18-11)12-6-8-19(9-7-12)17(20)15-13-4-2-3-5-14(13)15/h10,12-15H,2-9H2,1H3
G02	Z1441412346	InChI=1S/C17H22F3NO/c18-17(19,20)14-6-3-4-13(10-14)11-21-9-8-16(22)7-2-1-5-15(16)12-21/h3-4,6,10,15,22H,1-2,5,7-9,11-12H2
G03	Z1436302433	InChI=1S/C13H15NO3/c1-9-4-2-5-10(8-9)11(15)14-13(12(16)17)6-3-7-13/h2,4-5,8H,3,6-7H2,1H3,(H,14,15)(H,16,17)
G04	Z823360366	InChI=1S/C18H29N3O.C4H4O4/c1-11-17(12(2)21(20-11)3-4-22)10-19-18-15-6-13-5-14(8-15)9-16(18)7-13;5-3(6)1-2-4(7)8/h13-16,18-19,22H,3-10H2,1-2H3;1-2H,(H,5,6)(H,7,8)

G05	Z1795980062	InChI=1S/C15H19NO2/c17-14(18)15-8-4-7-13(15)10-16(11-15)9-12-5-2-1-3-6-12/h1-3,5-6,13H,4,7-11H2,(H,17,18)/t13-,15-/m1/s1
G06	Z1818225163	InChI=1S/C15H24F2N2O3/c1-22-10-9-18-7-2-8-19(11-13(18)20)14(21)12-3-5-15(16,17)6-4-12/h12H,2-11H2,1H3
G07	Z2017206063	InChI=1S/C16H16F3N5/c1-23-13(6-7-20-23)10-8-11-2-3-12(9-10)24(11)15-5-4-14(21-22-15)16(17,18)19/h4-8,11-12H,2-3,9H2,1H3
G08	Z1436736848	InChI=1S/C16H24ClN5.HI/c17-14-3-1-4-15(13-14)22-11-9-21(10-12-22)8-7-20-16-18-5-2-6-19-16;/h1,3-4,13H,2,5-12H2,(H2,18,19,20);1H
G09	Z1090101062	InChI=1S/C11H14BrN3O.HI/c12-9-1-3-10(4-2-9)16-8-7-15-11-13-5-6-14-11;/h1-4H,5-8H2,(H2,13,14,15);1H
G10	Z1089991460	InChI=1S/C12H24N4O.HI/c1-12(2,16-6-8-17-9-7-16)10-15-11-13-4-3-5-14-11;/h3-10H2,1-2H3,(H2,13,14,15);1H
G11	Z404856490	InChI=1S/C15H23N5O2/c1-11(21)20-8-4-6-13(20)15(22)19-7-3-5-12(9-19)14-17-16-10-18(14)2/h10,12-13H,3-9H2,1-2H3/t12?,13-/m0/s1
G12	Z1543030359	InChI=1S/C17H21NO2/c1-12-3-2-4-13-5-8-18(15(12)13)16(19)14-11-17(14)6-9-20-10-7-17/h2-4,14H,5-11H2,1H3
H01	Z1622662848	InChI=1S/C17H26N2O3.ClH/c1-4-12(2)16(18)17(20)19-8-9-22-15(11-19)13-6-5-7-14(10-13)21-3;/h5-7,10,12,15-16H,4,8-9,11,18H2,1-3H3;1H
H02	Z1139286115	InChI=1S/C16H25N5O2/c1-18-11-14(10-17-18)12-19-5-3-7-20(9-8-19)16(23)13-21-6-2-4-15(21)22/h10-11H,2-9,12-13H2,1H3
H03	Z381359974	InChI=1S/C14H17NO5S/c1-19-10-3-4-11(13(6-10)20-2)15-12-8-21(17,18)7-9(12)5-14(15)16/h3-4,6,9,12H,5,7-8H2,1-2H3
H04	Z384361038	InChI=1S/C16H20N2O4/c19-15(17-9-12-5-7-21-11-12)10-18-13-3-1-2-4-14(13)22-8-6-16(18)20/h1-4,12H,5-11H2,(H,17,19)
H05	Z1828123840	InChI=1S/C14H26N2O2.ClH/c1-5-15-6-2-13(1)11-16-7-10-18-14(12-16)3-8-17-9-4-14;/h13,15H,1-12H2;1H
H06	Z1459341320	InChI=1S/C15H24N2O2.ClH/c16-13-11-2-1-10(7-11)12(13)14(18)17-5-3-15(8-17)4-6-19-9-15;/h10-13H,1-9,16H2;1H
H07	Z285572878	InChI=1S/C10H15N3OS.2ClH/c1-8-9(15-7-12-8)10(14)13-5-2-3-11-4-6-13;;/h7,11H,2-6H2,1H3;2*1H

10 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Januar 2018 und Juli 2021 im Institut für Pharmazeutische Biologie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Rolf Marschalek in Kooperation mit Dr. Jan Peter Heering (Fraunhofer ITMP, Goethe-Universität Frankfurt am Main) und Prof. Dr. Eugen Proschak (Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt am Main) durchgeführt.

Ein riesen Dankeschön geht an meinem Doktorvater Prof. Dr. Rolf Marschalek für die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis, für die Vergabe des sehr spannenden und interessanten Themen und für die exzellente Betreuung.

Ein weiterer Dank geht an Prof Dr. Robert Fürst für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz herzliches Dankeschön gebührt Herrn Dr. Jan Peter Heering, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, sehr viel Geduld mitbrachte und mich exzellent betreut hat. Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Eugen Proschak für seine Kooperation und hilfreichen Ratschläge.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Silvia Bracharz, Jennifer Reis, Dr. Patrizia Larghero, Lisa Tschage, Melissa Krishnatas, Dr. Arpita Kundu, Dr. Eric Kowarz, Dr. Ilse Zündorf für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, sowie für das lockere und lustige Klima im Labor.

Ganz herzlich bedanke ich mich einfach für ALLES bei Anna Lena Siemund, Patrick Streb, Marius Külp und Dr. Claus Bernd Meyer. Bessere Kollegen kann man sich nicht wünschen.

Ohne eure seelische Unterstützung, Rückhalt und Freundschaft und die vielen lustigen Momente wäre mir einiges sehr viel schwerer gefallen. 😊

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie und meinem Freund Dank, die während meiner ganzen Promotionszeit mich Tatkräftig unterstützt, zu mir gestanden und mir immer wieder Mut zugesprochen haben.

Vielen Dank !

11 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Vanessa Luciano, die hier vorgelegte Dissertation über die

„Identifizierung potenzieller Taspase1 Inhibitoren für die Behandlung von t(4,11) akuter Leukämie“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

.....

Unterschrift

12 Persönliche Daten
