

Inhibierung des pathomolekularen Mechanismus einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jens Rabenstein
Aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2008
(DF1)

Vom Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität in Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen.

Dekan:

Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter:

Prof. Dr. R. Marschalek

2. Gutachter:

Prof. Dr. T. Dingermann

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	6
2.1 Leukämie	6
2.2 Chromosomale Translokationen	6
2.3 Translokationen des Typs t(4;11)(q21;q23)	7
2.4 Klinisches Erscheinungsbild einer t(4;11)-Leukämie	8
2.5 Die Wildtypproteine MLL und AF4	9
2.6 Aufgaben des Wildtypproteins MLL	10
2.7 Die Protease Taspase1	12
2.8 Strukturelle Besonderheiten der Taspase1	13
2.9 Rolle der Taspase1 bei der Aktivierung von MLL	14
2.10 Taspase1 ist maßgeblich an der Ausbildung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie beteiligt.	17
2.11 Zielsetzung der Arbeit	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Inhibierung von Taspase1	20
3.1.1 Etablierung eines Aktivitätsassays für Taspase1	20
3.1.2 Suche nach Taspase1-Inhibitoren	23
3.1.3 Das Homologiemodell der Taspase1	26
3.1.4 Die Kristallstruktur von Taspase1	28
3.2 Substratmutagenese und ihre Wirkung auf Taspase1	32
3.2.1 Mutagenese von 2CL	32
3.2.2 Einsatz der mutierten 2CL-Teilfragmente MWG6 und MWG7 im Taspase1 Inhibierungsassay	34
3.2.3 Die 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2	36
3.3 Abhängigkeit der Taspase1-Aktivität von der Chloridionenkonzentration	38
3.4 Inhibierung von Taspase1 mit <i>Cagern</i>	41
3.5 Untersuchungen zur Funktionsweise von Taspase1	42
3.6 Herstellung der Taspase1-Mutanten F98A; T234D und S252D	43
3.7 Klonierung und Expression neuer potentieller Taspase1-Substrate	45
4 Diskussion	49
4.1 Das Homologiemodell der Taspase1	49
4.2 Die Kristallstruktur der Taspase1	49

4.2.1	Das im katalytischen Zentrum komplexierte Chloridion inhibiert Taspase1 unter physiologischen Bedingungen	50
4.2.2	Das Aspartat an Position Sieben der <i>cleavage sites</i> CS1 und CS2 ist essentiell für die Aktivierung des katalytischen Zentrums der Taspase1	50
4.2.3	Das 2CL-Teilfragment 2CL-CS1-B-CS2 stellt das kleinste bekannte Molekül dar, das mit Taspase1 selektiv interagieren kann.	51
4.2.4	Die nukleophilen Eigenschaften des Threonin 234 sind essentiell für die proteolytische Aktivität der Taspase1	54
4.2.5	MLL4 stellt ein neues Substrat für Taspase1 dar.....	55
4.3	Nachwort.....	56
4.4	Ausblick	57
5	Material und Methoden	59
5.1	Material	59
5.1.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen.....	59
5.1.2	Allgemeine Puffer.....	67
5.1.3	Synthetische Oligonukleotide.....	68
5.1.4	Verwendete Organismen	70
5.1.5	Vektoren und Plasmide	71
5.2	Standardmethoden	73
5.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	73
5.3	Nukleinsäuretechniken.....	73
5.3.1	cDNA-Synthese	73
5.3.2	Primergerichtete Doppelstrangmutagenese.....	73
5.3.3	Sequenzanalyse	74
5.4	Proteintechniken.....	75
5.4.1	Proteinaufreinigung durch native Nickelchelate-Affinitätschromatographie	75
5.4.2	Umpuffern nativ aufgereinigter Proteinen	75
5.4.3	Ermittlung der Aktivität von Taspase1.....	75
6	Abkürzungen.....	76
7	Literaturverzeichnis	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Entstehung einer t(4;11) Translokation.....	8
Abb. 2.2	Modularer Aufbau des MLL-Proteins	9
Abb. 2.3	Autokatalytische Aktivierung von Taspase1	13
Abb. 2.4	Kristallstruktur der Taspase1	14
Abb. 2.5	Aufbau und Position der beiden <i>cleavage sites</i> CS1 und CS2	15
Abb. 2.6	Entstehung des MLL-Multiproteinkomplexes	16
Abb. 2.7	Pathomolekulares Modell zur Entstehung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie ..	18
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des Substrates 2CL.....	20
Abb. 3.2	Test der nativen Aufreinigungen von Taspase1 und 2CL im SDS-PAGE	21
Abb. 3.3	Taspase-Aktivitätsassay	22
Abb. 3.4	Taspase1-Zeitkinetik.....	22
Abb. 3.5	Inhibierung von Taspase1 mit Proteaseinhibitoren und Lösungsmitteln.....	24
Abb. 3.6	Konzentrationsabhängige Taspase1-Inhibierung durch DMSO.....	25
Abb. 3.7	Homologiemodell der Taspase1	26
Abb. 3.8	Taspase1-Inhibierungsassay mit Inhibitoren, die vom Homologiemodell abgeleitet wurden (Beispiel).....	27
Abb. 3.9	Kristallstruktur der Taspase1	28
Abb. 3.10	Angriffspunkt der Inhibitoren innerhalb des aktiven Zentrums der Taspase1	29
Abb. 3.11	Taspase1-Inhibierungsassay mit <i>deep hole</i> -Inhibitoren (Beispiel)	29
Abb. 3.12	Komplexiertes Chloridion im katalytischen Zentrum der Taspase1	30
Abb. 3.13	Positionierung des Substrates MLL im katalytischen Zentrum von Taspase1.....	31
Abb. 3.14	Hergestellte 2CL-Mutanten	32
Abb. 3.15	Einsatz der 2CL-Mutanten, als Substrate im Taspase1-Aktivitätsassay.....	33
Abb. 3.16	Sequenz der beiden Peptide MWG6 und MWG7	34
Abb. 3.17	Taspase1-Inhibierungsassay mit den Peptiden MWG6 und MWG7 als Inhibitoren.....	34
Abb. 3.18	Taspase1-Inhibierungsassay mit MWG6 und MWG7 unter Zusatz von Triton-X100.....	35
Abb. 3.19	Aufreinigung der 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2	36
Abb. 3.20	Einsatz der 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2 als allosterische Aktivatoren für das katalytische Zentrum der Taspase1	37
Abb. 3.21	Kontrollen zur Wirkung der 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2 als allosterische Aktivatoren für das katalytische Zentrum der Taspase1.....	38
Abb. 3.22	Taspase1-Aktivitätsassay mit und ohne Chloridionen	39

Abb. 3.23	Abhängigkeit der Taspase1-Aktivität von der Chloridionenkonzentration.....	39
Abb. 3.24	Position der <i>Cager</i> im aktiven Zentrum der Taspase1.....	41
Abb. 3.25	Taspase1-Inhibierungsassay mit <i>Cagern</i>	41
Abb. 3.26	Postulierter Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von MLL durch Taspase1.....	42
Abb. 3.27	Helix über dem katalytischen Zentrum der Taspase1.....	43
Abb. 3.28	Katalytische Aktivität der Taspase1-Mutanten F98A; T234D und S252D	44
Abb. 3.29	Test der nativen Aufreinigungen von AKNA, DYRK3, MLL4, NXF2 und TF2A ...	46
Abb. 3.30	Test der potentiellen Taspase1-Substrate imTaspase1-Aktivitätsassay	47
Abb. 4.1	Aktivierung der beiden katalytischen Zentren der Taspase1 durch ihr Substrat bzw. 2CL-CS1-B-CS2	53
Abb. 5.1	Potentielle Taspase1-Inhibitoren (A1 bis D02), abgeleitet von Homologiemodell60	
Abb. 5.2	Potentielle Taspase1-Inhibitoren (D03 bis G05), abgeleitet vom Homologiemodell.....	61
Abb. 5.3	Potentielle Taspase1-Inhibitoren (G06 bis H10), abgeleitet vom Homologiemodell.....	62
Abb. 5.4	Potentielle Taspase1-Inhibitoren für <i>deep hole</i>	63
Abb. 5.5	Potentielle Taspase1-Inhibitoren für <i>chloride hole</i>	64
Abb. 5.6	Potentielle Taspase1- <i>Cagern</i>	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzten Proteine, mit ihren Konsensussequenzen	47
--	-----------

1 Zusammenfassung

Taspase1 stellt die bisher einzige Typ2-Asparaginase mit proteolytischer Aktivität dar. Das wichtigste Substrat der Taspase1 ist das MLL-Protein, einem Homolog des Trithorax-Proteins aus *Drosophila melanogaster*, das auch dort eine wichtige Rolle bei Differenzierungsprozessen spielt.

Bei Patienten mit einer t(4;11)-Translokation ist Taspase1 maßgeblich an der Ausbildung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie beteiligt. Die Inhibierung der proteolytischen Aktivität der Taspase1 könnte daher einen Ansatzpunkt für eine neuartige Krebstherapie darstellen.

Aufgrund der ungewöhnlichen Eigenschaften von Taspase1 ist es bisher nicht gelungen einen selektiven Inhibitor für das katalytische Zentrum der Taspase1 zu identifizieren. Unter nativen Bedingungen (ca. 50 mM NaCl) befindet sich Taspase1 bereits in einem nahezu vollständig inhibierten Zustand, da im katalytischen Zentrum der Taspase1 ein Chloridion komplexiert ist. Dieses Chloridion wird einzig und allein nach Interaktion mit dem natürlichen Substrat MLL aus dem katalytischen Zentrum verdrängt, was zu einer kurzfristigen Aktivierung der Taspase1 führt. Nach Ablauf der hydrolytischen Spaltung des Substrates nimmt das Chloridion wieder seine Position im katalytischen Zentrum ein. Unter diesen Bedingungen ist aus sterischen Gründen die Bindung eines potentiellen Inhibitors im katalytischen Zentrum nicht möglich.

Durch Herstellung von Mutanten der Taspase1 und deren Substrats konnte der Mechanismus der katalytischen Spaltung durch Taspase1 aufgeklärt werden. Dabei erwiesen sich drei Aminosäuren als essentiell für die Hydrolyse. Interessanterweise ist die Anwesenheit des Substrates, insbesondere des Aspartates an Position Sieben der *cleavage sites* CS1 bzw. CS2 notwendig um den katalytischen Prozess zu starten. Das negativ geladene Aspartat, verdrängt zunächst das Chloridion von seiner Position und aktiviert dadurch das katalytische Zentrum (Rotation von Threonin 234). Erst dadurch wird Threonin 234 zu einer katalytisch aktiven Aminosäure und kann einen nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung zwischen Aspartat und Glycin des Substrates durchführen. Die Hydrolyse wird dabei durch die OH-Gruppe des Serins 252 durch Wechselwirkung mit dem Carboxylsauerstoff unterstützt.

Durch Mutation beider Aspartate an Position sieben im artifiziellen Substrat 2CL zu Glycin oder Lysin führte zu einem vollständigen Verlust der hydrolytischen Spaltung an CS1 und zu einem starken Rückgang der hydrolytischen Spaltung an CS2.

Die Mutationen T234D und S252D der Taspase1 führten beide zum vollständigen Verlust der katalytischen Spaltung, sowohl *in cis*, als auch *in trans*.

Unter Verwendung des Taspase1-Aktivitätsassays konnte der transkriptionelle Regulator MLL4 als potentielles Substrat der Taspase1 identifiziert werden.

2 Einleitung

2.1 Leukämie

Leukämie ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems im Knochenmark. Die Bezeichnung Leukämie bedeutet Weißblütigkeit und wurde 1845 von ihrem Entdecker Rudolf Virchow geprägt. Grund für die weißliche Färbung des Blutes ist die unkontrollierte Vermehrung von Leukozyten, die letzten Endes die roten Erythrozyten verdrängen.

Die Klassifikation der Leukämien basiert auf morphologischen und immunologischen Eigenschaften der Leukämiezellen. In den letzten Jahren gewinnen auch zunehmend zytogenetische und molekularbiologische Merkmale an Bedeutung. Je nach beteiligtem Zelltyp unterscheidet man zunächst myeloische und lymphatischen Leukämien. Myeloische Leukämien gehen von den Vorläuferzellen der Granulozyten, im weiteren Sinne auch der Erythrozyten und Thrombozyten aus, lymphatische Leukämien betreffen die Lymphozyten und ihre Vorläuferzellen.

Des Weiteren werden Leukämien nach ihrem Krankheitsverlauf in akute und chronische Leukämien unterteilt. Während akute Leukämien unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tode führen, kann sich der Verlauf einer chronischen Leukämie über viele Jahre hinziehen. So lassen sich Leukämien grob in akute lymphatische (ALL), akute myeloische (AML), chronische lymphatische (CLL) und chronische myeloische (CML) Leukämien klassifizieren.

2.2 Chromosomale Translokationen

Bei der Entstehung von leukämischen Erkrankungen spielen chromosomale Translokationen eine entscheidende Rolle. So sind etwa 65% der akuten Leukämien auf chromosomale Translokationen zurückzuführen (Look, 1997; Tenen, 1997). Zu Beginn einer Translokation findet je ein DNA-Doppelstrangbruch an zwei unterschiedlichen Chromosomen statt. Solche DNA-Doppelstrangbrüche können durch ionisierende Strahlung oder cytotoxische Agenzien erzeugt werden, finden aber auch spontan statt. Anschließend findet eine Reparatur der Brüche statt, bei der die beiden Chromosomenfragmente reziprok an die Ausgangschromosomen wieder angefügt werden. Diese reziproke Rekombination kann in der betroffenen Zelle auf zweierlei Art zu einem malignen Wachstum führen. In seltenen Fällen gelangt dabei ein Protoonkogen, wie z.B. *cMYC* oder *BCL2* in den Einflussbereich eines effektiven *Enhancers*, wodurch unkontrolliertes Wachstum oder eine Apoptoseresistenz ausgelöst wird. Diese Art der Translokation bezeichnet man als Typ-I-Translokation. Bei der häufiger vorkommenden Typ-II-Translokation hingegen entsteht ein

Fusionsgen aus zwei Teilen der von den DNA-Doppelstrangbrüchen betroffenen Gene. Diese Gene werden später entsprechend in Fusionsproteine mit neuen Eigenschaften translatiert, die in besonderen Fällen zu einer Entartung der Zelle führen können (Rabbits, 1994). Ein prominentes Beispiel für eine Typ-II-Translokation ist das Philadelphiachromosom, das durch reziproke Rekombination zwischen Teilen der Chromosomen 9 und 22 zustande kommt (Rowley, 1973; Bartram, 1985; Teyssier, 1985).

2.3 Translokationen des Typs t(4;11)(q21;q23)

Ein weiteres Beispiel für eine Typ-II-Translokation ist die Translokation t(4;11), also zwischen Chromosom 4 und 11, auf den Chromosomenbanden (q21;q23). Diese wurde erstmals 1979 bei der akuten lymphatischen Leukämie eines Kleinkindes beschrieben (Van den Berghe, 1979). Im Jahre 1991 schließlich konnte durch Kartierungsexperimente die Beteiligung des Gens *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) festgestellt werden (Ziemin van der Poel, 1991). Nachdem Sequenzanalysen auffallende Homologien zwischen dem *MLL*-Gen und dem Trithorax-Gen aus *Drosophila melanogaster* aufzeigten, wurde es zunächst *HTRX1* (*human trithorax gene1*) genannt (Djabali, 1992). Nach Veröffentlichung der vollständigen cDNA-Sequenz wurde das *MLL*-Gen auch als *ALL-1* (*acute lymphoblastic leukemia-1*; Gu, 1992), bzw. *HRX* (*human trithorax*; Tkachuk, 1992) bezeichnet.

Der andere Fusionspartner in einer t(4;11)-Translokation, das *AF4* (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*; Gu, 1992) stellt mit etwa 40% den häufigsten Translokationspartner des *MLL*-Gens dar (Dimartino & Cleary, 1999).

Obwohl in der Fachliteratur oft nur auf eines der beiden Translokationsprodukte eingegangen wird, existieren in der Zelle doch stets beide Fusionsprodukte. Diese werden, je nachdem welches Chromosom betroffen ist, entweder als Derivat 4 (der4) oder Derivat 11 (der11) bezeichnet. Die daraus resultierenden Proteine bestehen folglich entweder N-terminal aus *MLL*- und C-terminal aus *AF4*- (*MLL/AF4* bzw. der11), bzw. N-terminal aus *AF4*- und C-terminal aus *MLL*-Sequenzen (*AF4/MLL* bzw. der4; siehe Abb. 2.7).

Während für das *AF4*-Gen kein weiterer Fusionspartner bekannt ist, existieren für das *MLL*-Gen eine Vielzahl anderer Translokationspartner. Ein Großteil der Bruchpunkte im *MLL*-Gen liegt dabei in einem Bereich, der sich über 6 kb zwischen Exon 9 und 12 erstreckt (Reichel, 2001). Dieser Bereich wird als „bcr“ (*breakpoint cluster region*) bezeichnet (Gu, 1992).

Die häufigsten *MLL*-Fusionspartner-Gene sind *AF9*, *ENL*, *AF10*, *AF4*, *AF5* und *ELL*. Diese Gene kodieren für Faktoren des Aktivierungskomplexes der RNA-Polymerase 2 (Bitoun, 2007). Der Mechanismus der Leukämieentstehung durch die Expression der vielen verschiedenen durch Translokation entstandenen Fusionsgene, ist aber trotzdem bislang weitgehend ungeklärt.

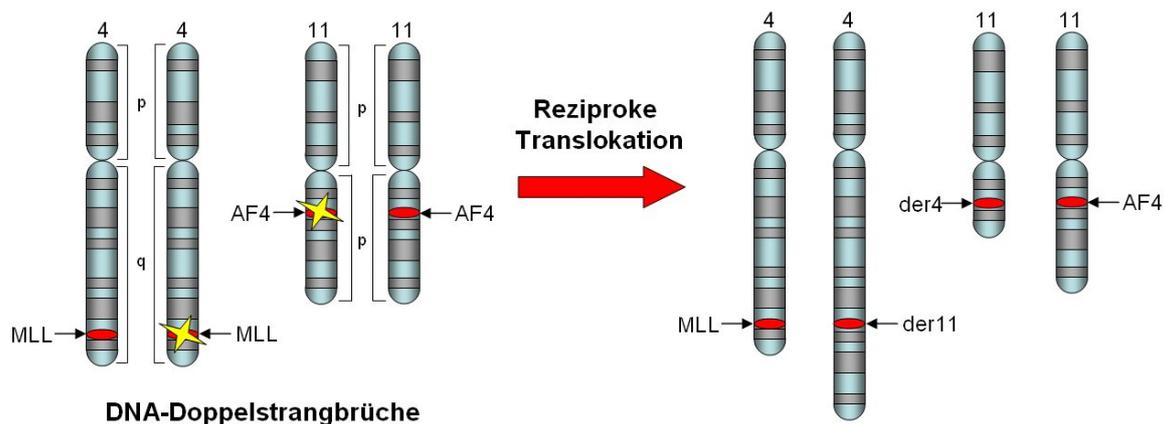


Abb. 2.1 Entstehung einer t(4;11) Translokation

Schematischer Ablauf der Entstehung einer t(4;11) Translokation. Jeweils zwei der beiden homologen Chromosomen 4 bzw. 11 erliegen zeitgleich einem DNA-Doppelstrangbruch innerhalb des Genes *AF4*, auf Chromosom 4 und des Genes *MLL* auf Chromosom 11. Nach Anlaufen der zellulären Reparaturmechanismen werden nun die beiden Chromosomenfragmente reziprok wieder angefügt. Dadurch entstehen an den Fusionsstellen zwei illegitime Rekombinationen zwischen den beiden betroffenen Genen, die beiden Derivate *der4* und *der11*.

2.4 Klinisches Erscheinungsbild einer t(4;11)-Leukämie

Die Bande q23 ist besonders häufig von Translokationen betroffen. Neben der zuvor erwähnten t(4;11) (q21;q23) Translokation kann es noch zu einer Vielzahl anderer Translokationen, wie t(9;11) (q21;23) oder t(11;19) (q23;q13) kommen. Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Ausprägungen von Leukämie (Thirmann, 1993; Mitelman, 1994). Während eine t(4;11) Translokation typisch für eine Erkrankung des lymphatischen Zweiges des blutbildenden Systems ist, finden sich t(9;11) Translokationen überwiegend in myeloischen Zellen. Eine t(11;19) Translokation hingegen ist in beiden Linien anzutreffen. Insgesamt sind pädiatrische Leukämien im Säuglingsalter sehr selten. So besagt eine Studie aus den USA gegen Ende der 90er Jahre, dass bei 1 Million Kleinkindern bis zum Alter von 1 Jahr nur etwa 37 eine Leukämie entwickeln (Gurney, 1997). Von diesen Fällen weisen nur 2,5 bis 5% eine ALL und 6 bis 14% eine AML auf (Felix, 1999). Dabei kann man bei 80% der ALLs und bei 50% der AMLs eine Translokation unter Beteiligung des *MLL*-Gens feststellen (Ross, 1998; Rowley, 1998). Der mit 30 bis 40% größte Teil der t(4;11)-assoziierten Leukämien wurde bei Kleinkindern diagnostiziert, hingegen nur ca. 5% bei älteren Patientengruppen. Diese 5% wiesen jedoch eine Sekundärleukämie als Folge einer Chemotherapie auf (Felix, 1995; Johansson 1998). Klinische Merkmale einer t(4;11)-assoziierten Leukämie sind, neben dem geringen Alter der Patienten, eine Hyperleukozytose ($>5 \times 10^{10}/l$), Hepatosplenomegalie, starke ZNS-Infiltration und ein sehr schlechter Therapieverlauf (Chen, 1993b; Rubnitz, 1996 ; Felix, 1999; Reaman, 1999). Obwohl die Heilungschancen für ALL und AML in jüngster Zeit auf 80 bzw. 40% angestiegen sind,

blieben die Heilungschancen für eine t(4;11)-assoziierte Leukämie unverändert schlecht. Ein entscheidender Faktor für den Verlauf der Therapie scheint dabei das Alter der Patienten zu sein. Besonders bei Patienten mit einem Alter unter 2 und über 40 Jahren besteht nur eine geringe Aussicht auf Heilung, während Kinder zwischen dem 2. und 9. Lebensjahr immerhin mit einer Wahrscheinlichkeit von 75% geheilt werden können (Johansson, 1998).

2.5 Die Wildtypproteine MLL und AF4

Das *MLL*-Gen ist auf der Bande q23 des Chromosoms 11 lokalisiert und erstreckt sich über 92 kb (Nilson, 1996; Rasio 1996; Marschalek, 1997). Sein offener Leserahmen mit 12.015 bp erstreckt sich über 37 Exons und kodiert dabei für 4005 Aminosäuren, was einer Molekülmasse von etwa 435 KDa entspricht (Tkachuk, 1992; Nilson, 1996).

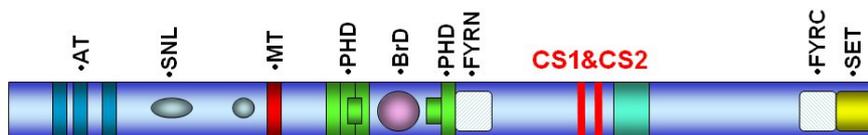


Abb. 2.2 Modularer Aufbau des MLL-Proteins

Das MLL-Protein besitzt drei AT-Haken, eine MT-Domäne für die Bindung nicht methylierter CpG-Inseln und eine SNL zur subnucleären Lokalisation. Die PHD-Finger, die Bromodomäne und die transkriptionaktivierende Domäne TAD vermitteln Protein-Protein Interaktionen. Die SET-Domäne dient zur Methylierung von Histon H3 am Lysinrest 4. Nach Aktivierung durch Taspase1 vermitteln FYR-N, FYR-C und die SET-Domäne die Bildung eines Heterodimers der beiden MLL-Proteinfragmente, das als Gerüst für die Anlagerung weiterer Proteine zum MLL-Multiproteinkomplex dient.

Das MLL-Protein trägt nach der Aminosäure 2.702 und 2.749 zwei hochspezifische Schnittstellen für die Threonin-Aspartase Taspase1 (Hsieh, 2003). Diese Schnittstellen werden als *cleavage site* 1 und 2 (CS1 und CS2) bezeichnet. Durch die katalytische Aktivität der Taspase1 entstehen so drei Proteinfragmente. MLL-N mit 300 KDa, MLL-C mit 180 KDa und das kleine Fragment zwischen den beiden *cleavage sites* mit ca. 7 KDa (Nakamura, 2002 und Hsieh 2003). Die beiden Proteinfragmente MLL-N und MLL-C lagern sich zu einem Heterodimer zusammen und bilden so eine Plattform für die Bildung eines MPSC (Multi-Protein-Super-Complex) aus etwa 30 weiteren Proteinen. Für die Interaktion sind die N-terminale FYRN-Domäne (Aminosäuren 2.007-2.027) und die C-terminale FYRC-Domäne (Aminosäuren 3.692-3.846) notwendig. Beide Interaktionsdomänen sind reich an Aminosäuren mit aromatischen Resten (Nakamura, 2002; Yokoyama 2002; Hsieh 2003). Sequenzanalysen des *MLL*-Gens und des *Trithorax*-Genes (*Trx*) von *Drosophila melanogaster* ergaben eine Homologie von 81% innerhalb des C-Terminus (Gu, 1992; Tkachuk, 1992).

Zu den konservierten Domänen des MLL-Proteins zählen die SET-Domäne (*Suppressor of variegation*, *Enhancer of zeste and Trithorax*), mit H3K4-Methyltransferaseaktivität (Milne, 2005; Nakamura, 2002). Die zwei Zinkfinger stellen keine klassischen DNA-Bindedomänen dar, sondern PHD-Finger (*Plant Homeo Domain*) mit transaktivierender Aktivität. Zwischen den Aminosäuren 202 und 344 befinden sich 3 AT-Haken, die an AT-reiche DNA-Sequenzen in der kleinen Furche der DNA binden können (Zeleznik-Le, 1994, Aravind und Lansman, 1998). Ein cysteinreicher Sequenzabschnitt besitzt Homologien zur DNA-Cytosin-5 Methyltransferase und wird daher als MT-Domäne bezeichnet (siehe Abb. 2.2).

Der wichtigste Translokationspartner für *MLL*, das *AF4*-Gen, lokalisiert auf der Bande q21 des Chromosoms 4 und erstreckt sich über einen Genabschnitt von 300 kb (Nilson, 1997; Werner, Diplomarbeit 1999). Sein offener Leserahmen mit 3.636 bp erstreckt sich über 23 Exons und kodiert dabei für 1.212 Aminosäuren, was einer Molekülmasse von etwa 140 KDa entspricht (Nakamura, 1993). *AF4* ist Mitglied der ALF-Proteinfamilie (*AF4*, *LAF4* und *EMR2*). Es wird ubiquitär exprimiert und ist hauptsächlich am Zellkern lokalisiert (Chen, 1993a; Frestedt, 1996; Nilson, 1997). Neben *MLL* ist auch *AF4* maßgeblich bei der Regulation der Hämatopoese beteiligt (Isnard, 2000). So bleiben von *AF4-knockout*-Mäusen etwa 80% symptomfrei, während die übrigen 20% spätestens 10 Tage nach der Geburt aus bisher ungeklärter Ursache sterben. Untersuchungen an den toten Mäusen ergaben jedoch eine Störung der B- und T-Zell-Entwicklung.

2.6 Aufgaben des Wildtypproteins MLL

Das zu großen Teilen mit *MLL* homologe *Trithorax*-Gen ist bei *Drosophila* maßgeblich an Differenzierungsprozessen, speziell bei der Ausbildung der Segmentierungen beteiligt (Kuzin, 1994). Dabei bindet das Trx-Protein in Vorläuferzellen an transkriptionell aktive Chromosomenbereiche, wodurch eine stabile Vererbung des Expressionsmusters an die Tochterzellen während der Mitose erreicht wird (Paro, 1993; Tschiersch, 1994). Auf diese Weise wird durch die Etablierung eines spezifischen Histon- und DNA-Methylierungsmusters ein sogenanntes „transkriptionelles Gedächtnis“ erzeugt. Das transkriptionelle Gedächtnis hilft dabei, die Gewebespezifität langfristig aufrechtzuerhalten. Trx gehört zu einer ganzen Gruppe von *Trithorax*-Proteinen (TrxG), deren Antagonisten durch die Gruppe der Polycomb-Gruppe (PcG) repräsentiert wird. Während Proteine der TrxG also für die Vererbung der aktiven Chromatinabschnitte verantwortlich sind, sind die Vertreter der PcG für die Vererbung reprimierter Chromatinabschnitte zuständig. Insgesamt führt das Zusammenspiel der Aktivitäten der Trx- und Pc-Proteine zu aktiven und inaktiven Abschnitten auf den Chromosomen.

Der hohe Grad an konservierten Domänen zwischen MLL und Trx legt eine ähnliche Aufgabe für MLL nahe. Ein homozygoter *Mll-knockout* führt bei Mäusen zu einem Verlust der *HOX*-Gen-Expression (Vertreter einer Gruppe von Genen mit einer konservierten Domäne, der sogenannten Hömöobox, die mehrere andere, funktionell zusammenhängende Gene im Verlauf der Morphogenese steuern) und ist bereits am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung lethal. Dabei wird die Expression der *HOX*-Gene zwar regulär gestartet, kann aber aufgrund des fehlenden Mll-Proteins nicht aufrechterhalten werden (Yu, 1998). Heterozygote *Mll-knockout*-Mäuse hingegen überleben, zeigen jedoch eindeutige Wirbel- und Skelettdeformationen (Yu, 1995). Dies ist bemerkenswert, da die Ausbildung der Wirbelsäule ebenfalls einen Segmentierungsprozess darstellt. Neben den zahlreichen Homologien ist die Steuerung der Segmentierung also eine phänotypisch sichtbare Gemeinsamkeit der Aktivitäten von MLL und Trx.

Im Menschen beruht die Steuerung von Differenzierungsprozessen durch MLL auf der Regulation von *HOX*-Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. So bindet MLL an die Promotoren von *HOXA9* und *HOXC8*, wo es einerseits für die Acetylierung von Histon H3 und H4 (Petruk, 2001), sowie die Methylierung von Histon H3 an der Position K4 (Lysin 4) sorgt (Milne, 2002; Nakamura, 2002). Auf diese Weise wirkt MLL aktivierend auf die Expression der entsprechenden *HOX*-Gene. Diese wiederum steuern die Entwicklung durch Regulation anderer Gene. Mutationen in *HOX*-Genen sind daher meist tödlich oder haben gravierende Auswirkungen auf die Entwicklung (Ayton, 2001). Auch die Differenzierung und Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen ist im Wesentlichen abhängig von einer geregelten *HOX*-Gen-Expression (Fidenza, 1996).

Mit Hilfe von *MLL-ΔSET*-Mutanten konnte die Methyltransferaseaktivität der SET-Domäne eindeutig festgestellt werden (Terranova, 2006). Anders als *Taspase^{-/-}*-Mäuse zeigen *ΔSET^{-/-}*-Mäuse äußerlich keine phänotypischen Veränderungen gegenüber Wildtypmäusen. Sie zeigen normales Verhalten, sind lebensfähig und fertil. Untersucht man jedoch deren Skelett, fallen deutliche Deformationen der Wirbelsäule, Rippen und Brustbeine auf. Der Grund für diese Deformationen ist die fehlende Methyltransferaseaktivität der *MLL-ΔSET*-Mutante und die damit verbundene Änderung der *HOX*-Gen-Expression. Es besteht kein Unterschied in der Gesamtmenge an Methylierungen zwischen *ΔSET^{-/-}*-Mäusen und Wildtypmäusen. Vielmehr findet während der Ontogenese in *ΔSET^{-/-}*-Mäusen eine ortsspezifische Veränderung der Methylierungsmuster an Promotorbereichen bestimmter *HOX*-Gene statt. Diese Veränderungen können sowohl zu einer erhöhten als auch reprimierten *HOX*-Gen-Expression führen.

2.7 Die Protease Taspase1

Spezifische, proteolytische Spaltungen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation vieler biologischer Prozesse. Dazu gehören die Aktivierung von Blutgerinnungsfaktoren, die Blutdruckregulation durch Spaltung von Angiotensinogenen, die cholesterinabhängige Freisetzung des *sterol response element-binding protein* (SREBP) aus dem endoplasmatischen Retikulum (Brown, 2000), die ligandenabhängige Spaltung und Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (Brown, 2000), die Reifung des *hedgehog signaling molecule* (Ye, 2000), die Regulation des Zellzyklus durch Freisetzung von HCF-1 (Julien, 2003) und die Aktivierung von Caspase bei Apoptoseprozessen (Thornberry, 1998). Die Identifizierung und Charakterisierung der verantwortlichen Endopeptidasen kann daher nicht nur zum besseren Verständnis biologischer Prozesse beitragen, sondern auch Ansatzpunkte für eine Therapie entsprechender Erkrankungen liefern.

Bei Patienten mit einer t(4;11)-Translokation ist die Protease Taspase1 maßgeblich an der Entstehung der ALL beteiligt (Bursen, 2004). Bislang repräsentiert Taspase1 den einzigen Vertreter der Typ2-Asparaginasefamilie mit proteolytischer Aktivität (Hsieh, 2003). Das *Taspase1*-Gen ist lokalisiert auf der Bande p12.1 des Chromosoms 20 und erstreckt sich über 250 kb. Sein offener Leserahmen mit 1.260 bp erstreckt sich über 14 Exons und kodiert dabei für 420 Aminosäuren, was einer Molekülmasse von etwa 50 KDa entspricht. Eine weitere Besonderheit von Taspase1 ist eine autokatalytische Aktivität. Durch sie wird die Taspase1 zwischen Asparaginsäure 233 und Threonin 234 gespalten, wodurch zwei Proteinfragmente mit 233 und 186 Aminosäuren Länge bzw. einer Molekülmasse von 28 und 22 KDa entstehen. Diese autokatalytische Spaltung ist essentiell für die Entstehung der vollen katalytischen Aktivität der Taspase1, da erst durch diesen Schritt die katalytisch aktive Aminosäure das Threonin 234, innerhalb des aktiven Zentrums freigesetzt wird. Die beiden daraus resultierenden Proteinfragmente bilden ein Heterodimer. Zwei dieser Heterodimere lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden auf diese Weise die katalytisch aktive Taspase1 (Khan, 2005; siehe Abb. 2.3). Um die Wirkungsweise der Taspase1 zu verstehen, wurden verschiedene Mutationen innerhalb des aktiven Zentrums der Taspase1 durchgeführt. Durch die Mutationen der Aminosäuren D233A, D233N, T234A, T234S und T234C wurde zwar die autokatalytische Spaltung der Taspase1 (*in cis*) komplett unterbunden jedoch führten nur die Mutationen T234A und T234V zum vollständigen Verlust der Taspaseaktivität *in trans* (Hsieh, 2003; Khan, 2005). Die übrigen Mutanten zeigten hingegen immer noch eine, wenn auch stark verminderte, proteolytische Aktivität. Die Freisetzung des Threonin 234 als Nukleophil scheint folglich entscheidend für die volle Entfaltung der Taspase1-Aktivität zu sein. Inhibierungsversuche der Taspase1 mit Hilfe handelsüblicher Proteaseinhibitoren und verschiedener Lösungsmittel blieben bisher

erfolglos. Nur eine Hitzeinaktivierung bei 70°C, für 30 Minuten (Hsieh, 2003) bzw. eine Chloridionenkonzentration von 500 mM (Khan, 2005) führt zum Verlust jeglicher Taspase1-Aktivität. Außerdem konnte durch Mutationen am MLL-Protein (DG2.702AA) an CS1 und (DGV2.754AAA) an CS2 eine proteolytische Spaltung von CS1 und CS2 verhindert werden (Hsieh, 2003). Dies zeigt, dass den hoch konservierten Domänen CS1 und CS2 eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Spaltung durch Taspase1 zukommt.

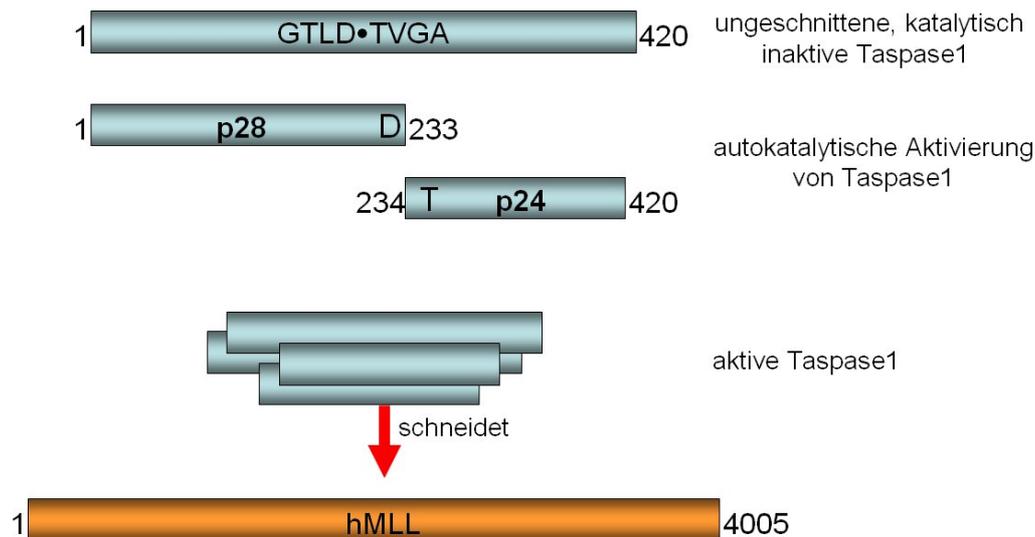


Abb. 2.3 Autokatalytische Aktivierung von Taspase1

Das Rohprotein Taspase1 mit 420 Aminosäuren ist im Hinblick auf sein Substrat inaktiv. Erst durch eine autokatalytische Aktivierung, bei der sich die Taspase1 selbst zwischen Aminosäure 233 und 234 schneidet, wird das eigentlich katalytisch aktive Threonin an der Position 234 freigesetzt. Die dadurch entstehenden Fragmente lagern sich dann zu einem Heterodimer zusammen (Hsieh, 2003). Schließlich lagern sich zwei Heterodimere zu einem Tetramer zusammen, die die eigentliche, aktive Taspase1 bilden (Khan, 2005).

2.8 Strukturelle Besonderheiten der Taspase1

Die Strukturen des Taspase1-Proenzym und der katalytisch aktiven Taspase1 sind nahezu identisch. Bei der autokatalytischen Aktivierung finden nur geringe, aber entscheidende strukturelle Veränderungen, besonders im Bereich des katalytischen Zentrums statt.

Sequenzanalysen ergaben eine 27%ige Übereinstimmung zwischen der humanen Taspase1 und der humanen, lysosomalen Aspartylglucosaminidase, einem weiteren Vertreter der Typ2-Asparaginasefamilie. Taspase1 ist der einzige Vertreter dieser Familie, der proteolytische Aktivität *in trans*, also gegen ein Substrat entwickelt. Strukturell sind alle Typ2-Asparaginase sehr ähnlich. Wie alle Typ2-Asparaginase, weist auch die Taspase1 eine vierschichtige $\alpha\beta\alpha$ Struktur auf. Dabei werden zwei zentrale, antiparallele β -Faltblätter, an den beiden gegenüberliegenden Seiten von zwei α -Helices eingefasst. Strukturell jedoch fällt die Taspase1 hinsichtlich ihres katalytischen Zentrums etwas aus dem Rahmen. Dieses

zeigt Homologien zum aktiven Zentrum von Proteasomen die ebenfalls ein katalytisches Threonin tragen (Lowe, 1995; Wlodawer, 1995).

Die Röntgenkristall-Strukturanalyse von Taspase1 ergab, dass im aktiven Zentrum ein Chlorid-Ion mit drei Aminosäuren komplexiert vorliegt. Die Komplexierung wird dabei zum einen durch die Peptidbindungen des Glycin 49 und Asparagin 100 bewerkstelligt und zum anderen durch die Seitenkette des katalytisch aktiven Threonin 234, das dadurch seine katalytische Eigenschaft nicht entfalten kann (Khan 2005).

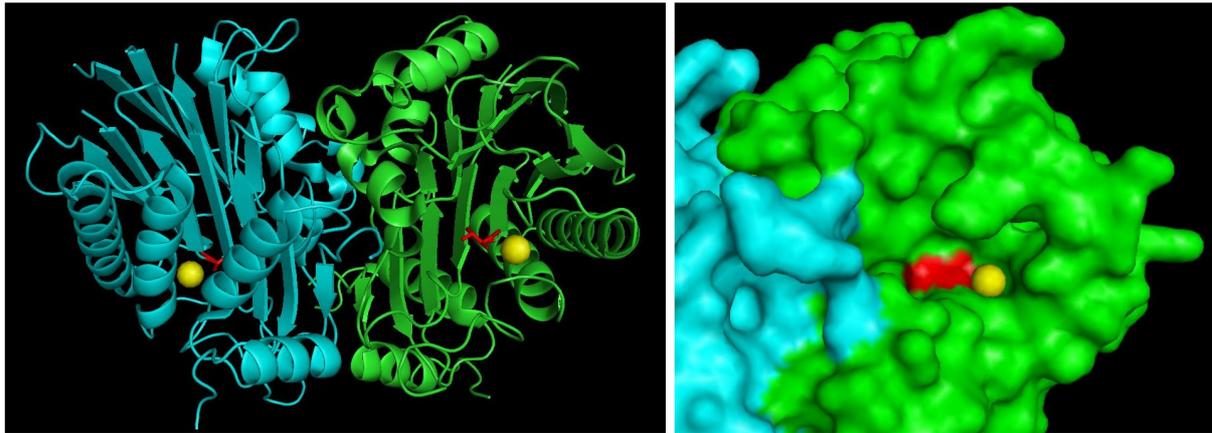


Abb. 2.4 Kristallstruktur der Taspase1

Kristallstruktur der Taspase1, bestehend aus den beiden Heterodimeren in Blau bzw. Grün. Die katalytisch aktiven Threonine in den beiden aktiven Zentren sind in Rot dargestellt, die komplexierten Chloridionen in Gelb (links). Oberflächenmodell eines der beiden aktiven Zentren der Taspase1 (rechts).

Taspase1-Aktivitätsmessungen ergaben für Chlorid-Ionen einen IC_{50} -Wert von 26 mM, was der physiologischen Chloridkonzentration entspricht. Unter physiologischen Bedingungen, liegt die Taspase1 also teilweise inhibiert vor (Faundez, Hartzell, 2004).

2.9 Rolle der Taspase1 bei der Aktivierung von MLL

Das wichtigste Substrat der Taspase1 ist das MLL-Protein. Dieses besitzt zwei Schnittstellen, nämlich hinter Aspartat 2.702 und Aspartat 2.754. Die Schnittstellen befinden sich in den jeweils hoch konservierten Bereichen *cleavage site 1* (CS1) bzw. *cleavage site 2* (CS2) (Hsieh, 2003).

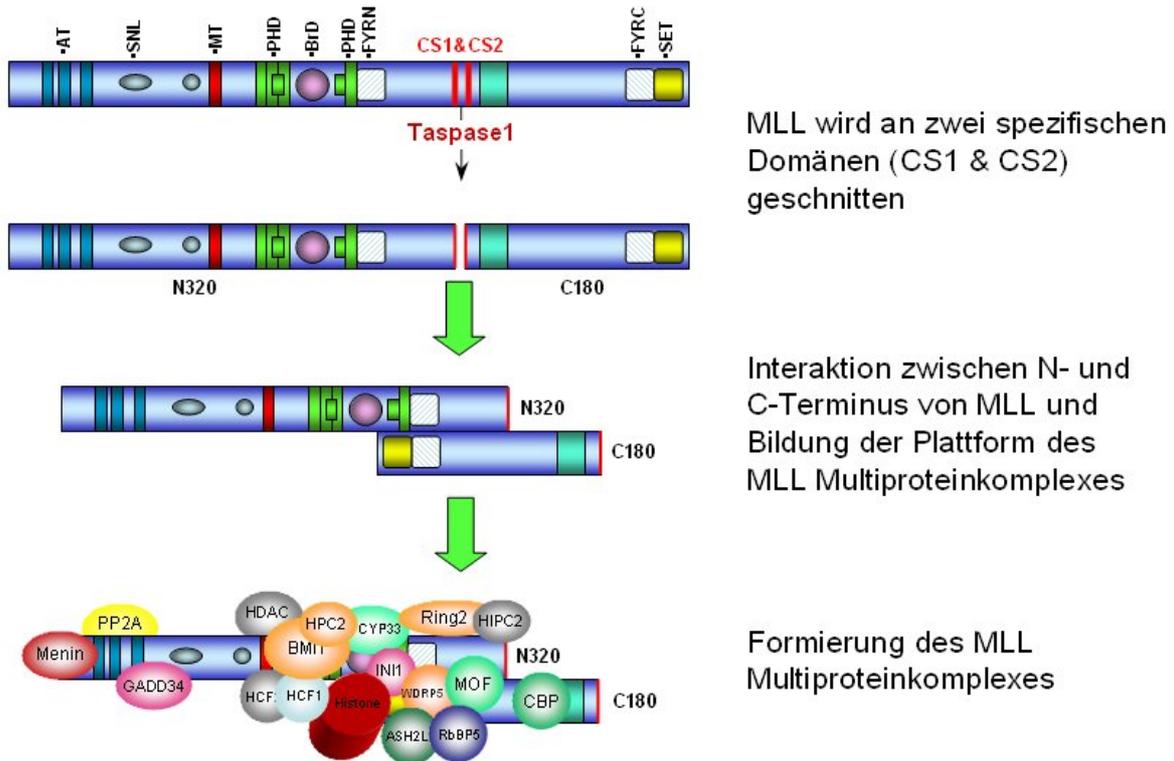


Abb. 2.6 Entstehung des MLL-Multiproteinkomplexes

Das MLL-Protein wird an zwei hochspezifischen Schnittstellen (CS1 und CS2) proteolytisch gespalten. Dabei entstehen im Wesentlichen die Proteinfragmente N320 und C180, die sich anschließend über die beiden Interaktionsdomänen FYRN und FYRC zu einem Heterodimer zusammenlagern (Nakamura, 2002; Yokoyama 2002; Hsieh 2003). Dies ist entscheidend für die Stabilität von N320 und dessen Lokalisation im Zellkern (Hsieh, 2003). Außerdem wird dadurch eine Plattform für die Bildung eine MLL-Multiproteinkomplexes geschaffen, der aus über 30 weiteren Faktoren aufgebaut ist (Nakamura, 2002). Der MLL-Multiproteinkomplex bindet an Histone im Promotorbereich von z.B. *HOX*-Genen und wirkt dort durch H3K4-Trimethylierung aktivierend auf deren Expression.

In *Taspase1-knockout*-Experimenten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der *Taspase1*-Aktivität und endogener *HOX*-Gen-Expression gezeigt werden (Takeda, 2006). Homozygote *Taspase1*^{-/-}-Mäuse zeigten grundlegende Deformationen im Bereich der Wirbel und der Rippen, also eine eindeutige Störung von Segmentierungsvorgängen. Diese Deformationen sind nahezu identisch mit den Skelettdeformationen der *Mll-ΔSET*^{-/-}-Mäuse. Dies zeigt, dass die Prozessierung von Mll einen ganz entscheidenden Faktor für die Entfaltung der Methyltransferaseaktivität des Mll-Protein darstellt. Als weiteres phänotypisches Merkmal wiesen die Versuchstiere eine deutlich verminderte Körpergröße auf. Cytologische Untersuchungen ergaben, dass diese *Taspase1*^{-/-}-Mäuse eine deutlich verringerte Expression von Cyclin A, B und E aufweisen (Takeda, 2006). Diese Cycline wirken nach Assemblierung mit cyclinabhängigen Kinasen aktivierend auf Transkriptionsfaktoren, die für die Kontrolle der Zellproliferation verantwortlich sind. Zusätzlich findet eine Überexpression der Kinaseinhibitoren p16^{Ink4a}, p21 und p27 statt.

Beide Vorgänge zusammen bewirken dann einen deutlich verlangsamten Zellzyklus und die signifikant geringere Körpergröße (Takeda, 2006).

Die Ursache für die gestörte Expression der Cycline und Kinaseinhibitoren liegt in der fehlenden Prozessierung von MLL durch Taspase1 und einer damit verbundenen Verminderung der H3K4-Trimethylierungsaktivität innerhalb der Taspase^{-/-}-Zellen. Damit stellt die Taspase1 den ersten Fall einer Protease dar, die durch ihre spezifische Aktivität ganz entscheidend in genregulatorische Prozesse eingreift (Takeda, 2006).

Ein weiteres Substrat der Taspase1 stellt der allgemeine Transkriptionsfaktor TF2A dar. TF2A besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ , wobei die beiden Untereinheiten α und β nach proteolytischer Spaltung durch Taspase1 entstehen. Die für Taspase1 typische Erkennungssequenz QXDGXXD (X steht für jede beliebige Aminosäure), sitzt im Bereich zwischen Aminosäure 271 und 279. Genauso wie bei MLL wird nach Aspartat an Position 3 innerhalb der Erkennungssequenz gespalten (Zhou, 2006). Die Aufgabe von TF2A liegt in der transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene, die eine Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen spielen (Kobayashi, 1995; Lieberman, 1994). So führt ein *knockdown* von TF2A bei *Xenopus laevis* zu diversen phänotypischen Defekten. In der Zelle liegt stets ein gewisser, wenn auch geringer Anteil nicht prozessierten TF2As vor. Nicht nur prozessiertes, sondern auch ungeschnittenes TF2A besitzt transkriptionsaktivierendes Potential. Dieses reicht jedoch aus, das für das Überleben der Zelle notwendige Grundlevel an Expression aufrechtzuerhalten. Man geht daher davon aus, dass die katalytische Aktivierung von TF2A durch Taspase1 u.a. an der Feinregulierung der Genexpression beteiligt ist. Des Weiteren wird durch die Spaltung durch Taspase1 die Voraussetzung für einen späteren proteasomalen Abbau von TF2A gelegt, was eine weitere Möglichkeit der Regulation darstellt (Hoiby, 2004).

2.10 Taspase1 ist maßgeblich an der Ausbildung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie beteiligt.

Mit Hilfe von Transfektionsexperimenten konnte das onkogene Potential des AF4•MLL-Proteins eindeutig festgestellt werden (Bursen, 2004; Gaussmann, 2007). Eine wichtige Rolle bei der Transformation der Zelle spielt dabei die starke Akkumulation der AF4•MLL-Fusionsproteine in den betroffenen Zellen.

Genau wie das Wildtyp-MLL-Protein besitzt auch das AF4•MLL-Fusionsprotein die beiden spezifischen Schnittstellen für Taspase1. Im nicht prozessierten Zustand, also vor proteolytischer Spaltung durch Taspase1, werden AF4•MLL-Fusionsproteine innerhalb kurzer Zeit nach Anlagerung der E3-Ligasen SIAH1 bzw. SIAH2 ubiquitinyliert und anschließend proteasomal abgebaut. Nach Taspase1-Spaltung entstehen im Wesentlichen

die beiden Proteinfragmente der4•N (p178) und MLL•C (p134), die ebenfalls über die beiden Interaktionsdomänen FYRN und FYRC heterodimerisieren. Dadurch ist die Voraussetzung für die Bildung eines der4•N/MLL•C-Komplexes gegeben. Dieser ist gegenüber der SIAH1-vermittelten Degradation durch das Proteasom stabil, akkumuliert innerhalb der Zelle und kann auf diese Weise sein onkogenes Potential entfalten (Bursen, 2004).

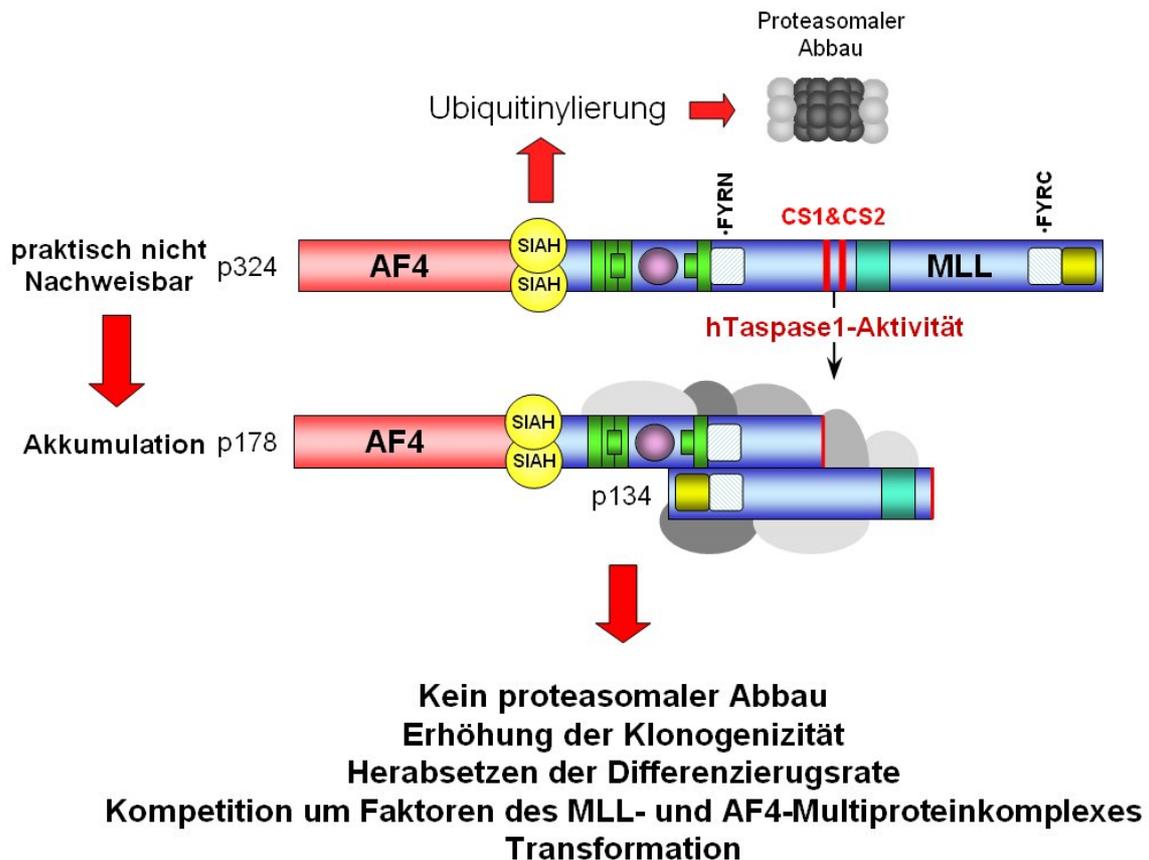


Abb. 2.7 Pathomolekulares Modell zur Entstehung einer t(4;11)-assozierten Leukämie

Das noch nicht von Taspase1 prozessierte der4 wird durch SIAH1-vermittelte Ubiquitinylierung proteasomal abgebaut und ist deshalb in der Zelle praktisch nicht nachweisbar. Erst nach proteolytischer Spaltung durch Taspase1 kommt es nach Bildung des der4•N/MLL•C-Komplexes zu einer Stabilisierung und Akkumulation von der4. Auf diese Weise kann der4 sein onkogenes Potential entfalten und zur Transformation der betroffenen Zelle führen (Bursen, 2004).

Der genaue Ablauf der Wachstumstransformation ist bisher noch unklar. Der Komplex zeigt jedoch verschiedene Eigenschaften, die vermuten lassen, dass eine globale H3K4-Trimethylierung zu einer Dedifferenzierung der betroffenen Zelle führt. Des Weiteren kann man davon ausgehen, dass durch die starke Akkumulation eine Konkurrenz um die Komponenten des MLL- und AF4-Multiproteinkomplexes stattfindet, was einem funktionellen *knockout* des endogenen MLL und AF4 entspräche. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aktivität der Taspase1 bzw. des daraus resultierenden AF4•MLL-Fusionsproteins, zelluläre Prozesse massiv beeinflussen kann (Bursen, 2004).

2.11 Zielsetzung der Arbeit

Der Taspase1 kommt bei der Entstehung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie die Rolle eines molekularen Auslösers zu. Die Taspaseaktivität ist zwingende Voraussetzung für eine Stabilisierung des AF4•MLL-Fusionsproteins und damit zur Entfaltung eines onkogenen Potentials. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch eine Inhibierung der Taspase1 die Transformation der Zelle nach einer t(4;11)-Translokation unterbunden werden könnte.

Des Weiteren wird Taspase1 in vielen Krebszelllinien überexprimiert. Möglicherweise kommt auch dort der Taspase1 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Eigenschaften zu. Die Inhibierung von Taspase1 könnte daher sogar einen allgemeinen Ansatzpunkt für eine Krebstherapie darstellen.

Die Zielsetzung der Arbeit war deshalb die Etablierung eines Testsystems mit dessen Hilfe die Aktivität der Taspase1 sichtbar gemacht werden kann. Dieses Testsystem wurde anschließend dazu verwendet, eine Reihe potentieller Taspaseinhibitoren unter unterschiedlichen Bedingungen auf ihre Wirksamkeit hin zu testen.

Um Hinweise auf die Funktionsweise der Taspase1 zu erlangen, wurden verschiedene Mutanten der Taspase1 und deren Substrat hergestellt, um anschließend deren Funktionalität im Testsystem zu untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Inhibierung von Taspase1

Um Taspase1 inhibieren zu können, wurde zunächst ein Taspase1-Aktivitätsassay etabliert, mit dessen Hilfe die Taspase1-Aktivität und später auch eine Inhibierung der Taspase1 sichtbar gemacht werden sollte.

3.1.1 Etablierung eines Aktivitätsassays für Taspase1

Für die Etablierung des Taspase1-Aktivitätsassays wurden zunächst Taspase1 und ihr artifizielles Substrat 2CL, als 6xHis-Tag-Fusionsproteine rekombinant hergestellt.

Für die Klonierung von Taspase1 wurde ihr offener Leserahmen in einer PCR unter Verwendung der Primer Taspase-NdeI*3 und Taspase-XhoI*5 und cDNA aus SEM-Zellen amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Nde I und Xho I in den Expressionsvektor pET22b⁺ kloniert. Die Expression fand im Expressionsstamm BL21*DE3 statt.

Für die Klonierung von 2CL wurde sein offener Leserahmen in einer PCR unter Verwendung der Primer 2CL-EcoRI*3 neu und 2CL-XhoI*5 mit pUHD3-4-MLL als *Template* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen EcoR I und Xho I in den Expressionsvektor pGEX5T kloniert. Die Expression fand im Expressionsstamm W3110 statt.

Das artifizielle Substrat 2CL ist ein 6xHis-GST-Fusionsprotein mit einer Länge von 405 Aminosäuren bzw. einem Molekulargewicht von 50 KDa. Es beinhaltet ein 158 Aminosäuren langes MLL-Fragment (Aminosäuren 2.650-2.808), das die beiden Taspase1-Erkennungssequenzen DGVDD (CS1) und DGADD (CS2) enthält. 2CL wurde verwendet, da das gesamte MLL-Protein für die vorgesehenen Versuche ungeeignet war.

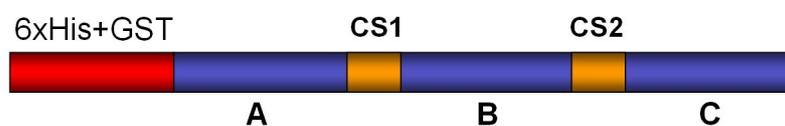


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Substrates 2CL

Das 2CL-Molekül ist ein Fusionsprotein aus 6xHis-GST (in Rot) und einem 158 Aminosäuren langen Fragment von MLL (in Blau). Seine Gesamtlänge beträgt 405 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 50 KDa entspricht. 2CL wird von den beiden *cleavage sites* (CS1 und CS2) in die drei Abschnitte A, B und C unterteilt.

Sowohl Taspase1 als auch 2CL wurden anschließend über native Nickelchelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Kontrolle wurden die Aufreinigungsschritte per SDS-PAGE analysiert.

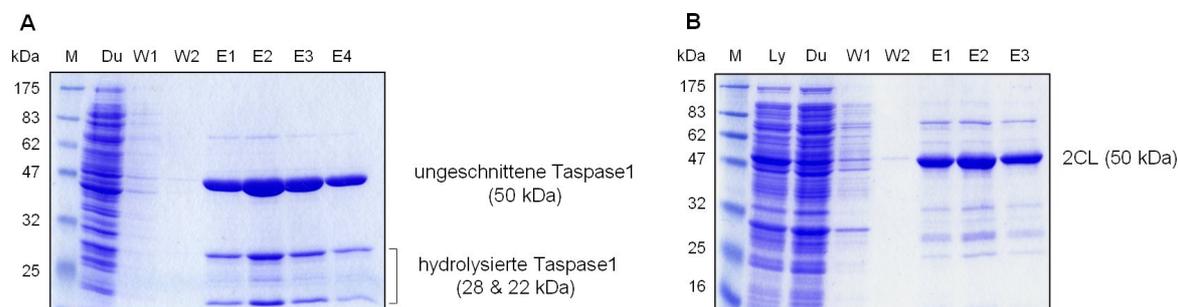


Abb. 3.2 Test der nativen Aufreinigungen von Taspase1 und 2CL im SDS-PAGE

- A Test der Taspase1-Aufreinigung mit Hilfe eines 12%igen SDS-PAGE. Aufgetragen wurden ein Längenstandard (M), der Durchlauf (Du), die beiden Waschfraktionen (W1 und W2) und die 4 Elutionsschritte (E1 bis E4). Die Elutionsfraktionen beinhalten die drei für Taspase1 typischen Banden mit 50 KDa, für die noch nicht autokatalytisch aktivierte Taspase1 und die beiden Schnittprodukte mit 22 und 28 KDa, die aus der autokatalytischen Spaltung resultieren.
- B Test der 2CL-Aufreinigung mit Hilfe eines 12%igen SDS-PAGE. Aufgetragen wurden ein Längenstandard (M), das Lysat (Ly), der Durchlauf (Du), die beiden Waschfraktionen (W1 und W2) und die 3 Elutionsschritte (E1 bis E3). Die Elutionsfraktionen beinhalten das 2CL mit 50 KDa.

Durch photometrische Messungen konnte sowohl für die aufgereinigte Taspase1 als auch für 2CL eine Konzentration von ca. 50 μM ermittelt werden, was bei einem Elutionsvolumen von 400 bis 500 μl etwa einer Menge von 1 μg entspricht.

Um die Taspaseaktivität zu ermitteln, wurden die aufgereinigte Taspase1 und 2CL im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzt und anschließend im SDS-PAGE analysiert. Da jede Taspase1-Aufreinigung geringfügig unterschiedliche Ausbeuten ergab, wurde Taspase1 im Aktivitätsassay in unterschiedlichen Konzentrationen (unverdünnt bis zu einer Verdünnung von 1:64) eingesetzt. Die Konzentration der Taspase1 im Assay betrug dabei 2,5 μM (unverdünnt) bis 0,78 μM (1:64 verdünnt). 2CL wurde stets mit einer Konzentration von 5 μM eingesetzt.

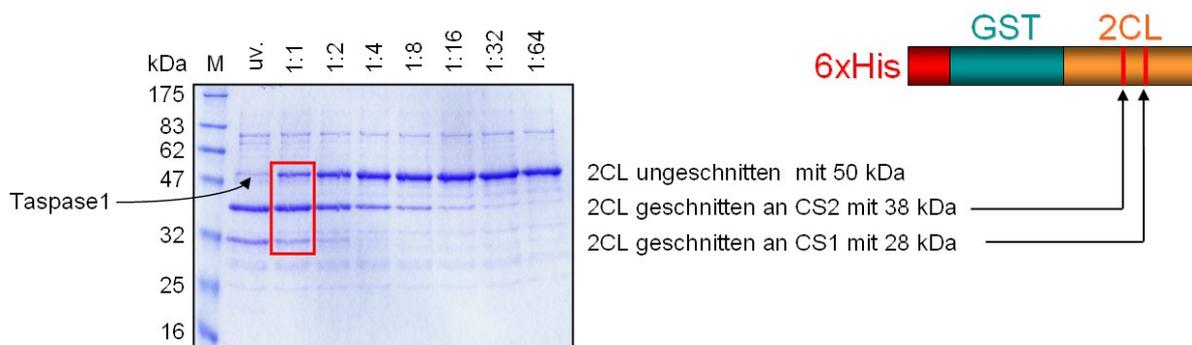


Abb. 3.3 Taspase-Aktivitätsassay

Um die Aktivität einer gereinigten Taspase1 zu ermitteln, wurde sie in verschiedenen Konzentrationen im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzt und die Schnittprodukte mit einem 12%igen SDS-PAGE analysiert. Aufgetragen wurden ein Längenstandard (M) und die Schnittprodukte nach Einsatz einer Taspase1 in verschiedenen Konzentrationen, von unverdünnt (uv.) bis zu einem Verdünnungsfaktor von 1:64. Typisch für dieses Assay sind drei Banden mit 50 KDa, 38 KDa und 28 KDa (roter Kasten). Die Bande mit 50 KDa entspricht dem ungeschnittenen 2CL, die Bande mit 38 KDa dem Schnittprodukt nach Schneiden an CS2 und die 28 KDa-Bande dem Schnittprodukt nach Schneiden an CS1. Auf der rechten Seite ist 2CL mit den Positionen der beiden Schnittstellen dargestellt.

Wie man an der Intensität der Schnittprodukte in Abb. 3.3 erkennen kann, wurde 2CL von Taspase1 mit höherer Affinität an CS2 als an CS1 geschnitten. Die Banden der Taspase1 sind nicht zu sehen, da sie in zu geringen Mengen eingesetzt wurde.

Insgesamt zeigte die Taspase1 eine relativ geringe katalytische Aktivität. Unter Standardbedingungen des Taspase1-Aktivitätsassays war das eingesetzte Substrat erst nach ca. 50 Minuten vollständig umgesetzt (Abb. 3.4).

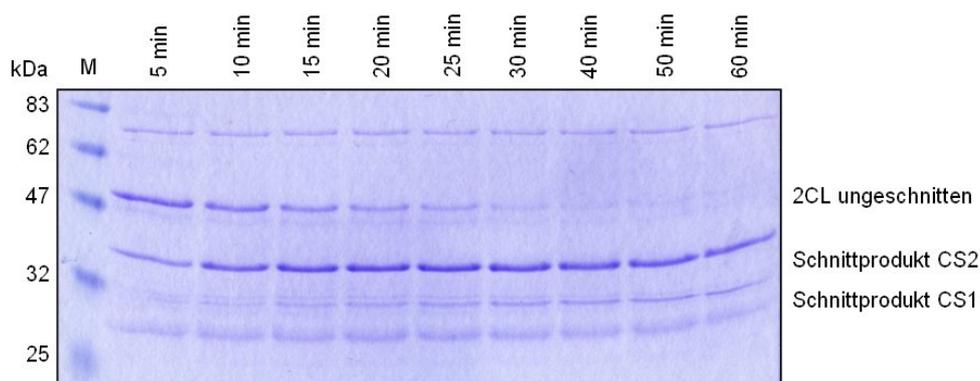


Abb. 3.4 Taspase1-Zeitkinetik

Taspase1 Aktivitätsassay, bei dem die Inkubationszeiten abweichend von den Standardbedingungen zwischen 5 Minuten und 60 Minuten variiert wurden. Aufgetragen wurden die Schnittprodukte nach verschiedenen Inkubationszeiten zwischen 5 Minuten und 60 Minuten.

Betrachtet man die Abnahme des ungeschnittenen Substrates 2CL in der Taspase1-Zeitkinetik (Abb. 3.4) fällt auf, dass erst nach ca. 60 Minuten kein ungeschnittenes Substrat

mehr übrig war. Bedenkt man, dass unter gegebene Testbedingungen Taspase1 und 2CL im Verhältnis 1:2 vorlagen, ergibt dies nur vier katalytische Spaltungsereignisse pro Enzym und Stunde. Mit Hilfe des Taspase1-Aktivitätsassays konnte die Aktivität der Taspase1 sichtbar gemacht werden. Damit war die Voraussetzung für die Etablierung eines Taspase1-Inhibierungsassays gegeben. Durch Zugabe potentieller Taspase1-Inhibitoren sollte deren Wirkung im Taspase1-Aktivitätsassay untersucht werden.

3.1.2 Suche nach Taspase1-Inhibitoren

Das Taspase1-Aktivitätsassay wurde verwendet, um verschiedene Substanzen auf ihre inhibierende Wirkung bezüglich Taspase1 zu testen. Dazu wurde die Taspase1 zunächst für eine halbe Stunde bei 37°C zusammen mit dem potentiellen Inhibitor vorinkubiert. Dadurch war gewährleistet, dass der potentielle Inhibitor, ohne Konkurrenz mit dem Substrat an die Taspase1 binden kann um das Enzym zu inhibieren. Die Inhibition kann dabei entweder allosterisch sein oder aber durch direkte Bindung innerhalb des aktiven Zentrums der Taspase1 erzeugt werden. Nach der Vorinkubation wurde schließlich das Substrat 2CL zugegeben und erneut für 30 Minuten inkubiert. Die Wirkung der potentiellen Inhibitoren sollte dann im SDS-PAGE und anhand der Intensität der Schnittproduktbanden ermittelt werden.

Da Taspase1 eine Protease ist, wurden zunächst handelsübliche Proteaseinhibitoren wie MG132, Gliotoxin und Epoxomicin mit einer Konzentration von 10 µM und 100 µM im Taspase1-Inhibierungsassay eingesetzt. Außerdem wurden die Lösungsmittel DMSO, in einer Konzentration von 10 und 20 Vol.% und Aceton, Acetaldehyd und Chloroform jeweils in einer Konzentration von 10 und 100 µM getestet. DMSO mit 10 und 20 Vol.%, wurde auf seine inhibierende Wirkung hin untersucht, da alle weiteren potentiellen Taspase1-Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen.

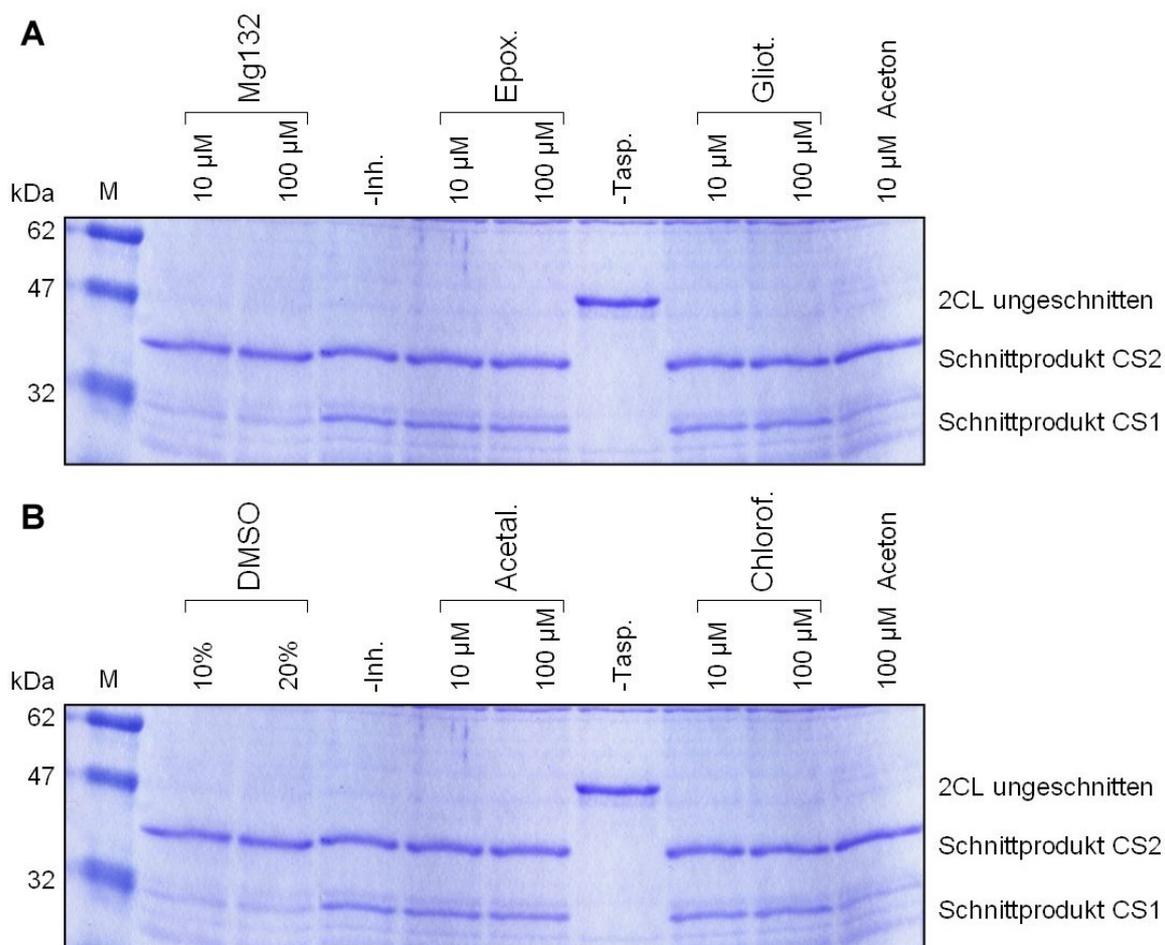


Abb. 3.5 Inhibierung von Taspase1 mit Proteaseinhibitoren und Lösungsmitteln

Ergebnis der Taspase1-Inhibierungsversuche mit den Proteaseinhibitoren MG132, Gliotoxin und Epoxomicin und den Lösungsmitteln Aceton, Acetaldehyd und Chloroform, jeweils in einer Konzentration von 10 μ M und 100 μ M. Das Lösungsmittel DMSO wurde in einer Konzentration von 10 und 20 Vol.% eingesetzt. Als Kontrolle dienten Versuchsansätze ohne Inhibitor bzw. ohne Taspase1.

Vergleicht man die Taspase1-Aktivitäten in den Ansätzen mit 10 μ M und 100 μ M MG132, Epoxomicin und Gliotoxin mit der in der Kontrolle ohne Inhibitor (Abb. 3.5 A) fällt auf, dass mit allen drei Proteaseinhibitoren eine geringe Taspase1-Inhibierung erzielt werden konnte. Durch 10 μ M Aceton konnte eine schwache inhibierende Wirkung erzielt werden.

Die Taspase1-Aktivitäten in den Ansätzen mit 10 μ M und 100 μ M Acetaldehyd und Chloroform entsprachen der Aktivität in der Kontrolle ohne Inhibitor (Abb. 3.5 B). Nur durch Einsatz von 10% oder Vol.20% DMSO bzw. 100 μ M Aceton konnte eine geringe Inhibierung von Taspase1 erreicht werden. Um die inhibierende Wirkung von DMSO genauer zu untersuchen, wurde eine DMSO-Verdünnungsreihe im Taspase1-Inhibierungsassay eingesetzt.

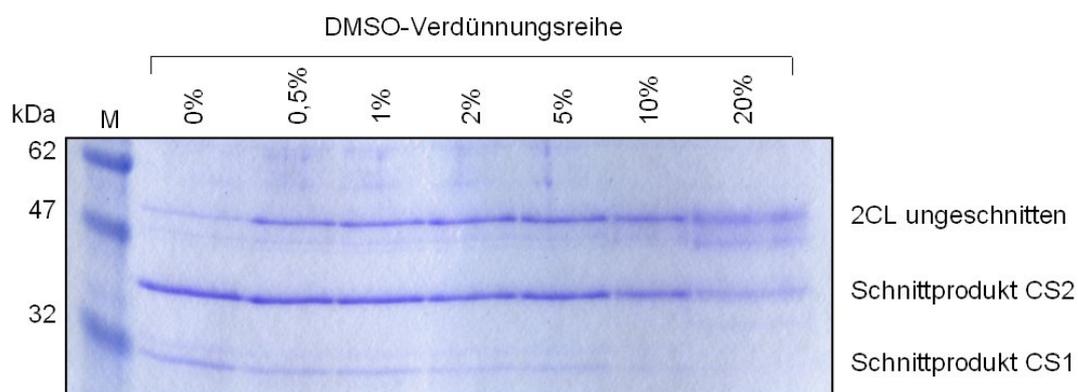


Abb. 3.6 Konzentrationsabhängige Taspase1-Inhibierung durch DMSO

Konzentrationsabhängige Wirkung von DMSO auf die Taspase1-Aktivität. Eingesetzt wurde DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen von 0% bis 20 Vol.%.

DMSO besaß eine geringe inhibierende Wirkung auf Taspase1. Erst ab einer Konzentration von 20 Vol.% wurde ein nahezu vollständiger Verlust des Schnittproduktes CS1 erreicht. Im Taspase1-Inhibierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden stets 2 µl des in DMSO gelösten potentiellen Inhibitors zugegeben. Die im Inhibierungsassay eingesetzte DMSO-Menge entspricht also einer Konzentration von 10 Vol.% und war somit nicht kritisch.

3.1.3 Das Homologiemodell der Taspase1

Die bisherigen Inhibierungsversuche waren ausnahmslos unspezifisch. Da aber ganz gezielt die Taspase1-Aktivität blockiert werden sollte, musste eine Möglichkeit gefunden werden, Taspase1-spezifische Inhibitoren zu identifizieren. Eine Möglichkeit bestand darin, speziell das aktive Zentrum der Taspase1 durch passende Moleküle zu blockieren. Um solche Substanzen zu finden, wurde *in silico* ein dreidimensionales Homologiemodell der Taspase1 in Zusammenarbeit mit Steffen Renner aus dem Arbeitskreis von Prof. Gisbert Schneider im Institut für Chemieinformatik der Universität Frankfurt am Main entwickelt. (Anmerkung: die Kristallstruktur der Taspase1 wurde erst Ende 2005 publiziert, siehe Abb. 3.9)

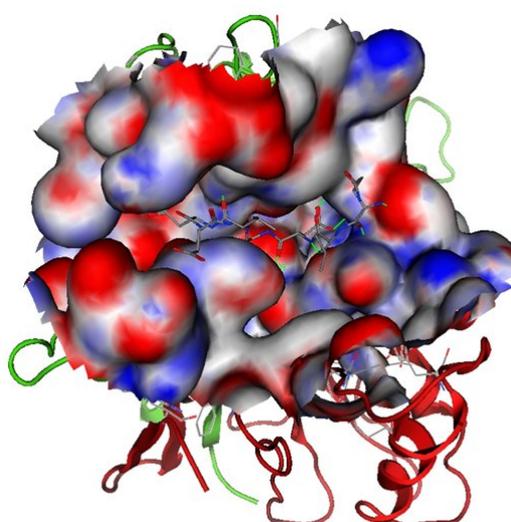


Abb. 3.7 Homologiemodell der Taspase1

Dreidimensionale Darstellung der Taspase1, basierend auf Homologiedaten. Dargestellt ist das katalytische Zentrum, in das die Erkennungssequenz CS2 (DGVDD) modelliert wurde.

Die Suche nach Taspase1-Inhibitoren wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Gisbert Schneider im Institut für Chemieinformatik der Universität Frankfurt am Main durchgeführt. Das in Abb. 3.7 dargestellte Homologiemodell der Taspase1 wurde zunächst dazu verwendet, die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren im aktiven Zentrum der Taspase1 zu ermitteln. Anschließend wurde ein Pharmakophorscreening durchgeführt, bei dem Datenbanken nach Substanzen durchsucht wurden, deren Größe und chemische Eigenschaften eine selektive Bindung innerhalb des aktiven Zentrums der Taspase1 erlauben. Auf diese Weise wurden insgesamt 86 Substanzen (Abb. 5.1, Abb. 5.2 und Abb. 5.3) vorgeschlagen, die potentiell an zwei unterschiedlichen Stellen innerhalb des aktiven Zentrums andocken könnten. Diese sollten

dann durch sterische Hinderung das Anlagern des eigentlichen Substraten MLL bzw. 2CL verhindern und somit die hydrolytische Aktivität von Taspase1 herabsetzen oder inhibieren.

3.1.3.1 Test der potentiellen Taspase1-Inhibitoren, die anhand des Taspase1-Homologiemodells ermittelt wurden

Aufgrund des Homologiemodells und dem *in silico* durchgeführten Pharmakophorscreening wurden potentielle Taspase1-Inhibitoren vorgeschlagen. Diese Substanzen wurden erworben und als 10 mM Stocklösungen in DMSO angesetzt. Diese Stocklösungen wurden entsprechend verdünnt im Taspase1-Inhibierungsassay eingesetzt. Alle 86 potentiellen Inhibitoren wurden so auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten überprüft.

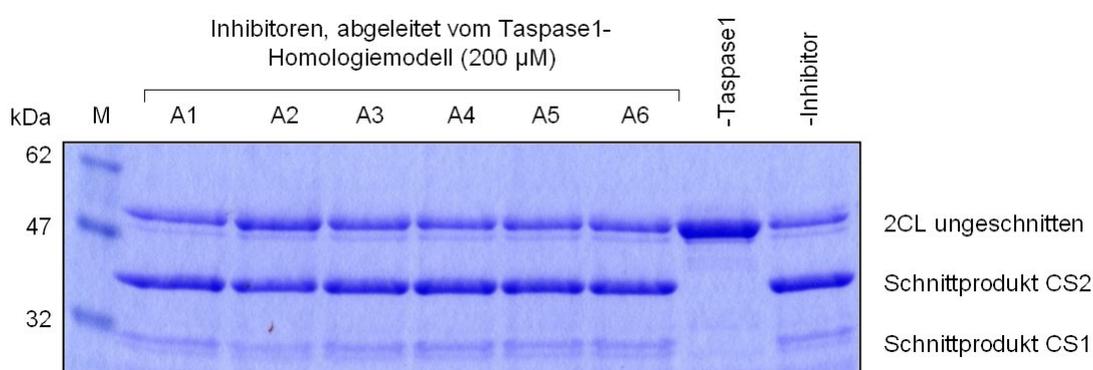


Abb. 3.8 Taspase1-Inhibierungsassay mit Inhibitoren, die vom Homologiemodell abgeleitet wurden (Beispiel)

Taspase1-Inhibierungsassay, in dem die vom Homologiemodell abgeleiteten Inhibitoren eingesetzt wurden. Die Konzentration der Inhibitoren im Assay war 200 μM. Exemplarisch sind hier die Ansätze mit den Inhibitoren A1 bis A6 dargestellt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Taspase1 und ohne Inhibitor verwendet.

Das in Abb. 3.8 dargestellte Inhibierungsassay ist exemplarisch für alle eingesetzten potentiellen Taspase1-Inhibitoren, die vom Homologiemodell abgeleitet wurden. Keine der eingesetzten Substanzen zeigte im Inhibierungsassay eine hemmende Wirkung auf die hydrolytische Aktivität von Taspase1 (Vergleich der Intensität der Schnittproduktbanden der Ansätze mit und ohne Inhibitor).

Grund für das Misslingen dieser Inhibierungsversuche war möglicherweise ein fehlerhaftes Homologiemodell. Die wenig später veröffentlichte Kristallstruktur (Khan, 2005) zeigte einen völlig anderen Aufbau der Taspase1, insbesondere ihrer katalytischen Zentren.

3.1.4 Die Kristallstruktur von Taspase1

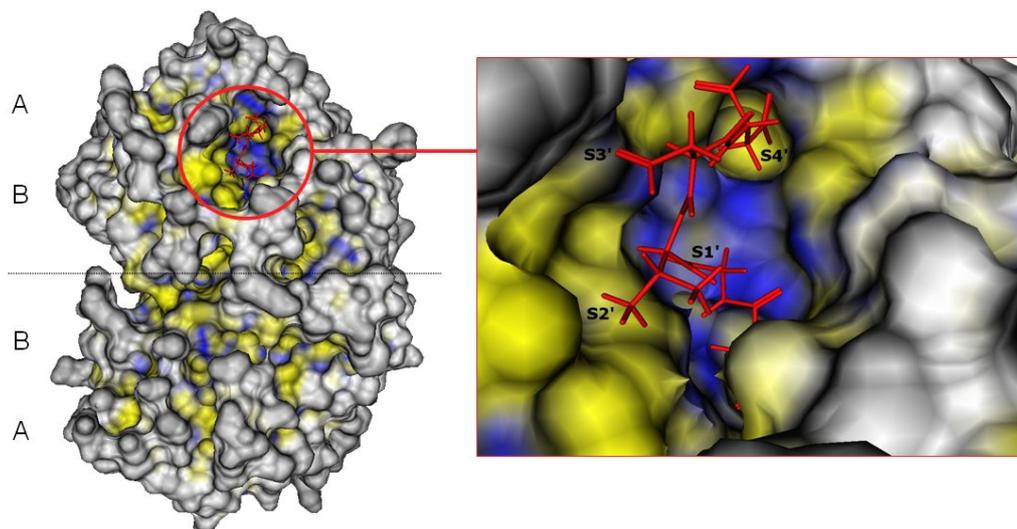


Abb. 3.9 Kristallstruktur der Taspase1

Dreidimensionale Darstellung der Taspase1, basierend auf den Daten der publizierten Kristallstrukturanalyse (Khan, 2005). Auf der linken Seite ist das vollständige Taspase1-Tetramer mit seiner ABBA-Struktur zu sehen. Eines der beiden aktiven Zentren der Taspase1 ist rot umrandet und auf der rechten Seite vergrößert dargestellt. Das zweite aktive Zentrum befindet sich auf der Rückseite des unteren Heterodimeres um etwa 108° um die y-Achse verdreht. Hydrophobe Bereiche des Moleküls sind in Gelb dargestellt, hydrophile Bereiche in Blau und neutrale Bereiche in grau. In das aktive Zentrum der Taspase1 wurde die Erkennungssequenz CS2 (DGVDD) modelliert.

Eine Besonderheit der Taspase1 stellt die Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren im aktiven Zentrum dar (Abb. 3.9). Nach außen wird das aktive Zentrum von einem Ring hydrophober Aminosäuren (gelb) flankiert, während sich im weiter innen gelegenen Bereich ein tiefes, mit Wasser gefülltes Loch, ausgekleidet mit hydrophilen Aminosäuren (blau), befindet. Üblicherweise besitzen katalytische Zentren eine genau umgekehrte Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren mit Ausnahme des Botulinumtoxins (Prof. Dr. Gisbert Schneider, persönliche Mitteilung).

Das Pharmakophorscreening wurde an der Kristallstruktur wiederholt, woraufhin insgesamt 50 Substanzen (Abb. 5.4 und Abb. 5.5) identifiziert wurden, die an zwei unterschiedlichen Stellen innerhalb des aktiven Zentrums andocken können.

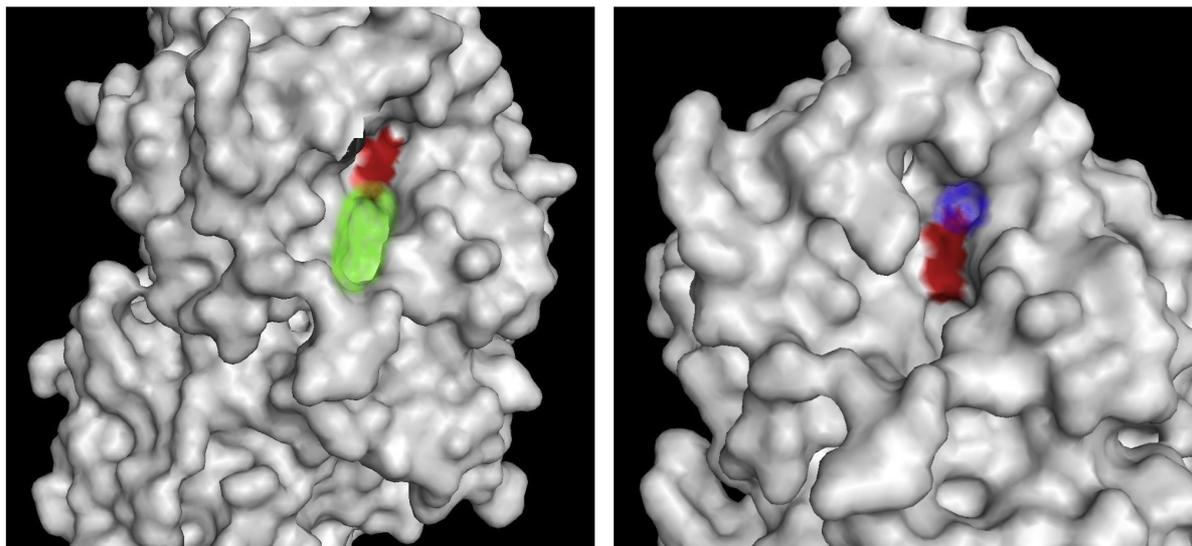


Abb. 3.10 Angriffspunkt der Inhibitoren innerhalb des aktiven Zentrums der Taspase1

Dreidimensionale Struktur der Taspase1 mit jeweils einem der beiden aktiven Zentren. Das katalytisch aktive Threonin 234 ist rot markiert und die Bereiche, in denen die potentiellen Taspase1-Inhibitoren andocken können, sind in Grün oder Blau hervorgehoben. Der grün markierte Bereich wurde mit *deep hole* bezeichnet und der blaue Bereich mit *chloride hole*

Die Ansatzpunkte für die Inhibitoren innerhalb des aktiven Zentrums wurden mehr oder weniger willkürlich ausgewählt. Die Bezeichnung *deep hole* bezieht sich auf die tiefe, hydrophile Grube mit dem darin befindlichen Wasser (siehe Abb. 3.9) und die Bezeichnung *chloride hole* auf den Bereich, in dem das Chloridion gebunden ist.

3.1.4.1 Test der potentiellen Taspase1-Inhibitoren im Taspase1-Inhibierungsassay

Auch die nach Pharmakophorscreening der Kristallstruktur geeignet erscheinenden Substanzen wurden ebenfalls käuflich erworben, als 10 mM Stocklösungen in DMSO angesetzt und entsprechend verdünnt im Taspase1-Inhibierungsassay eingesetzt.

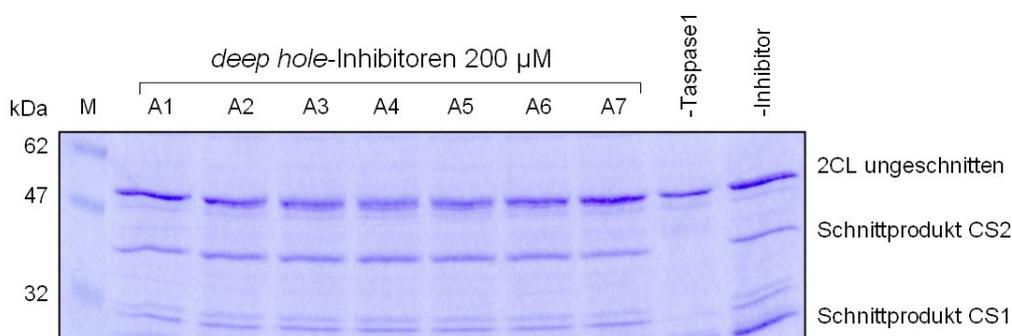


Abb. 3.11 Taspase1-Inhibierungsassay mit *deep hole*-Inhibitoren (Beispiel)

Taspase1-Inhibierungsassay, in dem *deep hole*-Inhibitoren in einer Konzentration von 200 μ M eingesetzt wurden. Exemplarisch sind hier die Ansätze mit den Inhibitoren A1 bis A7 dargestellt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Taspase1 und ohne Inhibitor verwendet.

Vergleicht man die Intensität der Schnittproduktbanden der Ansätze mit und ohne Inhibitor, stellt man fest, dass auch hier wieder keine der eingesetzten Substanzen eine inhibierende Wirkung auf die Taspase1-Aktivität hatte (Abb. 3.11).

Das in Abb. 3.11 dargestellte Inhibierungsassay ist exemplarisch für alle eingesetzten potentiellen Taspase1-Inhibitoren (*deep hole* und *chloride hole*-Inhibitoren). Keine der getesteten Substanzen zeigte im Inhibierungsassay eine hemmende Wirkung auf Taspase1. Ein Grund dafür, dass keine der eingesetzten Substanzen auch nur annähernd in der Lage war, die Taspase1-Aktivität zu vermindern, könnte in diesen Fällen das im aktiven Zentrum gebundene Chloridion sein. Dieses Chloridion bildet einen stabilen Komplex mit den Peptidbindungen des Glycins 49 und Asparagins 100 und des katalytisch aktiven Threonins 234 (Khan 2005).

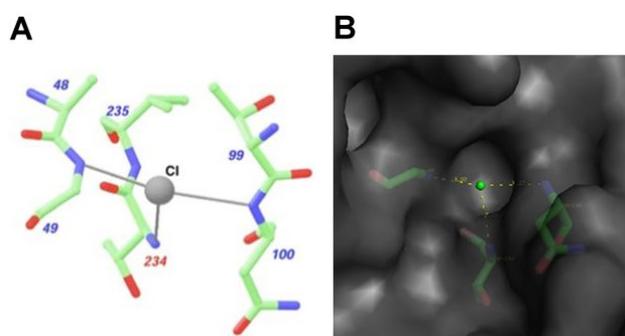


Abb. 3.12 Komplexiertes Chloridion im katalytischen Zentrum der Taspase1

Lage des Chloridions im katalytischen Zentrum der Taspase1. Auf der linken Seite sind die an der Komplexierung beteiligten Aminosäuren Glycin 49, Asparagin 100 und Threonin 234 als Strukturmodelle dargestellt. Auf der rechten Seite ist das *chloride hole* mit dem darin gebundenen Chloridion abgebildet (Khan, 2005).

Solange das Chloridion sich an dieser Position befindet, ist die Taspase1 katalytisch inaktiv. Das Chloridion wird durch das natürliche Substrat der Taspase1, (Erkennungssequenz QVDGADD bzw. QLDGVDD) aus seiner Position verdrängt. Dadurch kann Threonin 234 eine Rotationsbewegung um ca. 180° durchführen und gelangt in eine Position, in der die OH-Gruppe der Seitenkette einen nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung zwischen Aspartat und Glycin des Substrates durchführen kann. Unter physiologischen Bedingungen (ca. 50 mM NaCl) ist Taspase1 deshalb nahezu vollständig inhibiert und kann nur durch sein Substrat spezifisch aktiviert werden.

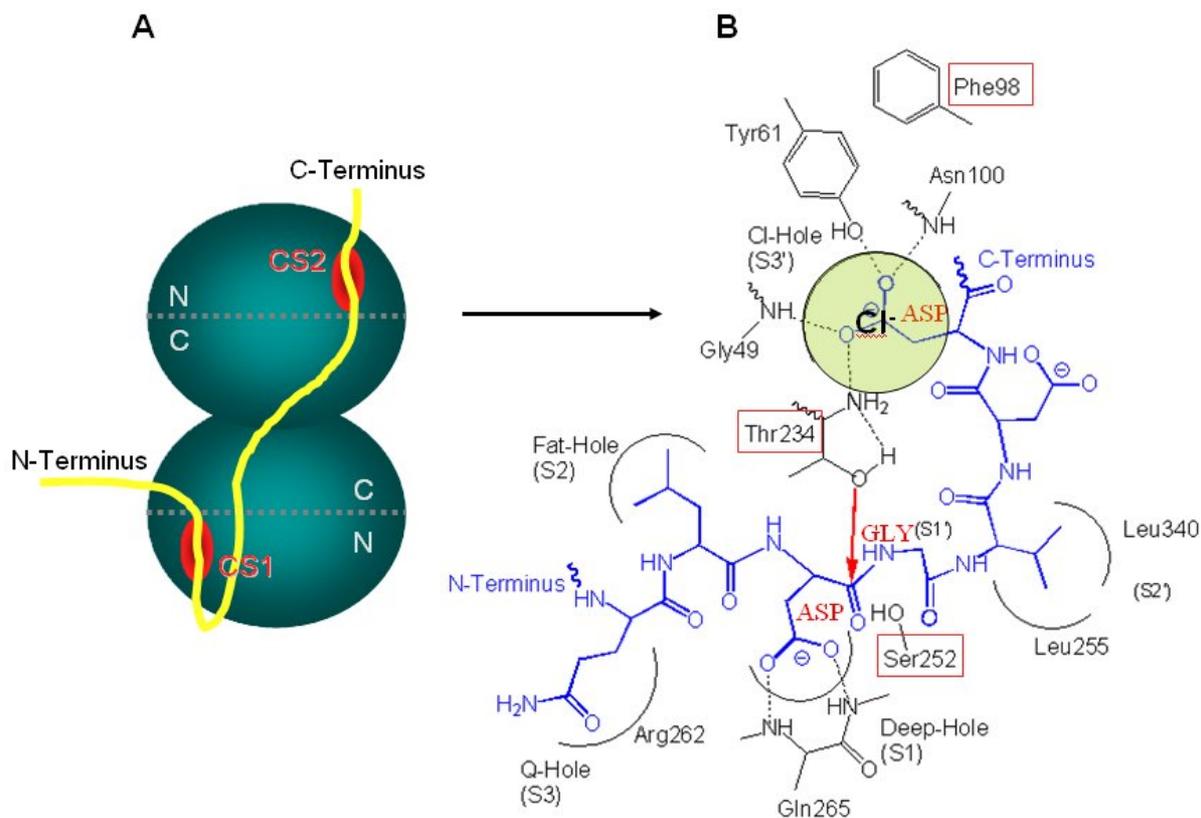


Abb. 3.13 Positionierung des Substrates MLL im katalytischen Zentrum von Taspase1

- A Schematische Darstellung der Taspase1 als Tetramer (blau), mit einem möglichen Verlauf des Aminosäurerückgrates des Substrates MLL bzw. 2CL. Die beiden aktiven Zentren der Taspase1 sind mit Rot hervorgehoben. Aufgrund der antiparallelen Stellung der beiden Taspase1-Moleküle muss das Substrat ausgehend vom katalytischen Zentrum 1 in einer Schleife in das katalytische Zentrum 2 eingeführt werden.
- B Lage der CS2-Erkennungssequenz im aktiven Zentrum der Taspase1. Dargestellt ist die Strukturformel der CS2-Erkennungssequenz DGVDVDD in Blau und einige für die Bindung des Substrates wichtigen Aminosäuren des aktiven Zentrums in Schwarz. Das im *chloride hole* komplexierte Chloridion ist in Grün dargestellt.

Da die Substrate MLL und 2CL von Taspase1 geschnitten werden, müssen die Substrate in der Lage sein, das Chloridion aus dem aktiven Zentrum zu entfernen.

Auf Grund der räumlichen Anordnung lag die Vermutung nahe, dass dem Aspartat an Position sieben der beiden Erkennungssequenzen QVDGADD (CS1) bzw. QLDGVDD (CS2) eine entscheidende Rolle bei der Verdrängung des Chloridions zukommt. Dieses Aspartat könnte mit seiner negativen Ladung die Position des Chloridions einnehmen und dieses damit aus dem aktiven Zentrum verdrängen.

3.2 Substratmutagenese und ihre Wirkung auf Taspase1

3.2.1 Mutagenese von 2CL

Um die Rolle des Aspartates an Position Sieben der Erkennungssequenz QVDGADD (CS1) bzw. QLDGVDD (CS2) zu untersuchen, wurden verschiedene 2CL-Mutanten durch *in vitro*-Mutagenese hergestellt. In allen Fällen wurde Aspartat durch zwei andere Aminosäuren ersetzt. Glycin sollte als Aminosäure zu klein sein, um das Chloridion zu verdrängen, während Lysin aufgrund seines basischen Charakters an Position Sieben das Chloridion sogar fester binden sollte.

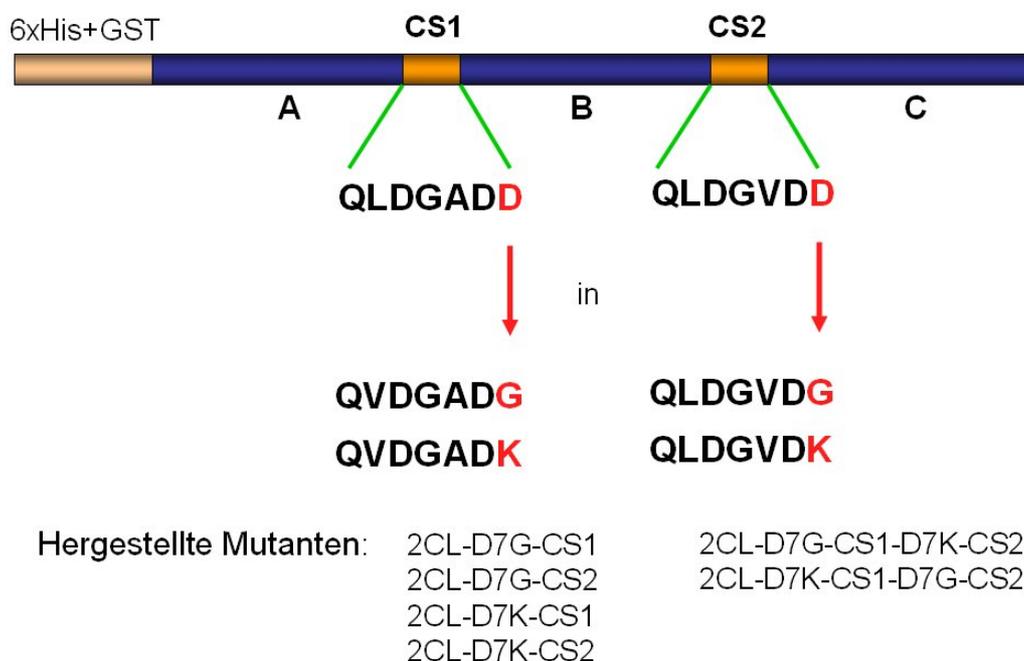


Abb. 3.14 Hergestellte 2CL-Mutanten

Schematische Darstellung von 2CL mit der Position der beiden Taspase1-Erkennungssequenzen CS1 (QVDGADD) und CS2 (QLDGVDD). Das Aspartat an Position Sieben beider Taspase1-Erkennungssequenzen wurde gegen Glycin bzw. Lysin ausgetauscht. Dadurch wurden die Einzelmutanten 2CL-D7G-CS1; 2CL-D7G-CS2; 2CL-D7K-CS1; 2CL-D7K-CS2 und die Doppelmutanten 2CL-D7G-CS1-D7K-CS2 und 2CL-D7K-CS1-D7G-CS2 hergestellt.

Die in Abb. 3.14 dargestellten 2CL-Mutanten (2CL-D7G-CS1; 2CL-D7G-CS2; 2CL-D7K-CS1; 2CL-D7K-CS2; 2CL-D7G-CS1-D7K-CS2 und 2CL-D7K-CS1-D7G-CS2) wurden als Substrate im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzt.

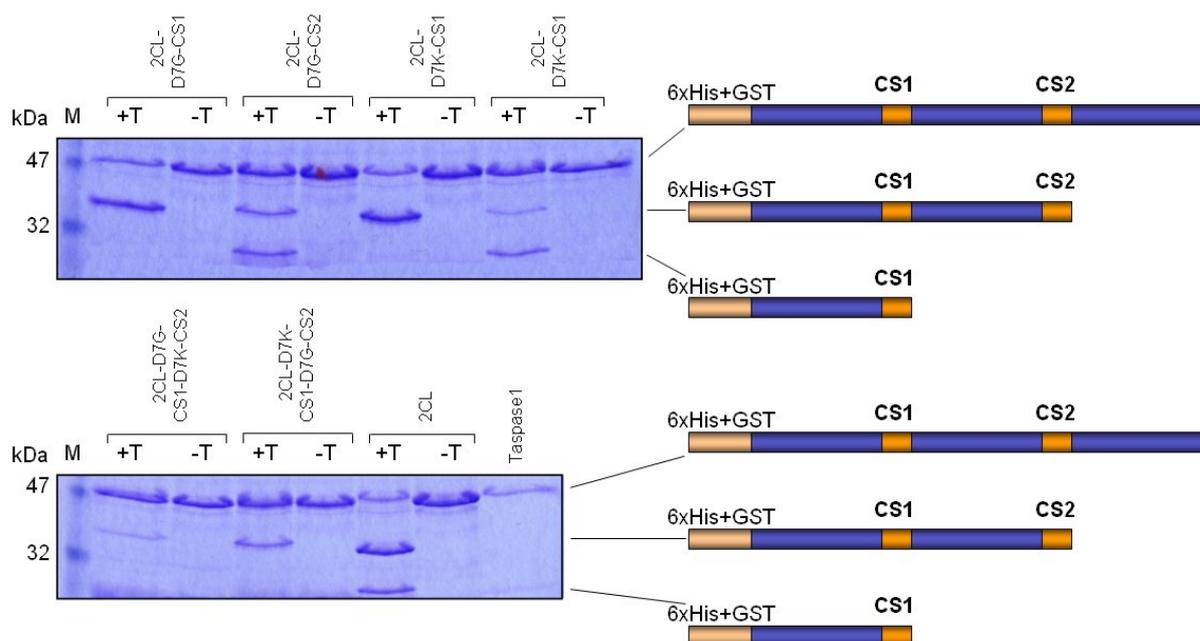


Abb. 3.15 Einsatz der 2CL-Mutanten, als Substrate im Taspase1-Aktivitätsassay

Die 2CL-Mutanten wurden als Substrate im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzt. Als Kontrollen dienen jeweils Ansätze ohne Taspase1, Ansätze mit unmutiertem 2CL und Taspase1 ohne Substrat. Auf der rechten Seite sind die Substratbanden schematisch dargestellt.

Vergleicht man die Intensität der Schnittproduktbanden von unmutiertem 2CL und den Mutanten untereinander, fällt auf, dass alle Mutanten schlechter von Taspase1 geschnitten wurden als das unmutierte 2CL. Die Einzelmutanten 2CL-D7G-CS1 und 2CL-D7K-CS1 wurden ausschließlich an CS2 geschnitten. An CS2 war die volle katalytische Aktivität erhalten. Auch die Doppelmutanten 2CL-D7G-CS1-D7K-CS2 und 2CL-D7K-CS1-D7G-CS2 wurden ausschließlich an CS2 geschnitten, jedoch wurde an CS2, im Vergleich zum unmutierten 2CL weniger gut geschnitten. Die Einzelmutanten 2CL-D7G-CS2 und 2CL-D7K-CS2 weisen im Vergleich zum unmutierten 2CL eine verminderte hydrolytische Spaltung an CS2 auf, nicht aber an CS1.

Durch Austauschen von Aspartat Sieben gegen Glycin oder Lysin an CS1 konnte also eine hydrolytische Spaltung durch Taspase1 unterbunden werden, während dieselben Mutationen an CS2 nur zu einer Verminderung der hydrolytischen Spaltung führten.

Die Ergebnisse in Abb. 3.15 lassen vermuten, dass Peptide, die die Erkennungssequenzen CS1 oder CS2 und die entsprechenden Mutationen enthalten, als Inhibitoren eingesetzt werden könnten. Möglicherweise sind diese Peptide in der Lage, an beide katalytische Zentren der Taspase1 zu binden und diese selektiv zu blockieren. Da sie nicht mehr oder nur sehr schlecht hydrolysiert werden, stellen sie kompetitive Hemmstoffe dar.

Entsprechende Peptide wurden von Dr. Peter Henklein der Charité Berlin im Institut für Biochemie bezogen und trugen die Bezeichnung MWG6 und MWG7 (siehe Abb. 3.16). Sie wurden anschließend im Taspase1-Aktivitätsassay getestet.

3.2.2 Einsatz der mutierten 2CL-Teilfragmente MWG6 und MWG7 im Taspase1 Inhibierungsassay

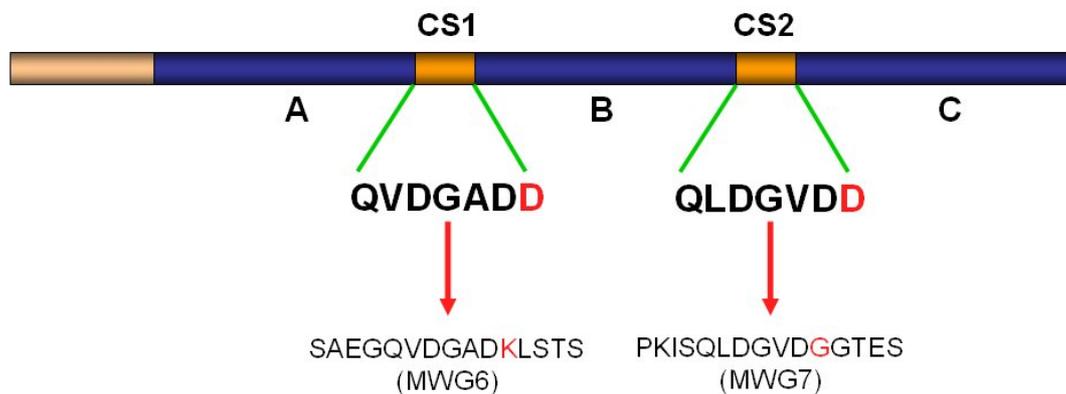


Abb. 3.16 Sequenz der beiden Peptide MWG6 und MWG7

Die beiden Peptide MWG6 und MWG7 wurden in Konzentrationen von bis zu 200 μM im Taspase1-Inhibierungsassay eingesetzt.

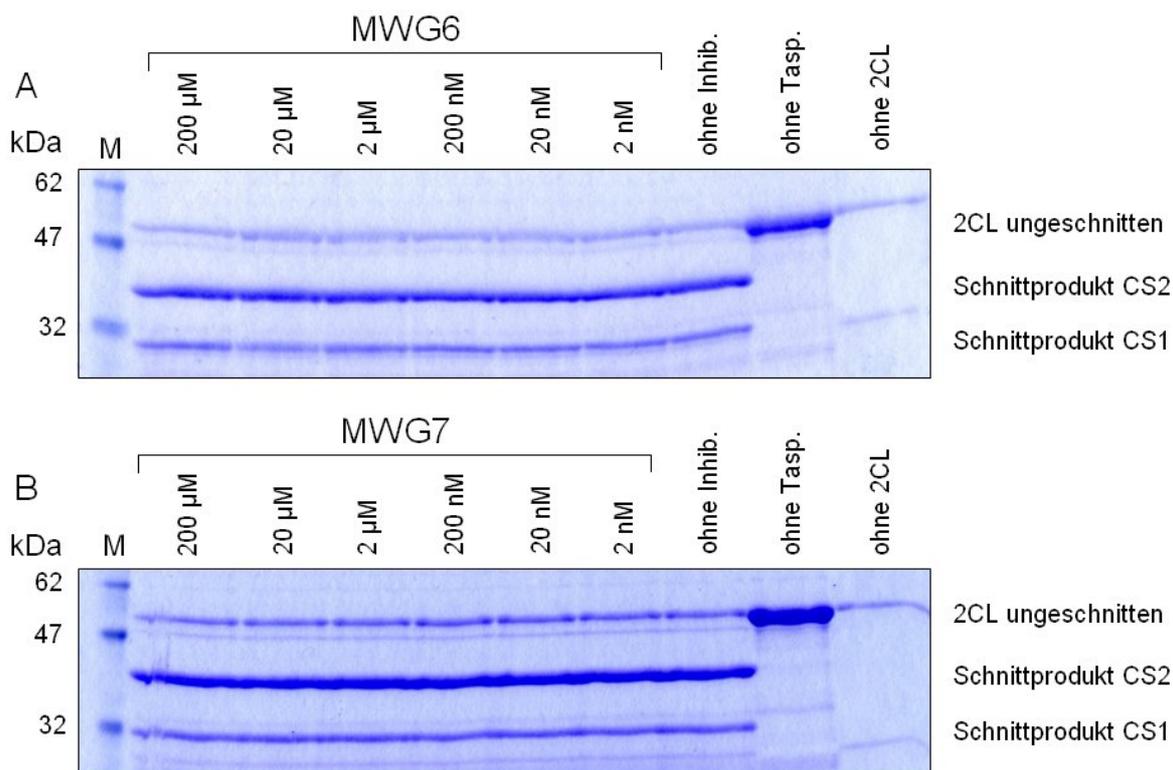


Abb. 3.17 Taspase1-Inhibierungsassay mit den Peptiden MWG6 und MWG7 als Inhibitoren.

Die Peptide MWG6 (A) und MWG7 (B) wurden als Verdünnungsreihe zwischen 200 μM und 2 nM Endkonzentration im Assay eingesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Inhibitor, ohne Taspase1 bzw. ohne 2CL.

Vergleicht man die Intensität der Schnittproduktbanden in Abb. 3.17 A und B mit der Negativkontrolle ohne Inhibitor, so stellt man fest, dass durch Zugabe von MWG6 und MWG7 bis zu einer Konzentration von 200 μM keine Inhibierung der Taspase1 stattfand. Dies wird wahrscheinlich durch denselben Umstand verursacht wie bei den vorangegangenen Inhibierungsversuchen. Da die Peptide MWG6 und MWG7 an Position Sieben keine negativ geladene Aminosäure mehr tragen, wird das Chloridion nicht mehr aus dem katalytischen Zentrum der Taspase1 verdrängt, was zur Folge hat, dass diese Peptide möglicherweise schlechter im katalytischen Zentrum binden können.

Um dennoch eine Aktivierung des katalytischen Zentrums zu erreichen, wurden MWG6 und MWG7 gemeinsam als Inhibitor unter zusätzlicher Verwendung des Detergens Triton-X100, als potentiellen allosterischen Aktivator für das katalytische Zentrum der Taspase1 eingesetzt.

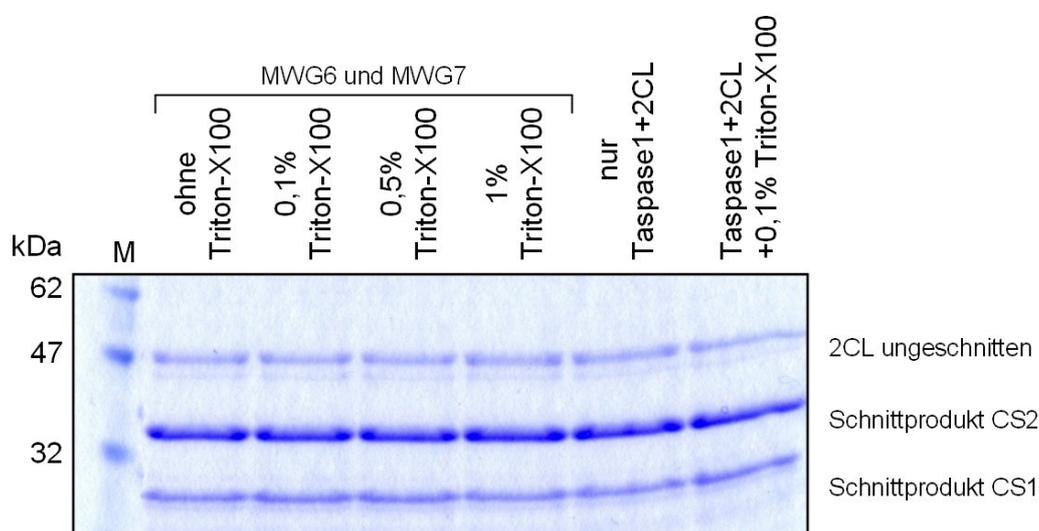


Abb. 3.18 Taspase1-Inhibierungsassay mit MWG6 und MWG7 unter Zusatz von Triton-X100

Die Peptide MWG6 und MWG7 (je 200 μM) wurden als Inhibitoren, zusammen mit Triton-X100 im Taspase1-Inhibierungsassay eingesetzt. Zugegeben wurden 0,1%; 0,5% und 1% Triton-X100. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Triton-X100 und zwei Ansätze ohne MWG6 und MWG7, einmal ohne und einmal mit 0,1% Triton-X100.

Vergleicht man die Intensität der Schnittproduktbanden mit und ohne Triton-X100, stellt man fest, dass unabhängig von der Anwesenheit der beiden Peptide MWG6 und MWG7 Triton-X100 bis zu einer Konzentration von 1% im Taspase1-Aktivitätsassay keine Auswirkung auf die Taspase1-Aktivität hat. Die Zugabe von Triton-X100 bis zu einer Konzentration von 1% führt also weder zur Freisetzung des Chloridions aus dem katalytischen Zentrum noch zu einer Konformationsänderung, die eine Platzierung von MWG6 und MWG7 ermöglichen würde.

Ein weiterer Grund für das Misslingen der Inhibierung könnte die Tatsache sein, dass die Peptide MWG6 und MWG7 nur stark verkürzte Fragmente des 2CL darstellen. Möglicherweise bewirken andere Teile vom 2CL nach Anlagerung an die Taspase1 eine Konformationsänderung der beiden katalytischen Zentren, die dann zur Freisetzung des Chloridions und zur Öffnung des katalytischen Zentrums führen. Um dies zu überprüfen, wurden die 2CL-Teilfragmente B (Abschnitt zwischen den beiden *cleavage sites*) und CS1-B-CS2 (Abschnitt von CS1 bis CS2) exprimiert und aufgereinigt (siehe Abb. 3.19).

3.2.3 Die 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2

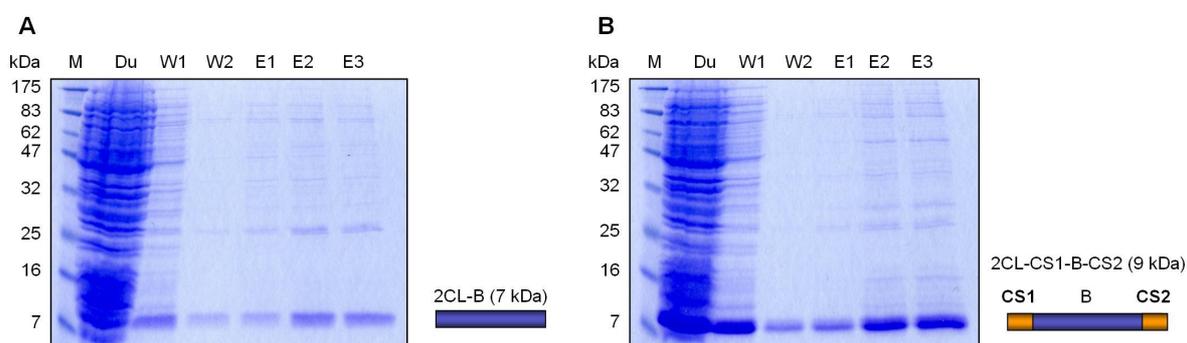


Abb. 3.19 Aufreinigung der 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2

Aufreinigung der 2CL-Teilfragmente 2CL-B (A) und 2CL-CS1-B-CS2 (B). Aufgetragen wurden jeweils der Durchlauf, die beiden Waschfraktionen und die drei Eluate. Aufgrund der geringen Größe der aufgereinigten Proteine mit 7 bzw. 9 kDa wurde die Auftrennung in einem 15%igen SDS-PAGE durchgeführt.

Die 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2 wurden im Taspase1-Inhibierungsassay in einer Konzentration von 20% eingesetzt, um zu überprüfen, ob sie sich als allosterische Aktivatoren des katalytischen Zentrums für zu testende Inhibitoren eignen.

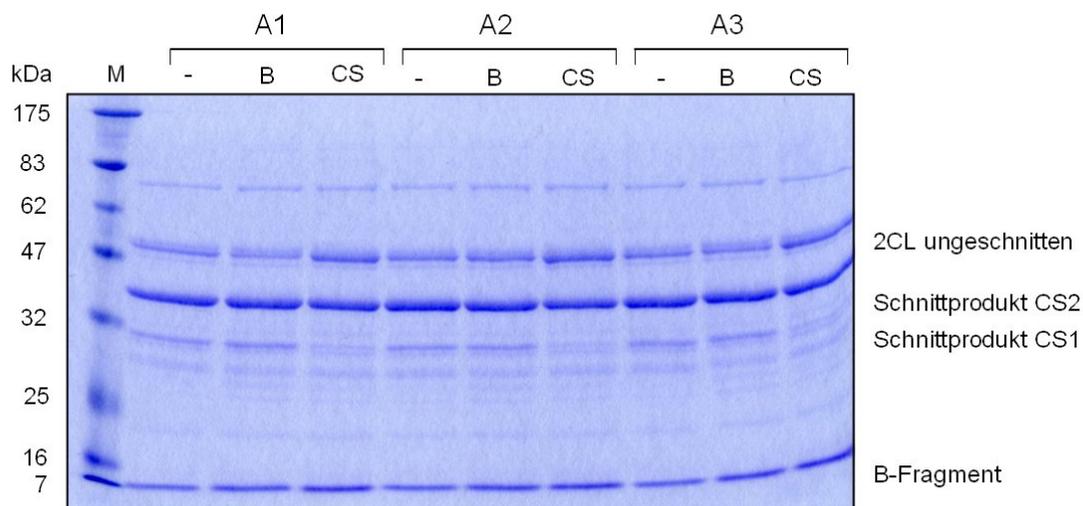


Abb. 3.20 Einsatz der 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2 als allosterische Aktivatoren für das katalytische Zentrum der Taspase1

Ergebnis des Taspase1-Inhibierungsassays unter Verwendung der 2CL-Teilfragmente 2CL-B (abgekürzt mit B) und 2CL-CS1-B-CS2 (abgekürzt mit CS). Aufgetragen wurden exemplarisch Ansätze mit den *deep hole*-Inhibitoren A1, A2 und A3, stellvertretend für alle anderen Inhibitoren. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne 2CL-Teilfragmente (abgekürzt mit -). Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines 15%igen SDS-PAGE.

Die Intensität der Schnittproduktbanden mit und ohne Einsatz des 2CL-Teilfragmentes 2CL-B ist identisch. Durch Zugabe des Teilfragmentes 2CL-CS1-B-CS2 konnte hingegen ein geringer Rückgang der Taspase1-Aktivität erzielt werden, erkennbar an der geringfügig schwächeren Bande des Schnittproduktes CS1.

Neben den üblichen Schnittproduktbanden sind weitere Banden mit 7 kDa zu sehen. Diese stammen zum einen von den eingesetzten 2CL-Teilfragmenten und zum anderen vom 2CL-B-Fragment, das durch die hydrolytische Spaltung von 2CL durch Taspase1 entsteht.

Auch beim Einsatz der Peptide MWG6 und MWG7 als Inhibitoren konnte durch Zugabe der 2CL-Teilfragmente keine Inhibierung der Taspase1 erreicht werden.

Um zu untersuchen, ob die geringe inhibierende Wirkung bei Verwendung des 2CL-Teilfragmentes 2CL-CS1-B-CS2 in Abb. 3.20 durch das Zusammenspiel von potentiell Inhibitor und 2CL-Teilfragment zustande kam oder nur durch einen von beiden verursacht wurde, wurden verschiedene Taspase1-Aktivitätsassays als Kontrollen durchgeführt (Abb. 3.21).

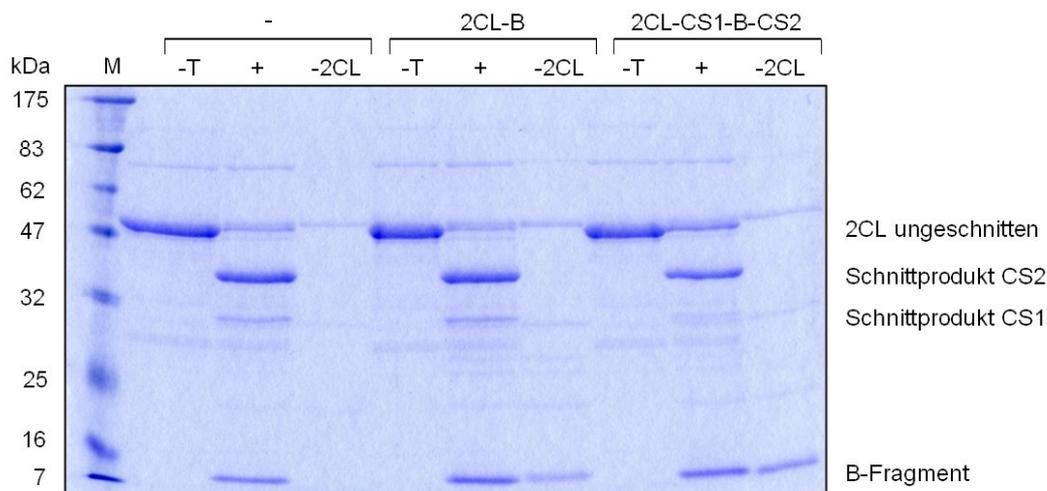


Abb. 3.21 Kontrollen zur Wirkung der 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2 als allosterische Aktivatoren für das katalytische Zentrum der Taspase1

Ergebnis des Taspase1-Inhibierungsassays bei dem die 2CL-Teilfragmente 2CL-B und 2CL-CS1-B-CS2 (abgekürzt mit CS) als Inhibitoren eingesetzt wurden. Bei den hier gezeigten Kontrollen wurden entweder Taspase1 (-T) oder 2CL (-2CL) weggelassen. Die mit „+“ gekennzeichneten Spuren beinhalten alle Komponenten des Taspase1-Aktivitätsassays. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines 15%igen SDS-PAGE.

Vergleicht man die Intensität der CS1-Schnittproduktbanden miteinander so fällt auf, dass durch Einsatz des 2CL-Teilfragmentes 2CL-CS1-B-CS2 im Taspase1 Aktivitätsassay ebenfalls eine geringe Inhibierung aufgetreten ist (vorletzte Spur, Abb. 3.21). Diese entspricht der inhibierenden Wirkung bei Einsatz des 2CL-Teilfragmentes 2CL-CS1-B-CS2 zusammen mit den Inhibitoren A1, A2 und A3 in Abb. 3.20. Die Inhibierende Wirkung muss also auf dem 2CL-Teilfragmentes 2CL-CS1-B-CS2 beruhen.

3.3 Abhängigkeit der Taspase1-Aktivität von der Chloridionenkonzentration

Um die Chloridabhängigkeit der Taspase1-Aktivität zu untersuchen, wurde eine Taspase1-Verdünnungsreihe im Taspase1-Aktivitätsassay unter Pufferbedingungen mit und ohne Chloridionen getestet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Chloridionenkonzentration im Taspase1-Aktivitätsassay beträgt unter Standardbedingungen 30 mM.

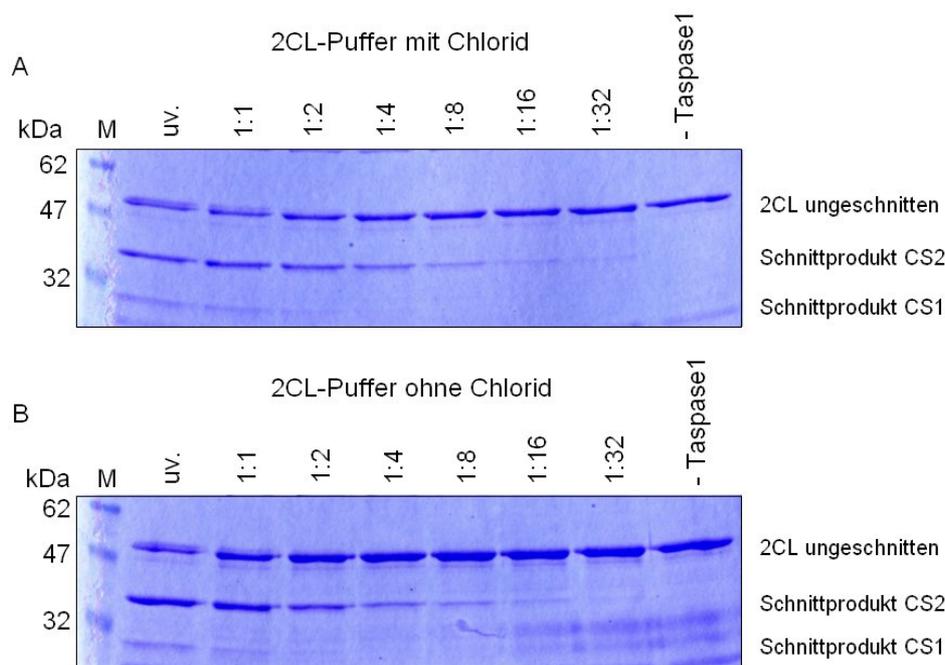


Abb. 3.22 Taspase1-Aktivitätsassay mit und ohne Chloridionen

Taspase1-Aktivitätsassay unter Verwendung von *cleavage*-Puffer mit Chloridionen (A) und ohne Chloridionen (B). Die Taspase1 wurde jeweils als Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:32 eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Taspase1.

Vergleicht man die Intensität der Schnittproduktbanden der beiden Versuchsreihen in Abb. 3.22 miteinander, so fällt auf, dass die Taspase1 in jeder eingesetzten Konzentration die gleiche Aktivität aufweist. Eine Chloridionenkonzentration von bis zu 30 mM im Taspase1-Aktivitätsassay hat also keinen Einfluss auf die hydrolytische Aktivität von Taspase1. Um zu überprüfen, ob höhere Chloridionenkonzentrationen Auswirkungen auf die Taspase1-Aktivität haben, wurde ein Taspase1-Aktivitätsassay unter Einsatz von bis zu 120 mM NaCl durchgeführt.

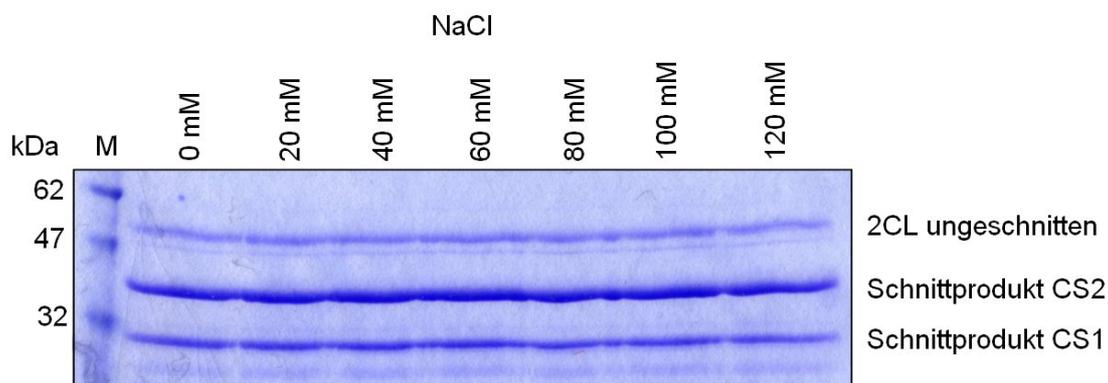


Abb. 3.23 Abhängigkeit der Taspase1-Aktivität von der Chloridionenkonzentration

Taspase1-Aktivitätsassay unter Einsatz verschiedener NaCl-Konzentrationen von 20 mM bis 120 mM. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Chloridionen verwendet.

Die Intensität der Schnittproduktbanden in Abb. 3.23 ist bei allen eingesetzten NaCl-Konzentrationen von 0 M bis 120 mM gleich. Eine Inhibierung von Taspase1 durch eine physiologische Chloridionenkonzentration von 26 mM (Faundez, Hartzell, 2004) konnte also nicht bestätigt werden. Im umgekehrten Falle, also bei Durchführung des Taspase1-Aktivitätsassays unter nahezu chloridfreien Bedingungen, war keine Zunahme der Taspase1-Aktivität zu erkennen. Die Aktivität der hier verwendeten rekombinanten Taspase1 bleibt also durch Chloridionenkonzentrationen von nahezu 0 M bis 120 mM unbeeinflusst.

Da alle Versuche, das Chloridion aus dem katalytischen Zentrum der Taspase1 zu entfernen, negativ ausfielen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Chloridion im katalytischen Zentrum zu fixieren, sodass auch die natürlichen Substrate 2CL bzw. MLL nicht mehr in der Lage waren, darin Platz zu nehmen. Zu diesem Zweck wurde nach Substanzen gesucht, die in der Lage waren, sich über dem *chloride hole* des katalytischen Zentrums der Taspase1 zu platzieren um dort das Chloridion zu fixieren (siehe Abb. 3.24). Insgesamt wurden 20 Substanzen identifiziert, die als *Cager* bezeichnet wurden (siehe Abb. 5.6).

3.4 Inhibierung von Taspase1 mit *Cager*

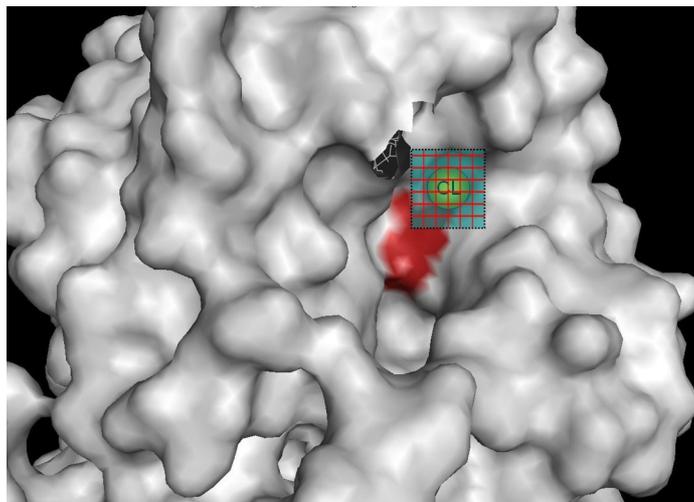


Abb. 3.24 Position der *Cager* im aktiven Zentrum der Taspase1

Dreidimensionales Modell mit einem der beiden katalytischen Zentren der Taspase1. Das katalytisch aktive Threonin 234 ist in Rot hervorgehoben. Außerdem sind das komplexierte Chloridion (grün) und ein *Cager* (rotes Gitter auf blauen Untergrund), schematisch dargestellt.

Die *Cager* wurden im Taspase1-Inhibierungsassay in einer Konzentration von 200 μM , in DMSO gelöst eingesetzt.

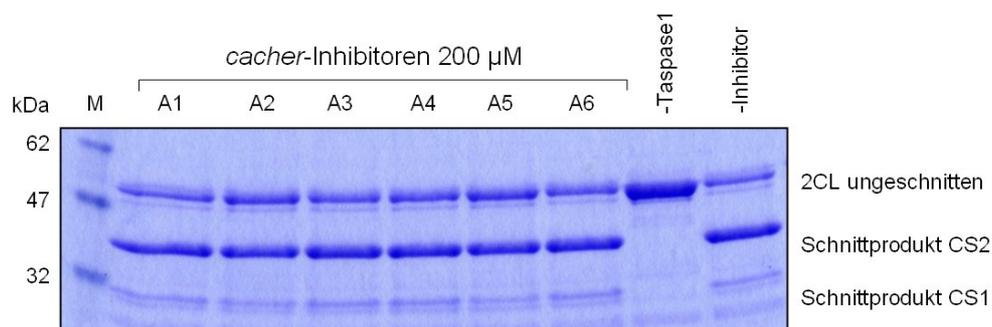


Abb. 3.25 Taspase1-Inhibierungsassay mit *Cagern*

Taspase1-Inhibierungsassay, in dem *Cagern* in einer Konzentration von 200 μM eingesetzt wurden. Exemplarisch sind hier die Ansätze mit den Inhibitoren A1 bis A6 dargestellt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Taspase1 und ohne Inhibitor verwendet.

Der Einsatz der *Cager* im Taspase1-Inhibierungsassay zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die Taspase1-Aktivität.

3.5 Untersuchungen zur Funktionsweise von Taspase1

Der Mechanismus, nach dem Taspase1 ihr Substrat spaltet, ist weitgehend unbekannt. Der Vorgang könnte jedoch wie in Abb. 3.26 beschrieben ablaufen.

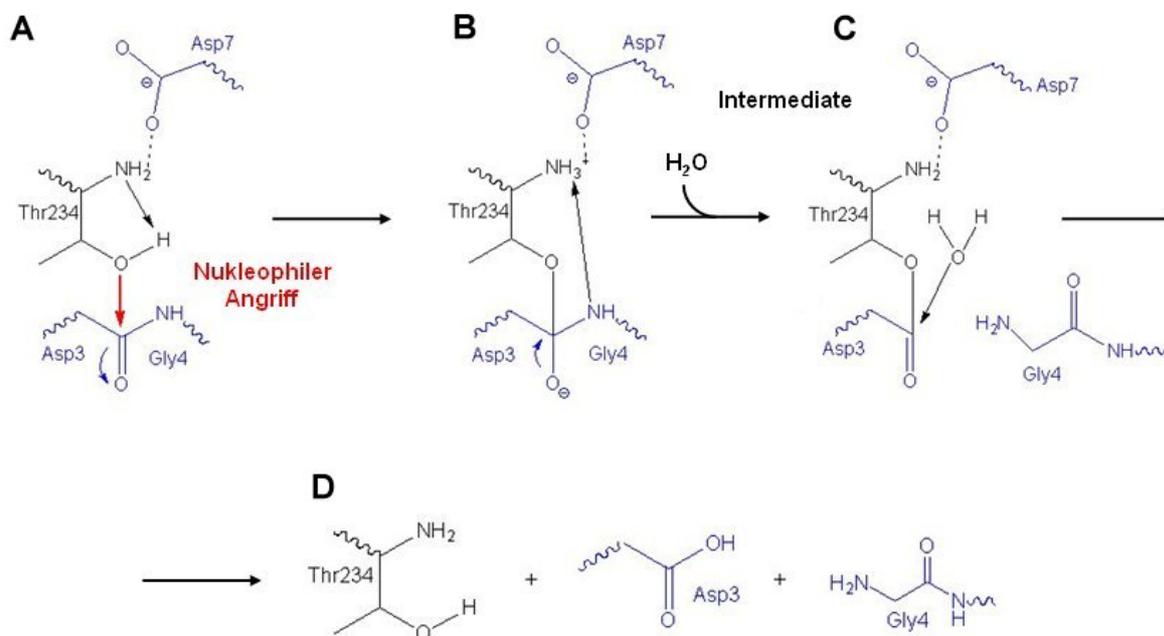


Abb. 3.26 Postulierter Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von MLL durch Taspase1.

Möglicher Ablauf der hydrolytischen Spaltung von MLL durch Taspase1. Aminosäuren des Substrates sind in Blau dargestellt und das katalytisch aktive Threonin 234 der Taspase1 in Schwarz.

Durch Wechselwirkung zwischen der OH-Gruppe von Aspartat 7 und der Amino-Gruppe von Threonin 234, wird Threonin 234 in eine aktive Orientierung gebracht. Threonin 234 kann in dieser Orientierung mit Hilfe seiner OH-Gruppe einen nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung zwischen Aspartat und Glycin durchführen. Dazu wird ein Proton umgelagert. Anschließend findet ein nukleophiler Angriff des negativ geladenen Sauerstoffs des Threonins auf das Aminosäurerückgrat der *cleavage site* zwischen Aspartat 3 und Glycin 4 statt (Abb. 3.26 A). Dies führt zu einem Umklappen der Doppelbindung zur OH-Gruppe des Threonins und zur Umlagerung des Protons auf seine negative NH₂-Gruppe (Abb. 3.26 B). Die Anlagerung eines Wassermoleküls führt zur Abspaltung des Glycins 4 von Aspartat 3 (Abb. 3.26 C) und zur Trennung des Threonins von Aspartat 3 (Abb. 3.26 D).

Nach der in Abb. 3.13 postulierten Positionierung des Substrates im katalytischen Zentrum der Taspase1 müsste neben dem Threonin 234 auch dem Serin 252 eine entscheidende Rolle bei der Anlagerung und katalytischen Spaltung des Substrates zukommen. Phenylalanin 98 ist für die Stabilisierung der Helix, die fingerartig über das katalytische

Zentrum der Taspase1 ragt, verantwortlich. Dadurch könnte eine sterische Hinderung den Eintritt des Substrates erschweren (Abb. 3.27).

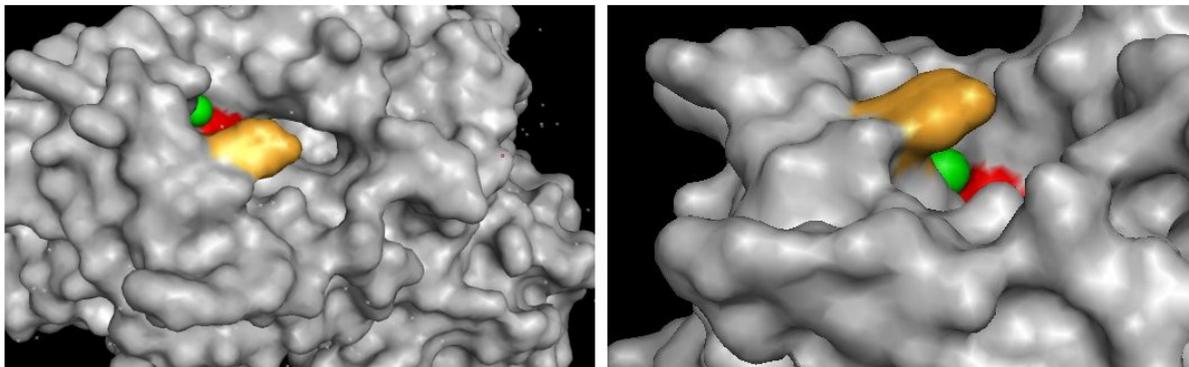


Abb. 3.27 Helix über dem katalytischen Zentrum der Taspase1

Position der Helix (in Gelb) über der Bindetasche des katalytischen Zentrums der Taspase1 in zwei unterschiedlichen Ansichten (von oben und von der Seite). Außerdem farblich hervorgehoben ist das katalytisch aktive Threonin 234 (in Rot) und das im katalytischen Zentrum gebundene Chloridion (in Grün).

3.6 Herstellung der Taspase1-Mutanten F98A; T234D und S252D

Durch Mutation dieser Aminosäuren sollte deren postulierte Wirkung untersucht werden. Hergestellt wurden die Mutanten F98A; T234D und S252D, die anschließend im Taspase1-Aktivitätsassay auf ihre katalytische Aktivität hin getestet wurden. Durch die Mutation F98A sollte die Beweglichkeit der Helix, die über das katalytische Zentrum der Taspase1 ragt, verbessert werden, um den Eintritt des Substrates zu erleichtern.

Die Mutante T234D sollte nicht mehr in der Lage sein einen nukleophilen Angriff auf das Substrat durchzuführen und durch die Mutation S252D sollte die Wechselwirkung mit dem Carboxylsauerstoff des Aspartates an der Spaltstelle des Substrates verhindern (siehe Abb. 3.13 B und Abb. 3.26).

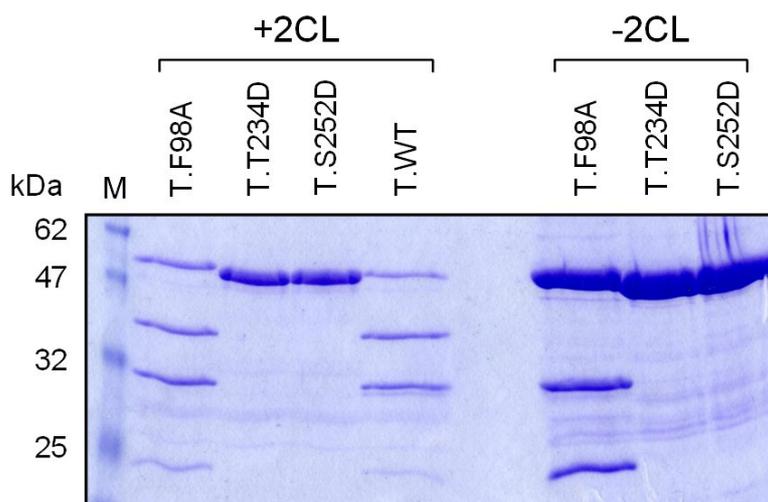


Abb. 3.28 Katalytische Aktivität der Taspase1-Mutanten F98A; T234D und S252D

Die katalytische Aktivität der Taspase1-Mutanten F98A; T234D und S252D wurde im Taspase1-Aktivitätsassay untersucht. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Wildtyp-Taspase1. Auf der rechten Seite wurden je 10 μ l der aufgereinigten Taspase1-Mutanten ohne 2CL aufgetragen.

Die Taspase1-Mutanten T234D und S252D zeigten im Aktivitätsassay keinerlei katalytische Aktivität *in trans* während die Mutante F98A katalytisch genauso aktiv war wie das Wildtyp-Enzym (Abb. 3.28). Das gleiche Bild zeichnet sich für die katalytische Aktivität der Taspase1-Mutanten *in cis* ab. Die Mutante F98A zeigt die volle autokatalytische Spaltung in die beiden Fragmente mit 28 KDa und 22 KDa, während die Mutanten T234D und S252D keine autokatalytische Spaltung durchlaufen. Dies zeigt, dass die autokatalytische Spaltung der Taspase1 essentiell für die Entfaltung ihrer katalytischen Aktivität *in trans* ist. Den beiden Aminosäuren Threonin 234 und Serin 252 kommt dabei eine entscheidende Rolle zu.

3.7 Klonierung und Expression neuer potentieller Taspase1-Substrate

Um weitere Substrate für Taspase1 zu finden, wurde die „Swiss-PROT-Datenbank“ nach den Aminosäuresequenzen QXDGXXD und Q[VL]DG durchsucht. X steht dabei für jede beliebige Aminosäure und die Suchanfrage Q[VL]DG gibt an, dass sowohl nach der Sequenz QVDG als auch QLDG gesucht werden soll. Es wurden 172 Proteine mit der Konsensussequenz QXDGXXD gefunden und 72 Proteine mit der Konsensussequenz Q[VL]DG. Da Taspase1 im Zellkern lokalisiert ist, wurden aus dieser Liste die folgenden, ebenfalls im Zellkern lokalisierten Proteine ausgewählt: AKNA, DYRK3, MLL4, NXF2 und TF2A. Per PCR wurden aus cDNA von SEM-Zellen und 293-Zellen Teilbereiche amplifiziert, ca. 150 bis 240 bp ober- und unterhalb der potentiellen Taspase1-Erkennungssequenzen und anschließend in den Expressionsvektor pGEX5T kloniert. Die Proteine wurden als GST-Fusionsproteine im Expressionsstamm *E.coli* W3110 exprimiert und mittels nativer Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

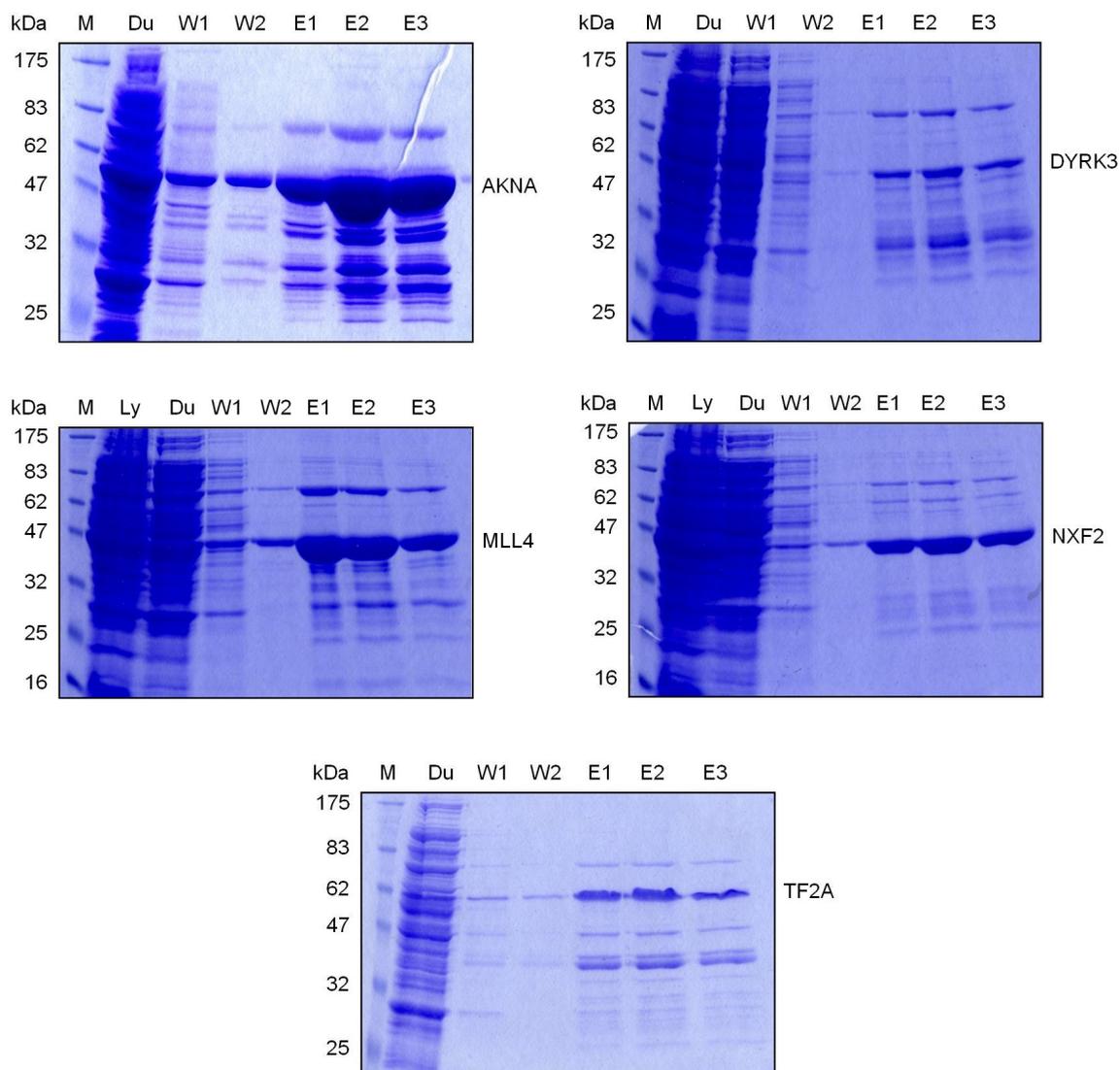


Abb. 3.29 Test der nativen Aufreinigungen von AKNA, DYRK3, MLL4, NXF2 und TF2A

Test der Aufreinigungen der Proteine AKNA, DYRK3, MLL4, NXF2 und TF2A mit Hilfe eines 12%igen SDS-PAGES. Aufgetragen wurden neben dem Längenstandard (M), die Lüsate (Lü), der Durchlauf (Du), die beiden Waschfraktionen (W1 und W2) und die 3 Elutionsfraktionen (E1 bis E3). Die Elutionsfraktionen beinhalten die Proteine mit einer Größe zwischen 45 bis 61 KDa.

Die aufgereinigten Proteine wurden als Substrate im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzt.

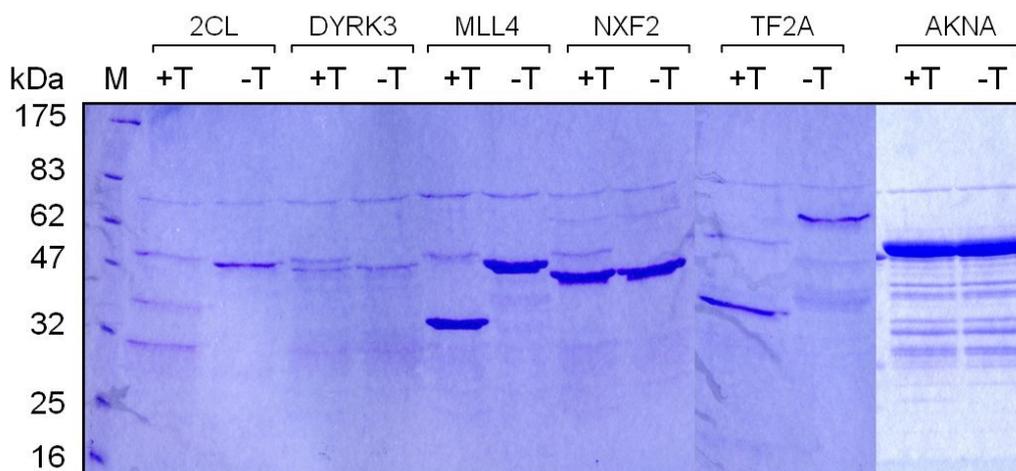


Abb. 3.30 Test der potentiellen Taspase1-Substrate im Taspase1-Aktivitätsassay

Die potentiellen Taspase1-Substrate AKNA, DYRK3, MLL4, NXF2 und TF2A wurden im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Taspase1 und ein Ansatz mit dem Taspase1-Substrat 2CL.

Von den als Substrat eingesetzten Proteinen wurden neben der Positivkontrolle 2CL, nur MLL4 und TF2A von Taspase1 hydrolytisch gespalten. TF2A war bereits als Taspase1-Substrat bekannt (Zhou, 2006), neu ist jedoch, dass MLL4 von Taspase1 geschnitten werden kann.

Um mögliche Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Ladung der Aminosäuren in den Konsensussequenzen sichtbar zu machen, wurden Aminosäuren mit gleicher Ladung entsprechend farblich hinterlegt (Tabelle 1).

Protein	Konsensussequenz	Katalytische Spaltung
MLL (CS1)	(QVDGADD)	ja
MLL (CS2)	(QLDGVDD)	ja
MLL4	(QLDGVDD)	ja
TF2A	(QVDGTGD)	ja
AKNA	(QQDQHQD)	nein
DYRK3	(QSDGISD)	nein
NXF2	(QLDGLSD)	nein

Tabelle 1: Übersicht über die im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzten Proteine, mit ihren Konsensussequenzen

Auflistung der im Taspase1-Aktivitätsassay eingesetzten Substrate, mit ihren Konsensussequenzen. Neutrale Aminosäuren sind türkis hinterlegt, saure Aminosäuren mit Rot und basische Aminosäuren mit Grün.

Vergleicht man die Verteilung der neutralen (türkis), sauren (rot) und basischen (grün) Aminosäuren der Konsensussequenzen die durch Taspase1 geschnitten werden, mit denen die nicht geschnitten werden, so sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Die Ladungsverteilung innerhalb der Konsensussequenzen scheint also für die Substratspezifität ohne Bedeutung zu sein.

4 Diskussion

Die Aktivität von Endopeptidasen spielt eine essentielle Rolle bei vielen biologischen Prozessen. Speziell im Falle einer t(4;11)-Translokation ist Taspase1 maßgeblich an der Entstehung einer akuten lymphatischen Leukämie beteiligt. Die Aktivität der Taspase1 ist Voraussetzung für die Entfaltung des onkogenen Potentials des AF4•MLL-Proteins (Bursen, 2004). Durch eine Inhibierung der Taspase1 könnte also die Transformation der Zelle nach einer t(4;11)-Translokation verhindert werden.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein Testsystem etabliert, mit dem verschiedene potentielle Taspase1-Inhibitoren getestet werden konnten. Potentielle Taspase1-Inhibitoren wurden durch Pharmakophorscreenings an Strukturmodellen der Taspase1, die auf Homologie- bzw. Kristallstrukturdaten basieren, vorgeschlagen.

4.1 Das Homologiemodell der Taspase1

Das Homologiemodell der Taspase1 stellt ein rein *in silico*, anhand von Homologiedaten erstelltes Strukturmodell dar. Die wenig später veröffentlichte Kristallstruktur der Taspase1 zeigte jedoch einen völlig anderen Aufbau, insbesondere im Bereich des katalytischen Zentrums der Taspase1 (Khan 2005). Die 86 Substanzen, die durch Pharmakophorscreenings des Homologiemodells ermittelt wurden, waren folglich alle Taspase1-unspezifisch und konnten daher nicht inhibierend wirken (siehe Abb. 3.8).

4.2 Die Kristallstruktur der Taspase1

Die Kristallstruktur der Taspase1 wurde verwendet um weitere Pharmakophorscreenings durchzuführen. Daraus resultierten insgesamt 50 potentielle Inhibitoren, die sich an zwei unterschiedlichen Stellen innerhalb des aktiven Zentrums (*deep hole* und *chloride hole*) anlagern können. Auch diese Substanzen zeigten keine inhibierende Wirkung auf Taspase1 (siehe Abb. 3.11). Geht man davon aus, dass die Kristallstruktur korrekt ist, kommt als möglicher Grund für das Versagen dieser potentiellen Inhibitoren das im katalytischen Zentrum komplexierte Chloridion in Frage.

4.2.1 Das im katalytischen Zentrum komplexierte Chloridion inhibiert Taspase1 unter physiologischen Bedingungen

Neben der außergewöhnlichen Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren im aktiven Zentrum stellt das im katalytischen Zentrum der Taspase1 komplexierte Chloridion eine weitere Besonderheit der Taspase1 dar. Möglicherweise ist dieses Chloridion der Grund dafür, dass alle bisher getesteten Substanzen keinerlei inhibierende Wirkung auf Taspase1 zeigten. Dieses Chloridion kompetitiert unter physiologischen Bedingungen (ca. 50 mM NaCl) mit dem Substrat bzw. potentiellen Inhibitoren um die Bindung im katalytischen Zentrum. Dies würde auch die sehr geringe katalytische Aktivität der Taspase1 erklären (siehe Abb. 3.4).

Im Falle der potentiellen Inhibitoren unterbindet das Chloridion durch sterische Hinderung eine Positionierung im katalytischen Zentrum. Die Inhibierung bleibt also bei allen eingesetzten Substanzen aus.

So lange sich das Chloridion an seiner Position befindet, ist die Taspase1 katalytisch inaktiv. Da das Substrat aber von Taspase1 hydrolytisch gespalten wird, muss es einen Mechanismus geben, nach dem das Chloridion durch das Substrat von seiner Position verdrängt wird.

4.2.2 Das Aspartat an Position Sieben der *cleavage sites* CS1 und CS2 ist essentiell für die Aktivierung des katalytischen Zentrums der Taspase1

Die beiden *cleavage sites* CS1 (QVDGADD) und CS2 (QLDGVDD) besitzen an Position Sieben je ein Aspartat. Zusammen mit der postulierten räumlichen Orientierung der *cleavage sites* innerhalb der katalytischen Zentren der Taspase1 legt dies die Vermutung nahe, dass das Aspartat für die Verdrängung des Chloridions verantwortlich ist. Dabei könnten die Aspartate 7 mit ihren negativen Ladungen die Positionen der Chloridionen einnehmen, woraufhin das Threonin 234 eine Rotationsbewegung um 180° durchführt und an eine Position gelangt, in der die OH-Gruppe einen nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung des Substrates durchführen kann.

Die Ergebnisse der Taspase1-Aktivitätsassays, bei denen 2CL-Mutanten eingesetzt wurden, bei denen Aspartat 7 der *cleavage sites* gegen Glycin bzw. Lysin ausgetauscht wurden, konnten diese Vermutung untermauern. Dabei war es unerheblich, welche der beiden Mutationen durchgeführt wurden. Glycin-Austauschmutanten wurden genauso wenig gespalten wie entsprechende Lysin-Austauschmutanten. Zu erwarten gewesen wäre jedoch, dass die Lysin-Mutanten wesentlich schlechter umgesetzt werden, da davon ausgegangen werden musste, dass das Lysin aufgrund seines basischen Charakters eine Stabilisierung

des Chloridions innerhalb des katalytischen Zentrums bewirkt. Da dies nicht der Fall war muss man davon ausgehen, dass zwar das Aspartat 7 eine essentielle Rolle bei der Verdrängung des Chloridions spielt, seine negative Ladung jedoch zweitrangig ist. Möglicherweise sind die Gründe aber struktureller Natur. Man kann annehmen, dass durch Austauschen des sauren Aspartates gegen das neutrale Glycin bzw. das basische Lysin geringe strukturelle Änderungen innerhalb des Substrates 2CL stattfinden. Diese könnten die Positionierung der *cleavage sites* innerhalb der katalytischen Zentren der Taspase1 erschweren, und dadurch die Anzahl der hydrolytischen Spaltungen mutierter Substrate vermindern.

Insgesamt wurde durch die Mutation des Aspartates eine Verminderung der hydrolytischen Spaltungen sowohl an CS1 als auch an CS2 verursacht. Ein vollständiger Verlust der hydrolytischen Spaltung durch Taspase1 konnte nur an CS1 erreicht werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die CS1 bereits im unmutierten Zustand schlechter von Taspase1 geschnitten wird als die zweite Erkennungsstelle CS2.

4.2.3 Das 2CL-Teilfragment 2CL-CS1-B-CS2 stellt das kleinste bekannte Molekül dar, das mit Taspase1 selektiv interagieren kann.

Die 2CL-Fragmente MWG6 und MWG7, die die mutierten *cleavage sites* CS1 bzw. CS2 beinhalten, wirkten im Taspase1-Aktivitätsassay nicht inhibierend auf die katalytische Aktivität von Taspase1 (siehe Abb. 3.17). Offenbar sind die Peptide MWG6 und MWG7 alleine nicht in der Lage, sich im katalytischen Zentrum zu positionieren. Auch durch Zugabe von bis zu 1% des Detergens TritonX100 konnte keine Aktivierung der Taspase1 (Öffnung des katalytischen Zentrums und Freisetzung des Chloridions) erzielt werden. Die denaturierenden Eigenschaften von TritonX100 sind dafür wahrscheinlich zu unspezifisch. Da offenbar die Peptide MWG6 und MWG7 nicht in der Lage sind sich im katalytischen Zentrum der Taspase1 zu positionieren, liegt die Vermutung nahe, dass auch andere Bereiche des Substrates eine Rolle bei der katalytischen Spaltung durch Taspase1 spielen. Denkbar wäre, dass zuerst durch Anlagern des Substrates 2CL bzw. MLL eine Konformationsänderung an den beiden katalytischen Zentren der Taspase1 stattfindet und sich daraufhin die *cleavage sites* in die katalytischen Zentren der Taspase1 hineinlegen können (siehe Abb. 3.13). Geht man davon aus, dass sich 2CL bzw. MLL nach dem in (Abb. 3.13) postulierten Modell an die Taspase1 anlagert, könnte eine entsprechende Aufgabe dem Bereich zwischen den beiden *cleavage sites*, der als 2CL-B bezeichnet wurde, zukommen. Taspase1-Inhibierungsassays zeigten jedoch, dass auch durch Zugabe von 2CL-B keine Verbesserung in der Wirkung der potentiellen Inhibitoren erzielt werden konnte (Abb. 3.20). Dies entspricht insofern der Hypothese, da das 2CL-B-Fragment auch bei

katalytischer Spaltung des natürlichen Substrates entsteht und sich anschließend wieder von der Taspase1 trennen muss, um Platz zu machen für das nächste Substrat. Eine feste Bindung dieses Fragmentes an Taspase1 wäre deshalb unwahrscheinlich.

Eine geringfügige inhibierende Wirkung konnte nur durch das 2CL-Teilfragment 2CL-CS1-B-CS2 erzielt werden. Diese inhibierende Wirkung beruhte jedoch nicht auf einer allosterischen Aktivierung der Taspase1 verbunden mit einer Bindung der eingesetzten Inhibitoren im katalytischen Zentrum, sondern wahrscheinlich auf einer Konkurrenz zwischen 2CL-CS1-B-CS2 und dem Substrat 2CL (Abb. 3.21). Die 2CL-Teilfragmente können also nicht zur allosterischen Aktivierung der Taspase1 für Inhibitoren verwendet werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das 2CL-Teilfragment 2CL-CS1-B-CS2 in der Lage ist, an Taspase1 zu binden, da andernfalls keine Konkurrenz mit dem Substrat 2CL aufgetreten wäre.

Weder der Einsatz der Peptide MWG6 und MWG7, noch das 2CL-Teilfragment 2CL-B (sowohl zusammen als auch getrennt voneinander) zeigten eine inhibierende Wirkung auf Taspase1. Scheinbar ist eine Bindung an Taspase1 nur möglich, wenn beide *cleavage sites* und das 2CL-Teilfragment 2CL-B kovalent miteinander verbunden sind. Das Peptid 2CL-CS1-B-CS2 stellt damit das kleinste bekannte Molekül dar, das in der Lage ist, das Chloridion aus dem katalytischen Zentrum zu verdrängen bzw. die Taspase1-Aktivität selektiv zu vermindern. Ein Grund dafür könnte sein, dass nach Anlagerung des Substrates an die Taspase1 mechanische Arbeit geleistet wird, durch die schließlich die Taspase1 und insbesondere ihre beiden katalytischen Zentren derart verformt werden, dass die Bindung der beiden Chloridionen in den katalytischen Zentren gelockert wird. Dadurch wäre die Voraussetzung geschaffen für eine Verdrängung der Chloridionen durch die beiden *cleavage sites* und die katalytische Spaltung des Substrates (Abb. 4.1).

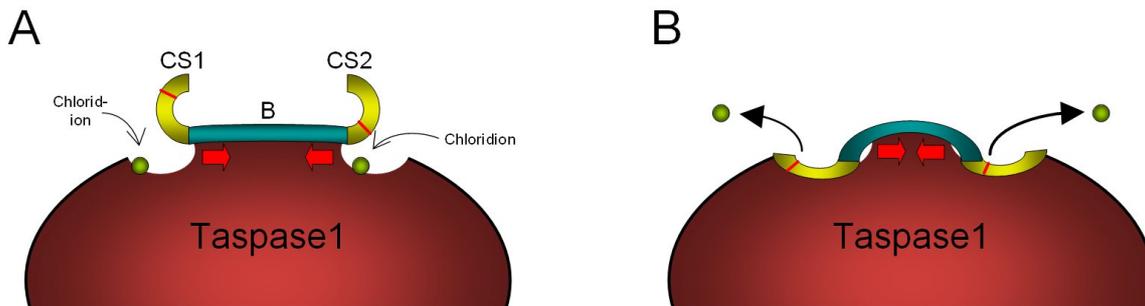


Abb. 4.1 Aktivierung der beiden katalytischen Zentren der Taspase1 durch ihr Substrat bzw. 2CL-CS1-B-CS2

Postulierter Mechanismus, nach dem die katalytische Aktivierung der Taspase1 abläuft. Exemplarisch ist die Bindung des 2CL-Teilfragmentes 2CL-CS1-B-CS2 an die Taspase1 dargestellt.

- A Taspase1 nach Anlagerung des Substrates bzw. des Peptides 2CL-CS1-B-CS2. Beide katalytischen Zentren sind durch die darin komplexierten Chloridionen (grün) inaktiv.
- B Durch Interaktion mit dem Substratteil „B“ (blau) kommt es zu einer Deformation der Taspase1 und ihrer katalytischen Zentren. Die Bindung der Chloridionen wird gelockert, womit die Voraussetzung dafür geschaffen wurde, die beiden *cleavage sites* (gelb) in den katalytischen Zentren zu platzieren. Dadurch ist die Voraussetzung für eine katalytische Spaltung geschaffen.

Die in den katalytischen Zentren der Taspase1 komplexierten Chloridionen scheinen sehr fest gebunden zu sein. Durch Dialyse der Taspase1 und Durchführen der Taspase1-Aktivitätsassays unter chloridfreien Bedingungen konnte keinerlei erhöhte der Enzymaktivität festgestellt werden.

Da alle Versuche, das Chloridion aus dem katalytischen Zentrum der Taspase1 zu entfernen, fehlschlagen, wurde nach Substanzen gesucht, die in der Lage waren, die Bindung des Chloridions im katalytischen Zentrum der Taspase1 zu stabilisieren, so dass eine Verdrängung durch das Substrat nicht mehr möglich war.

Da keine dieser neuen Substanzen inhibierend auf die Taspase1-Aktivität wirkte, muss man davon ausgehen, dass entweder das auf den Kristallstrukturdaten basierende 3D-Modell der Taspase1 nicht korrekt ist, oder aber die in Abb. 4.1 postulierte Deformation der Taspase1 so stark ist, dass sich weder Chloridionen noch *Cager* im katalytischen Zentren halten können.

4.2.4 Die nukleophilen Eigenschaften des Threonin 234 sind essentiell für die proteolytische Aktivität der Taspase1

In dem im Abb. 3.26 postulierten Mechanismus kommt den Aminosäuren Threonin 234 und Serin 252 eine entscheidende Rolle bei der katalytischen Aktivität der Taspase1 zu. Das Threonin 234 ist die eigentliche katalytisch aktive Aminosäure, die den nukleophilen Angriff auf das Aminosäurerückgrat des Substrates durchführt. Dieser nukleophile Angriff sollte durch Mutation des Threonin 234 in ein Aspartat verhindert werden.

Durch die Mutation des Serins 252 in Aspartat sollte die für die hydrolytische Spaltung nötige Wechselwirkung mit dem Carboxylsauerstoff an der Spaltstelle des Substrates verhindert werden (Abb. 3.13 B und Abb. 3.26).

Beide Mutationen führten zum Ausbleiben der katalytischen Spaltung des Substrates (siehe Abb. 3.28). Der in Abb. 3.26 postulierte Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von MLL durch Taspase1 konnte also bestätigt werden.

Ähnliche Auswirkungen hatten die Mutationen auf die katalytische Aktivität *in cis*. Weder die Taspase1-Mutante T234D, noch S252D wiesen eine autokatalytische Aktivierung auf (Abb. 3.28).

Für den Verlust der katalytischen Aktivität *in trans*, waren dabei sowohl die fehlende autokatalytische Aktivierung der Taspase1 verantwortlich als auch die Eigenschaften des durch Mutation an Position 234 bzw. 252 eingesetzten Aspartates. Im Gegensatz zu den Taspase1-Mutanten T234D und S252D zeigten die Mutanten T234A und T234S zwar auch keine katalytische Aktivität *in cis*, wohl aber *in trans* (Khan 2005).

Durch Mutation des Phenylalanins 98 in Alanin sollte die Beweglichkeit der Helix über dem katalytischen Zentrum der Taspase1 verbessert werden, um eine mögliche sterische Hinderung beim Eintritt des Substrates in das katalytische Zentrum zu vermindern und dadurch eine Erhöhung der katalytischen Aktivität der Taspase1 zu erreichen. Die entsprechende Mutante zeigte jedoch die gleiche autokatalytische Aktivität wie die Wildtyp-Taspase1 (Abb. 3.28). Die Helix über dem katalytischen Zentrum der Taspase1 scheint also bei der Positionierung des Substrates keine Rolle zu spielen.

4.2.5 MLL4 stellt ein neues Substrat für Taspase1 dar

Durch Klonierung und Expression verschiedener Proteine mit der Konsensussequenz QXDGXXD und Q[VL]DG sollten neue Substrate der Taspase1 identifiziert werden. Unter den vier ausgewählten Proteinen AKNA, DYRK3, MLL4 und NXF2 konnte im Taspase1-Aktivitätsassay nur bei MLL4 eine Spaltung festgestellt werden (siehe Abb. 3.30).

MLL4 ist ein transkriptioneller Regulator, der durch H3K4-Methylierung aktivierend auf die Transkription wirkt. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob in der lebenden Zelle MLL4 tatsächlich ein Taspase1-Substrat darstellt. Das hier eingesetzte MLL4-Protein ist stark verkürzt (50 KDa gegenüber 293,5 KDa). Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Taspase1-Erkennungssequenz im Wildtyp-MLL4 im Inneren des Proteins befindet und daher für Taspase1 nicht zugänglich ist.

Die Tatsache, dass AKNA, DYRK3 und NXF2 im Taspase1-Aktivitätsassay in Abb. 3.30 nicht durch Taspase1 geschnitten wurden, könnte ebenfalls an einer ungünstigen Faltung der Proteinfragmente liegen. Die aufgereinigten Proteine bestanden aus ca. 300 Aminosäuren langen Fragmenten der entsprechenden Proteine, die als ca. 50 KDa großes GST-Fusionsprotein exprimiert wurden. Möglicherweise entspricht die Faltung dieser Proteine nicht der nativen Faltung in der lebenden Zelle. Man muss daher in Betracht ziehen, dass die entsprechende Konsensussequenz möglicherweise nicht für Taspase1 zugänglich ist. Es ist also denkbar, dass AKNA, DYRK3 und NXF2 in der lebenden Zelle doch von Taspase1 hydrolytisch gespalten werden.

Ein Vergleich der Ladungsverteilung innerhalb der Konsensussequenzen von Proteinen, die durch Taspase1 geschnitten werden, mit denen die nicht geschnitten werden ergab keine gravierenden Unterschiede. Wahrscheinlich hängt eine Taspase1-Spezifität der Substrate mindestens genauso von ihrer Tertiärstruktur ab wie von der Beschaffenheit der relativ kurzen Konsensussequenz.

4.3 Nachwort

Insgesamt sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei dem Taspase1-Aktivitätsassay um ein hochgradig artifizielles System handelt. Die ausnahmslos humanen Proteine wurden in bakteriellen Expressionssystemen hergestellt. Man kann also nicht ausschließen, dass zum einen die Faltung der Proteine, die teilweise nach komplizierten und bis heute nicht nachvollziehbaren Mechanismen abläuft, nicht den natürlichen, d.h. in menschlichen Zellen vorkommenden Formen entspricht. Zum Anderen werden viele posttranslationale Modifikationen, die normalerweise in der menschlichen Zelle ablaufen und zum Teil entscheidende Auswirkungen auf die Funktion der Proteine haben können, in der Bakterienzelle mit großer Wahrscheinlichkeit nicht stattfinden. Aus technischen Gründen wurden von allen Taspase1-Substraten nur Teilbereiche, ca. 150 bis 240 bp links und rechts der potentiellen Taspase1-Erkennungssequenzen, als GST-Fusionsproteine exprimiert. Auch die Bedingungen unter denen die Proteine aufgereinigt und gelagert wurden, entsprechen nur teilweise den natürlichen Gegebenheiten. Nichtsdestotrotz stellen die angewandten Techniken, derzeit gebräuchliche und durchaus leistungsfähige Methoden dar.

4.4 Ausblick

Eine weitere Möglichkeit eine spezifische Inhibierung der Taspase1 zu erreichen, wäre der Einsatz von Peptidomimetika im Taspase1-Inhibierungsassay. Ein Peptidomimetikum könnte z.B. ein Peptid sein, das die *cleavage site* CS2 beinhaltet, bei der die Peptidbindung an der Stelle, wo üblicherweise die hydrolytische Spaltung stattfindet, durch eine andere, nicht hydrolysierbare Bindung ersetzt wurde. Ein solches Peptidomimetikum sollte sich an das Taspase1-Molekül anlagern können und aufgrund der ausbleibenden hydrolytischen Spaltung nicht mehr davon trennen. Das entsprechende katalytische Zentrum wäre dann für die Anlagerung des eigentlichen Substrates blockiert.

Einen ähnlichen Ansatz stellten die Peptide MWG6 und MWG7 dar. In diesen Fällen handelte es sich jedoch um reine Peptide, die nur aufgrund ihrer mutierten Aminosäuresequenz nicht mehr von Taspase1 gespalten werden sollten. Da diese Moleküle wahrscheinlich aufgrund ihrer zu geringen Länge nicht an die Taspase1 binden konnten müssten die Versuche mit schrittweise verlängerten Peptiden wiederholt werden.

Letzten Endes bleibt das Problem der in den katalytischen Zentren der Taspase1 komplexierten Chloridionen. Diese werden auch zukünftig die Platzierung eines Inhibitors innerhalb der katalytischen Zentren erschweren. Nach dem in Abb. 4.1 postulierten Mechanismus der katalytischen Aktivierung der Taspase1, ist auf jeden Fall ein Teil des Substrates nötig, um die Chloridionen aus den katalytischen Zentren zu verdrängen.

Der Taspase1-Inhibitor soll letzten Endes aber als Wirkstoff in der Krebstherapie eingesetzt werden. Er muss also in eine applizierbare Form gebracht und schließlich in die Zellkerne maligner Zellen eingeschleust werden. Beides ist für Peptide schwer zu realisieren. Es muss also weiter nach niedermolekularen Substanzen geforscht werden, die die Taspase1-Aktivität spezifisch hemmen. Da das katalytische Zentrum der Taspase1 aufgrund der genannten Probleme als Angriffspunkt für eine Inhibierung entfällt, könnte die Lösung in Substanzen liegen, die eine allosterische Hemmung der Taspase1 bewirken, also spezifisch an einem Bereich des Taspase1-Moleküls andocken, der außerhalb des katalytischen Zentrums liegt und trotzdem dessen katalytische Aktivität unterbindet. Die Suche nach solchen Substanzen könnte ebenfalls durch Pharmakophorscreenings an der Kristallstruktur der Taspase1 stattfinden. Da diese Screeningmethoden aber sehr aufwendig sind und praktisch jede beliebige Stelle des Taspase1-Moleküls als Ansatzpunkt für eine allosterische Hemmung in Frage kommt, könnte alternativ dazu auch ein quantitatives *in vitro*-Screening verschiedener Substanzen unter Verwendung des Taspase1-Aktivitätsassays durchgeführt werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Suche nach Inhibitoren für Taspase1 könnte die Entwicklung eines 3D-Modells des Substrates MLL, auf Basis von Homologiedaten oder

einer Kristallstrukturanalyse sein. Durch Dockingsimulationen zwischen Taspase1 und MLL könnten dann die Interaktionsbereiche der beiden Proteine identifiziert werden. Durch gezielte Pharmakophorscreenings dieser Bereiche könnten entweder potentielle allosterische Inhibitoren gefunden werden oder aber Substanzen, die die Interaktion zwischen Taspase1 und MLL selbst unterbinden. Auf die gleiche Weise könnte auch nach Substanzen gesucht werden, die die Bildung des Taspase1-Tetramers unterbinden, wodurch möglicherweise ebenfalls die Taspase1-Aktivität verhindert werden könnte.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

Chemikalien	Bezugsquelle (Firma)
λ -DNA (für DNA-Marker)	MBI Fermentas
β -Mercaptoethanol	Roth
Acrylamid	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Roth
APOD	Roth
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Roth
Coomassie Brillant Blue	Sigma
DEPC	Roth
dNTPs	Peqlab
DTT	Roth
EDTA	Roth
Epoxomicin	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Gliotoxin	Sigma
Glycerin 86 %	Roth
HEPES	Roth
Imidazol	Sigma
IPTG	Saxon
Kaliumchlorid	Roth
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Merck
MG123	Calbiochem
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	NEB New England Biolabs
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Nickelagarose	Sigma
PBS	Invitrogen
Saccharose	Roth
SDS	Biomol
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Tris	Roth
Triton-X100	Sigma
Tween 20	Sigma
Yeast Extract	Difco

Potentielle Taspase1-Inhibitoren abgeleitet vom Homologiemodell

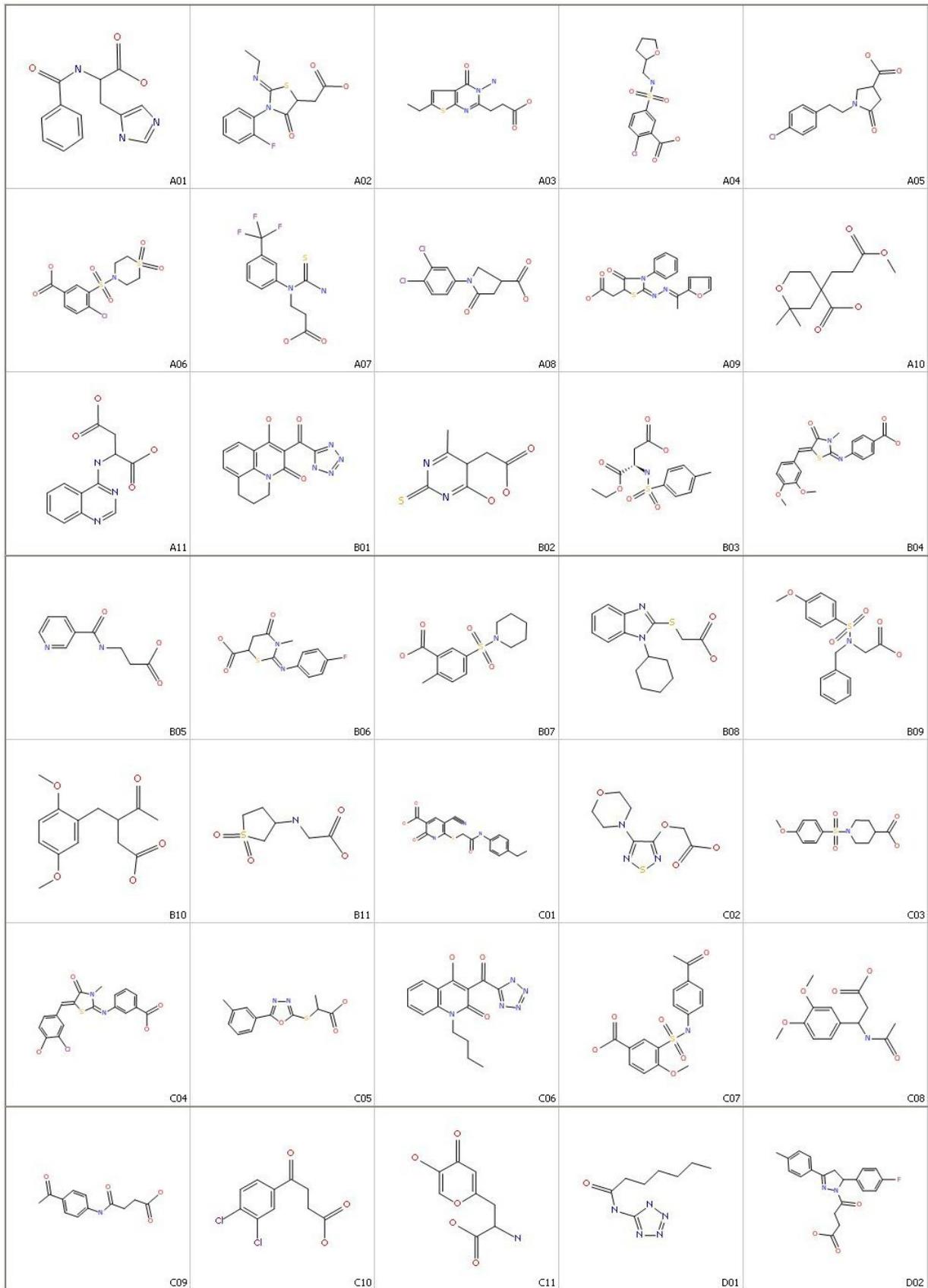


Abb. 5.1 Potentielle Taspase1-Inhibitoren (A1 bis D02), abgeleitet von Homologiemodell

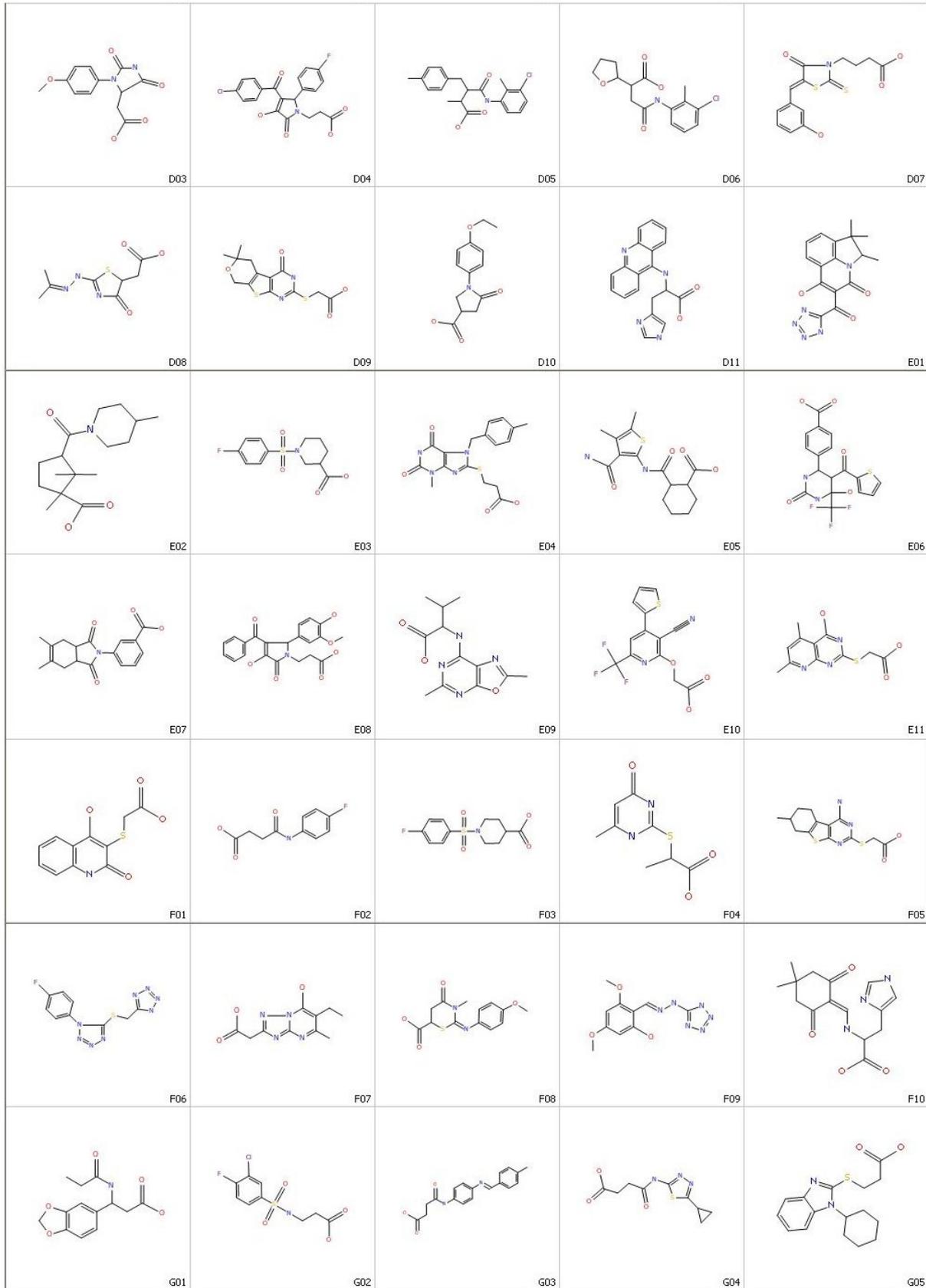


Abb. 5.2 Potentielle Taspase1-Inhibitoren (D03 bis G05), abgeleitet vom Homologiemodell

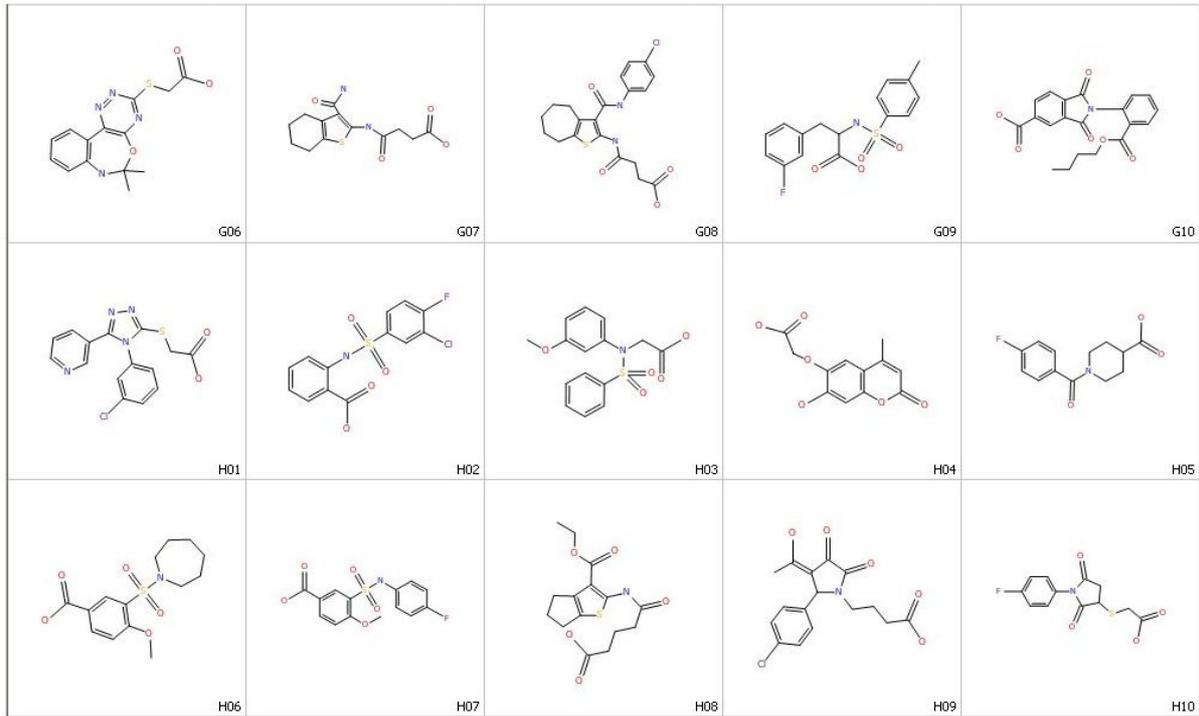
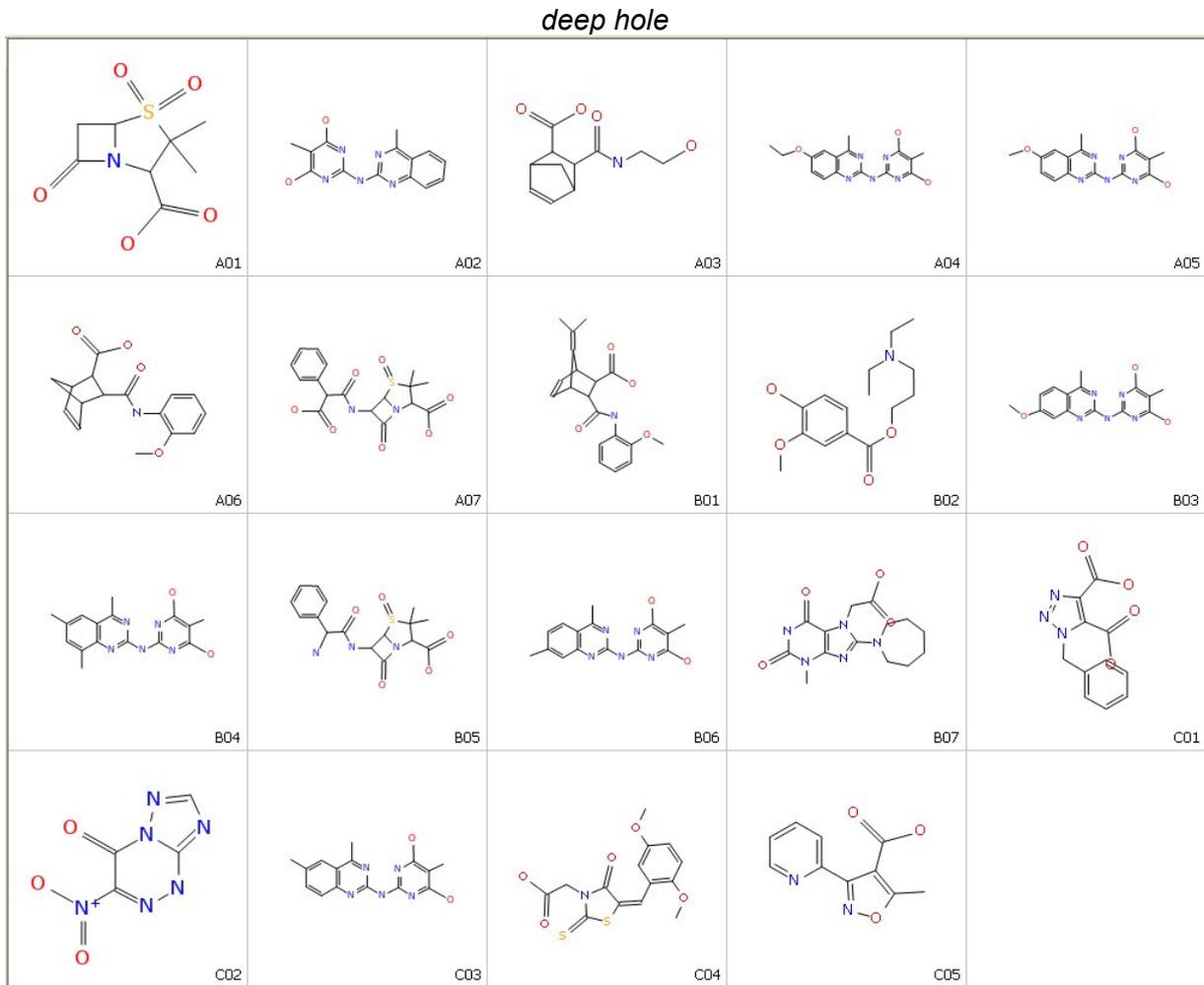


Abb. 5.3 Potentielle Taspase1-Inhibitoren (G06 bis H10), abgeleitet vom Homologiemodell

Potentielle Taspase1-Inhibitoren für *deep hole* und *chloride hole*Abb. 5.4 Potentielle Taspase1-Inhibitoren für *deep hole*

chloride hole

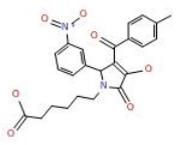
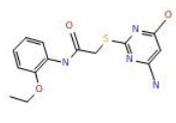
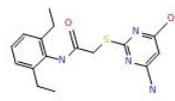
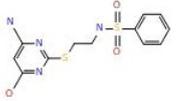
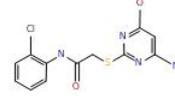
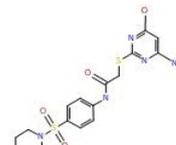
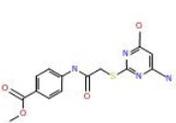
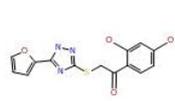
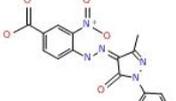
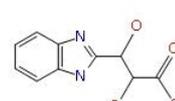
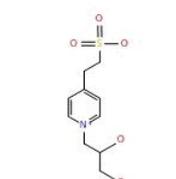
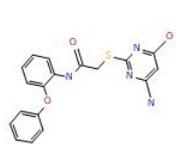
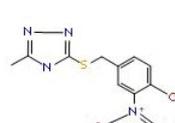
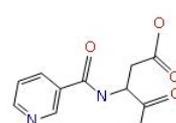
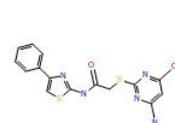
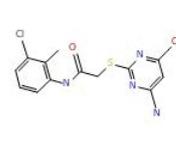
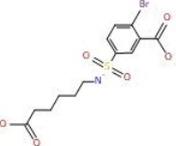
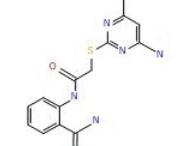
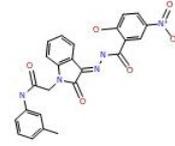
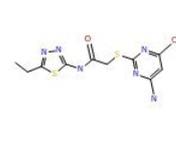
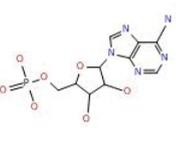
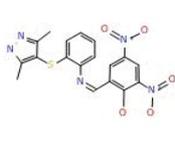
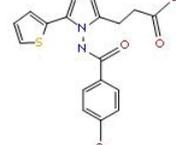
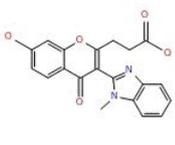
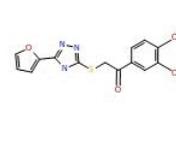
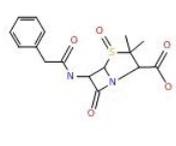
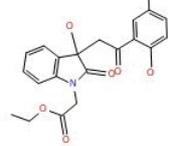
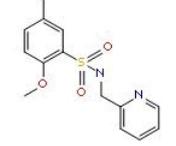
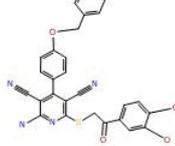
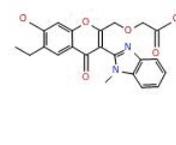
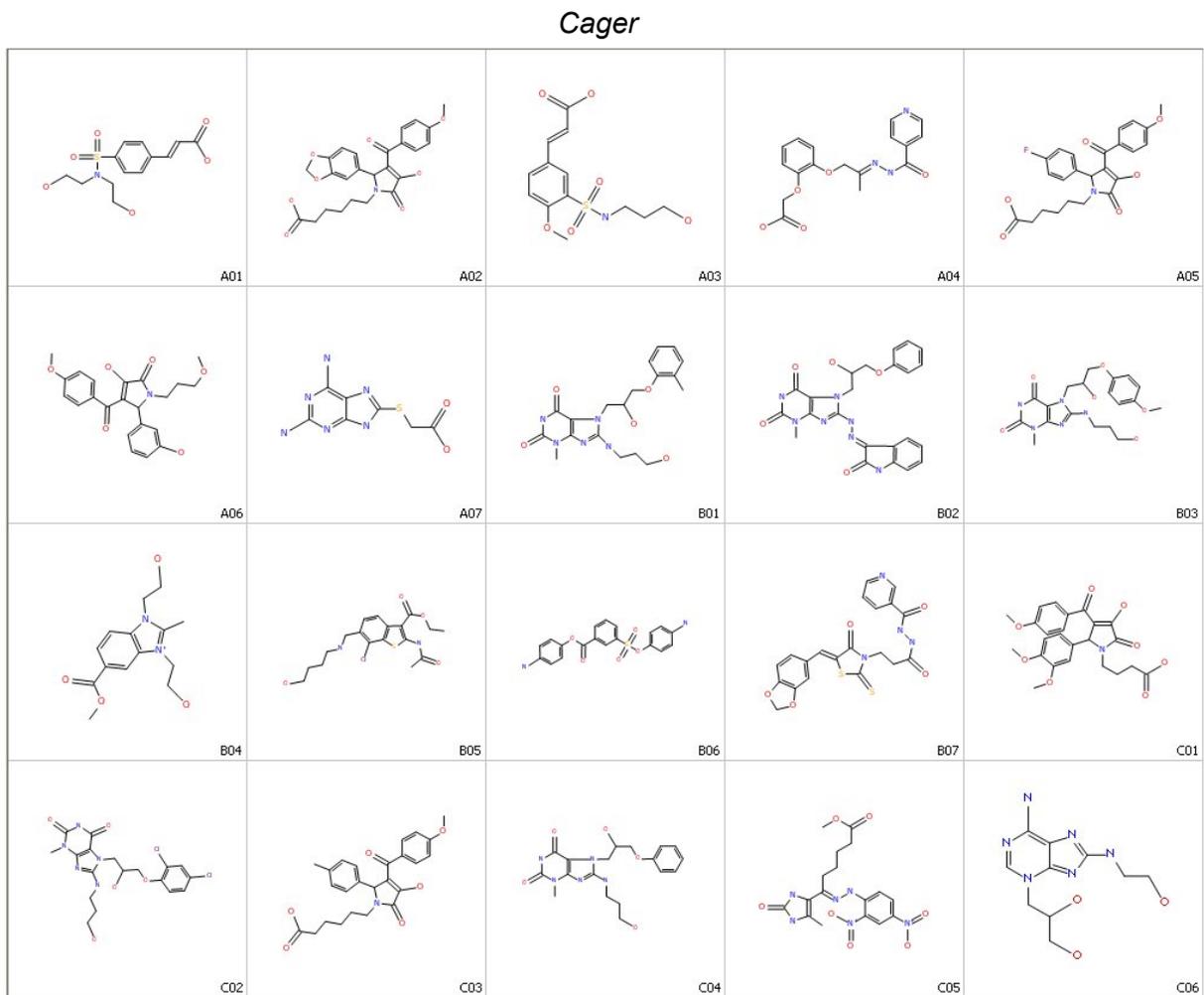
				
A01	A02	A03	A04	A05
				
B01	B02	B03	B04	B05
				
B06	B07	C01	C02	C03
				
C04	C05	C06	C07	C08
				
C09	C10	D01	D02	D03
				
D06	D07	D08	D09	D10
				
E01	E02	E03		

Abb. 5.5 Potentielle Taspase1-Inhibitoren für *chloride hole*

Potentielle *Cager* für Taspase1Abb. 5.6 Potentielle Taspase1-*Cager*

Die aufgeführten potentiellen Taspase1-Inhibitoren, die vom Homologiemodell abgeleitet wurden und die potentiellen Taspase1-Inhibitoren für *deep hole* und *chloride hole* wurden von der Firma „Asinex“ bezogen und mit einer Konzentration von 10 mM, gelöst in DMSO eingesetzt.

Potentielle Taspase1-Inhibitoren in Form von Peptidomimetika

Name	Aminosäuresequenz	Bezugsquelle
MWG6	SAEQVDGADKLSTS	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie, Universitätsmedizin Charité Berlin
MWG7	PKISQLDGVDGGTES	Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie, Universitätsmedizin Charité Berlin

Die Peptidomimetika MWG6 und MWG7 wurden in verschiedenen Konzentrationen bis 200 µM als Inhibitoren eingesetzt.

Enzyme	Bezugsquelle (Firma)
DNA-Ligase	Roche
DpnI	Fa. Stratagene
Lysozym	Sigma
Pfu-Ultra™(HF) DNA-Polymerase	Stratagene
RNase-free DNase Set	Qiagen
Restriktionsendonucleasen (und Puffer)	NEB New England Biolabs
RNase	Sigma
T4-DNA-Ligase	NEB New England Biolabs

Geräte	Hersteller
Brutschränke	Heraeus
Elisa-Reader MR5000	Dynatech
Geltrockner	Fröbel
Gene Quant RNA/DNA-Calculator	Pharmacia
PCR-Geräte	PE Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab
Rotationsschüttler	Infors
Speed Vac Concentrator	Heraeus
Spectralphotometer Hitachi 2000 Colora	Hitachi
Steril-Gard Hood (LaminAir HB2427)	Heraeus
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonoplus HD70	Bandelin
UV-Schirm (TFX-20M)	Life Technologies
Vortex2 Genie	Scientific Industries
Waage LC 4200 S	Sartorius
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge J2-HS	Beckmann
Zentrifuge J6-HC	Beckmann

Kits	Bezugsquelle (Firma)
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Big Dye Terminator Vcycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen
Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit	Fa. Stratagene

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle (Firma)
3MM Chromatographiepapier	Whatman
Vivaspin 10.000 MWCO PES Säulchen	Sartorius

5.1.2 Allgemeine Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
10x Pfu-Ultra™(HF)-Reaktionspuffer		Fa. Stratagene
2x 2CL-Puffer	200 mM 10 mM 40 mM 20% 10 mM	Hepes/KOH (pH 7,9) MgCl ₂ KCl Saccharose DTT
2x 2CL-Puffer ohne Cl	10 mM 1 mM 20 mM 10% 1 mM	Hepes/KOH (pH 7,9) MgSO ₄ K ₂ SO ₄ Saccharose DTT
2x Lämmli-puffer	100 mM 200 mM 4% 20% 0,2%	Tris/HCl pH 6,8 DTT SDS Glycerin Bromphenolblau
2x Taspase-Cleavage-Puffer	200 mM 10 mM 40 mM 20% 10 mM	Hepes/KOH pH 7,9 MgCl ₂ KCl Saccharose DTT
CaCl ₂ -Transformationspuffer	1 M 1 M 1 M	Tris MgCl ₂ CaCl ₂
Lysispuffer (pH 8,0 mit NaOH)	50 mM 300 mM 10 mM 10 mg/ml	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol Lysozym
Waschpuffer (pH 8,0 mit NaOH)	50 mM 300 mM 25 mM	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol
Elutionspuffer (pH 8,0 mit NaOH)	50 mM 300 mM 250 mM	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol

5.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die für Klonierungen, Sequenzierungen oder PCR-Analysen verwendeten Oligonukleotide sind im Folgenden aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden in Auftragsarbeit von den Firmen Pharmacia oder Biospring hergestellt.

Name	SEQUENZ
Taspase1/2-3	5'-CAAATGCAGGAATGGGATCT-3'
Taspase1/2-5	5'-GGCAAGGAAAGGTGAACTGA-3'
Tasp*3	5'-ATGACCATGGAGAAGGGGATGAG-3'
Tasp*5	5'-GTTCACTGGGCTCTCCAGGCGGCA-3'
DGVDD-Linker*3	5'-GATCCGAAAATGAGCCAGCTTGATGG-3'
DGVDD-Linker*5	5'-GATCCGTATCGCTCTCCGTGCCATCA-3'
TetB 5	5'-AAGCGCTCATGAGCCCGAAG-3'
pET-T7term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
Taspase-Ndel*3	5'-GGAATTCCATATGACCATGGAGAAGG-3'
Taspase-XhoI*5	5'-CCGCTCGAGGTTCACTGGGCTCTCCA-3'
T7-Primer	5'-TTAATACGACTCACTATAGG-3'
A-3	5'-CGAATTCCATATGTATCCCCGTGCGAGTGCC-3'
A-5	5'-GCGGATCCAGCTGATCTCTTGCCCTCGCTTC-3'
B-3	5'-CGAATTCCATATGGATGAAGACGACTTATACTATTAC-3'
B-5	5'-GCGGATCCTTTTGAAGATCACACTGTTCTCC-3'
C-3	5'-CGAATTCCATATGGATACTAGTGTACAGCCACAAC-3'
C-5	5'-GCGGATCCCTTAGTGACATGTTCTTTCTCC-3'
CS1BCS2*3	5'-GAATTCCATATGGGACAGGTGATGGGGCC-3'
CS1BCS2*5	5'-CACGGATCCCTCTGTCCCATCATCAACACC-3'
MLL4*3	5'-CGGGATCCGGACTGAGTGCTGCTGACCTGG-3'
MLL4*5	5'-CGGAATTCGAGTGACTCCTCTCTAGGGCC-3'
TF2AA*3	5'-GCGGATCCGTACAAGCTCCTGTTATACAGC-3'
TF2AA*5	5'-CGGAATTCGCCATCCTTGAGATGAAATTTCC-3'
DYRK3*3	5'-GCGGATCCAGGTTGGGGGATGGTGTCTATG-3'
DYRK3*5	5'-CGGAATTCGAATAACTCCATGTCTTTTCTTGG-3'
NXF2*3	5'-GCGGATCCAAGTTGAAGCCAGGCCAAATGG-3'
NXF2*5	5'-CGGAATTCCTGTTGCGGATAACTCCG-3'
IPPK*3	5'-GCGGATCCCTCGGGCCTCAGGGCCCGCG-3'
IPPK*5	5'-CGGAATTCAGGTCAAGTCCAGCACAGACACG-3'
DOT1L*3	5'-GCGGATCCCCCAGGAAAGGCTTTCCCG-3'
DOT1L*5	5'-CGGAATTCGGTTGGCCTGCAGGGACATGG-3'
MLL3*3	5'-CCCAAGCTTTACTTAGTTCATCCTCGGCTCC-3'
MLL3*5	5'-CGGAATTCGAAGGCCATTCATGAGAGGCATCC-3'
MTA70*3	5'-CCCAAGCTTCAGGTCACTGGTTGAACCATGGGAAGG-3'
MTA70*5	5'-CGGAATTCATAAATTCTTAGGTTTAGAGATGATCC-3'
ZYM3*3	5'-GCGGATCCCATTGCTGTGAGGACTTCAAGCG-3'
ZYM3*5	5'-CGGAATTCGTTCAGGAGGCTCTCGGGC-3'
UBE3C*3	5'-GCGGATCCGGCTATAGAGACAGAAAACAGC-3'
UBE3C*5	5'-CGGAATTCATACCCATTGTGAATCATGTAGTG-3'
GEX*3	5'-GGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACG-3'
GEX*5	5'-GCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCCG-3'
Tasp.F98A-3'	5'-CTTGAGGATTCTCCTGCTACAAATGCAGGAATG-3'
Tasp.F98A-5'	5'-CATTCTGCATTTGTAGCAGGAGAATCCTCAAG-3'
Tasp.T234D-3'	5'-CAGGCACTTTGGACGACGTAGGCGCTGTGG-3'
Tasp.T234D-5'	5'-CCACAGCGCCTACGTCGTCCAAAGTGCCTG-3'

Tasp.S252D-3'	5'-GCTGCTGCTGTCTCCGATGGAGGCTTGGCC-3'
Tasp.S252D-5'	5'-GGCCAAGCCTCCATCGGAGACAGCAGCAGC-3'
2CL-D7G-3'	5'-GGATGGGGCCGATGGCTTAAGCACTTCAG-3'
2CL-D7G-5'	5'-CTGAAGTGCTTAAGCCATCGGCCCATCC-3'
2CL-D7H-3'	5'-GGATGGTGTGATGGTGGGACAGAGAG-3'
2CL-D7H-5'	5'-CTCTCTGTCCCACCATCAACACCATCC-3'
2CL-NdeI*3	5'-GGAATTCCATATGAGGAGGTATCCCCGTCGCAGTGCCCCG-3'
2CL-XhoI*5	5'-CCGCTCGAGAACAGAACTCTTAGTGACATGTTCTTTC-3'
2CL-B- NdeI*3	5'-GGAATTCCATATGGGGGCCGATGACTTAAGCACTTCAGAT-3'
2CL-B-XhoI*5	5'-CCGCTCGAGATCCAACACTGTGAGATTTTTGGAAGATC-3'
2CL-CS1BCS2-NdeI*3	5'-GGAATTCCATATGCAGGTGGATGGGGCCGATGACTTAAG-3'
2CL-CS1BCS2-XhoI*5	5'-CCGCTCGAGATCATCAACACCATCCAACACTGTGAGA-3'
2CL-EcoRI*3	5'-CCGGAATTCAGGAGGTATCCCCGTCGCAGTGCCCCGTGC-3'
2CL-A53V*3	5'-CAGGTGGATGGGGTTGATGACTTAAGC-3'
2CL-A53V*5	5'-GCTTAAGTCATCAACCCCATCCACCTG-3'
2CL-V105A*3	5'-CAGTTGGATGGTGCCGATGATGGGACAG-3'
2CL-V105A*5	5'-CTGTCCCATCATCGGCACCATCCAACACTG-3'
D7K-CS1*3	5'-GGATGGGGCCGATAAGTTAAGCACTTCAG-3'
D7K-CS1*5	5'-CTGAAGTGCTTAACCTTATCGGCCCATCC-3'
D7K-CS2*3	5'-GGATGGTGTGATAAGGGGACAGAGAG-3'
D7K-CS2*5	5'-CTCTCTGTCCCCTTATCAACACCATCC-3'
AKNA*3	5'-GCGGATCCATGGCCAGCTCGGAGACTGAGATC-3'
AKNA*5	5'-CGGAATTCGTTTCCATGGCCTTCCAAGCTGAG-3'
CHD3*3	5'-GCGGATCCCACATTCATTGTCTAAACCCTCCCC-3'
CHD3*5	5'-CGGAATTCATTCTTCCGCTGGTAGTTTTCGATAC-3'
EVI5*3	5'-GCGGATCCATTGCAACAAGGATATTTGATATCT-3'
EVI5*5	5'-CGGAATTCGCGCTGTTTTAAAAGTCTATTTTC-3'
SOX10*3	5'-GCGGATCCATGGCGGAGGAGCAGGACCTATC-3'
SOX10*5	5'-CGGAATTCACACCATGAAGGCGTTCATGG-3'
TF2AY*3	5'-GCGGATCCATTCTTAAAAATAGGATGTATGGATG-3'
TF2AY*5	5'-CGGAATTCCTTATTATCACTACTGTTTGTGG-3'
APC*3	5'-GCGGATCCGATGACAATAAAGCAGAGGAAG-3'
APC*5	5'-CGGAATTCCTTCAAATTCTGTTTCTTTGAATC-3'
ATRX*3	5'-GCGGATCCCAGAAAAATTGAGAGAGGTGAT-3'
ATRX*5	5'-CGGAATTCAGTTTGTACACAAAAGAAGACTG-3'
IFIH1*3	5'-GCGGATCCGTAAGAGAGCTACTAAAAGGATTGTG-3'
IFIH1*5	5'-CGGAATTCGACACTTCTTCTGCCAAACCTTG-3'
2CL-EcoRI*3 neu	5'-CCGGAATTCAGGAGGTATCCCCGTCGCAGTGCCCCGTGC-3'
NdeI-CS1-D7G*3	5'-GGAATTCCATATGGAAGGACAGGTGGATGGGGCCGATGG-3'
NdeI-CS1-D7K*3	5'-GGAATTCCATATGGAAGGACAGGTGGATGGGGCCGATAA-3'
XhoI-CS2-D7G*5	5'-CCGCTCGAGACTCTCTGTCCCCCATCAACACCATC-3'
XhoI-CS2-D7K*5	5'-CCGCTCGAGACTCTCTGTCCCCTTATCAACACCATC-3'
NdeI-CS1-D7G*3	5'-GGAATTCCATATGAAGGACAGGTGGATGGGGCCGATGGG-3'
NdeI-CS1-D7K*3	5'-GGAATTCCATATGAAGGACAGGTGGATGGGGCCGATAAG-3'

5.1.4 Verwendete Organismen

Bakterienstämme	Genotyp
BL21*DE3	deficient in lon and ompT proteases; λ DE3 (lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5), F ⁻ , dcm, ompT, hsdS(r ⁻ B, m ⁻ B), galRNaseE (rne131) mutant
DH5 α	F', thi-1,(lacU169), (F':proAB+,lacIq)
Top10F+	F' (tet ^r), mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80 delta lac Δ M15, Δ lacX74deoR, recA1, araD139, Δ (ara, leu) 7697, galU, galK, λ ⁻ , rpSL (str ^r) endA1, nupG
W3110	F-, lacIq, lacP L8, ampC::[λ] cl+; ATCC no. 55151

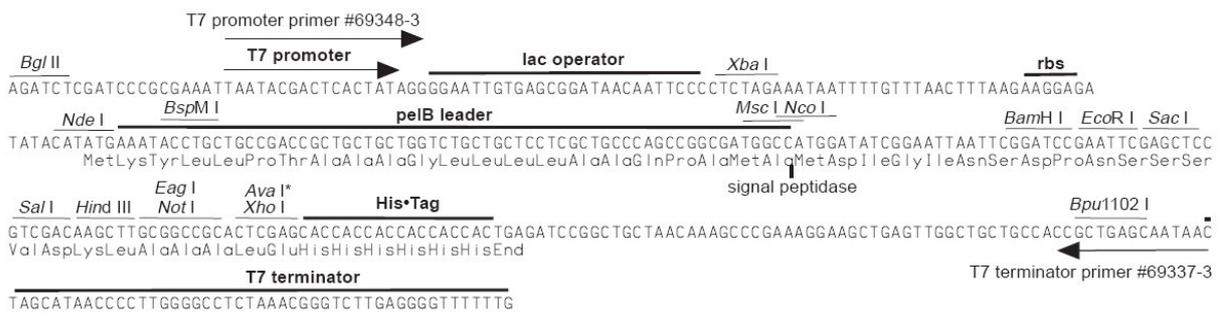
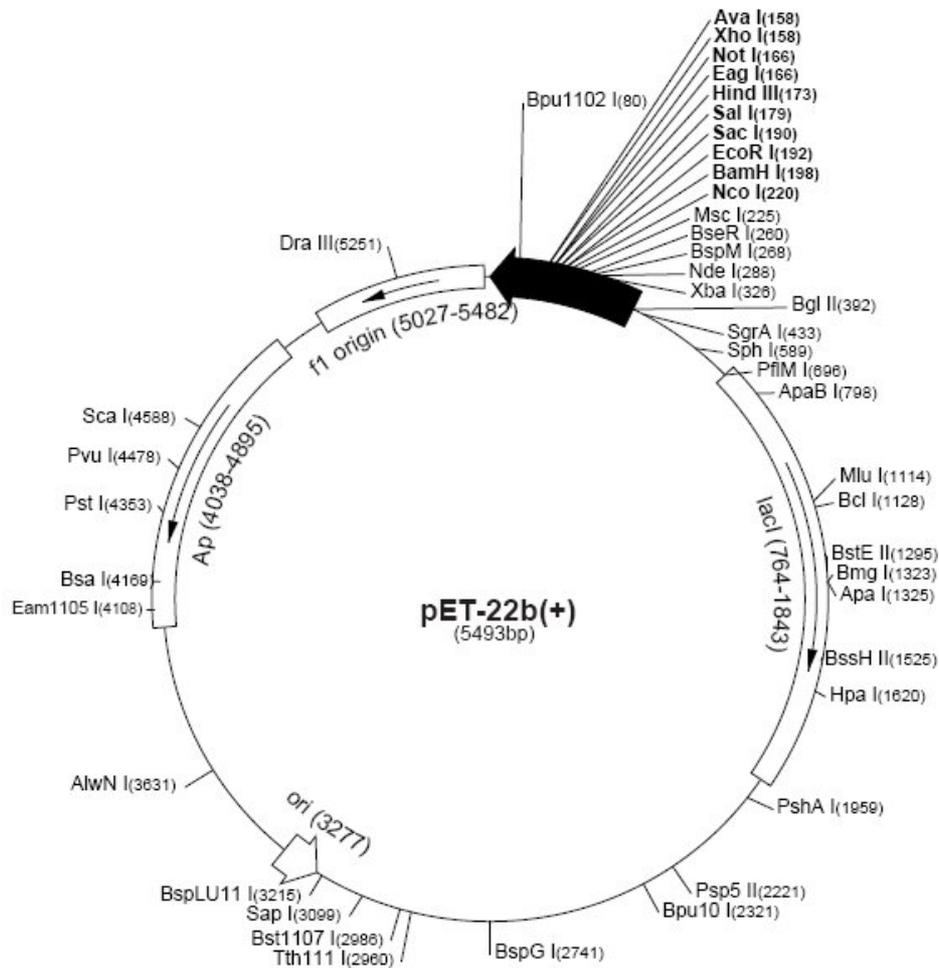
Medien für E.coli	Zusammensetzung
YT-Medium (für <i>E.coli</i>)	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% Natriumchlorid
YT ^{Amp} -Medium (für <i>E.coli</i>)	100 μ g/ml Ampicillin YT-Medium
YT-Agar (für <i>E.coli</i>)	1,2% Agar YT-Medium

Zell-Linie	Zelltyp	Medium	Referenz
293	293 ist eine humane embryonale Nierenzelllinie mit beinahe triploidem Karyotype und 6% Polyploidie; 69(64-69)XX?X, +1, +6, -10, -13, -16, -18, -20, +21, +22, +mar,add(?X)(p22),inv(1)(p35q43),del(1)(p35),i(5p),del(6)(q11),-3'add(8)(q24),add(13)(p13),add(17)(qter),der(?)t(5;?)(q13;?)-3'293T ist eine Derivatzelllinie von 293 in die ein temperatursensitives Gen für das SV40 T-antigen transfiziert wurde.	DMEM	Graham, 1977)
SEM	Humane lymphoblastische Leukämie mit RPMI1640 und einer Translokation t(4;11) CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20 ⁻ , CD22 ⁺ , CD24 ⁻ , CD33 ⁺ , CDw65 ⁺ , CDw75 ⁺	DMEM	(Greil, 1994)

Die Kultivierung aller Säugerzelllinien erfolgte bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C. Alle Nährmedien wurden mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin supplementiert.

5.1.5 Vektoren und Plasmide

pET22b+ (Novagen) Bakterieller Expressionsvektor



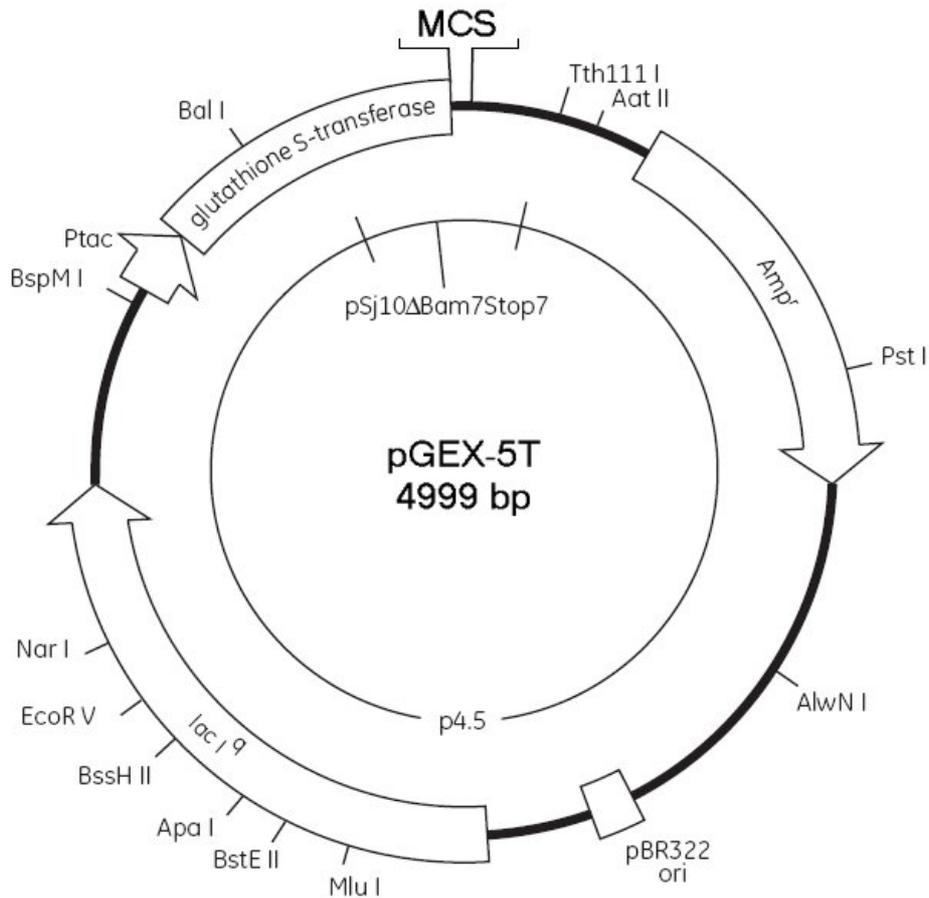
pET-22b(+) cloning/expression region

pET22b+-Taspase

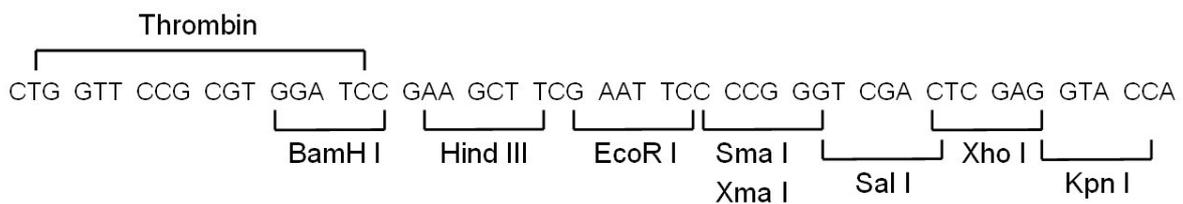
Bakterieller Expressionsvektor für ein 6xHis-Tag-Fusionsprotein mit Taspase1. PCR-Fragment aus einer Reaktion von Taspase-NdeI*3 und Taspase-XhoI*5 mit cDNA aus SEM-Zellen. Mit NdeI und XhoI geschnitten und in pET22b+ kloniert.

pGEX5T

Bakterieller Expressionsvektor für die Herstellung N-terminal 6xHis-GST-markierter Fusionsproteine. (Berthold, 1992)



MCS:



pGEX5T-2CL

Bakterieller Expressionsvektor für ein 6xHis-GST-markiertes Fusionsprotein mit dem MLL-Fragment 2CL (Aminosäuren 2.650-2.808), das die beiden Taspase1-Erkennungssequenzen DGVDD und DGADD enthält. PCR-Fragment aus Reaktion von 2CL-EcoR I*3 neu und 2CL-Xho I*5 mit pUHD3-4-MLL. Mit EcoR I und Xho I geschnitten und in pGEX5T kloniert.

5.2 Standardmethoden

5.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die folgenden Standard-Methoden sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, den bereits genannten Protokollsammlungen entnommen (*Molecular Cloning* von Sambrook 2. Auflage, 1989) und werden nicht ausführlich vorgestellt:

- Gelelektrophoresen (DNA und Protein)
- Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol (GibcoBRL) und RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Qiagen)
- DNase Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen)
- Minilysat Präparation von Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse
- Fällungsmethoden für Nukleinsäuren
- Ligationsreaktionen
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford oder BCA)
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- PCR Analysen
- Herstellung von CaCl₂- kompetenten *E.coli* Bakterien
- Transformation von *E.coli* mit CaCl₂
- Protein-Induktionskinetik in *E.coli*

5.3 Nukleinsäuretechniken

5.3.1 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Eventuelle gDNA-Verunreinigungen wurden vorher durch DNase I-Verdau entfernt. Der Ansatz wurde mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 7 µl aufgefüllt. Die RNA wurde zusammen mit 1 µl pd(N)₆ Hexamer Primer (100 pmol) für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurde 1 µl RNasin (Promega 40 U/µl), 5X Superscript-Puffer, 4 µl 2,5 mM dNTPs, 2 µl 100 mM DTT pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl Superscript-Reverse Transkriptase (Invitrogen 200 U/µl) bei 42°C 1 h inkubiert. Zuletzt wurde mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und die Reaktion durch Inkubation (10 Minuten bei 70°C), gestoppt.

5.3.2 Primergerichtete Doppelstrangmutagenese

Für die primergerichtete Doppelstrangmutagenese wurde das Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Das Protokoll wurde geringfügig abgewandelt:

Anders als im Protokoll vorgeschlagen wurde keine Kontrollreaktion angesetzt. Stattdessen wurden die mutierten Plasmide direkt in *E.coli*-Top10F+ transformiert und anschließend einer Sequenz-Analyse unterzogen.

5.3.3 Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Die Reaktion erfolgte entsprechend der Hersteller-Anleitung nach der Kettenterminationsmethode. Sie ermöglicht eine auf unterschiedlichen Fluoreszenz-Signalen basierende Sequenzierung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer.

5.4 Proteintechniken

5.4.1 Proteinaufreinigung durch native Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Die rekombinante Expression aller Proteine wurde in einer 250 ml Bakterienkultur der OD = 0,7 mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C induziert. Bakterien wurden mit 4.000xg, bei 4°C für 10 min pelletiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Inkubation der Bakterienpellets mit 5 ml Lysispuffer. Durch Zentrifugation mit 14.000xg, bei 4°C für 20 min wurden unlösliche Bestandteile vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde an eine Nickelchelate-Affinitätschromatographiesäule (Durchmesser 1 cm, 1 ml Nickelagarose (Sigma)) gebunden, zweimal mit Waschpuffer gewaschen und in drei 500 µl Fraktionen mit Elutionspuffer eluiert.

5.4.2 Umpuffern nativ aufgereinigter Proteinen

Nativ aufgereinigte Proteine wurden mit Hilfe von „Vivaspin 10.000 MWCO PES Säulchen“ umpuffert. Die Proteinproben wurden dazu bei 12.000xg und 4°C auf ein Volumen von 200 µl eingengt und anschließend um den Faktor 10, auf 2 ml mit dem nativen 2x2CL-Puffer aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde in der Regel zweimal durchgeführt.

5.4.3 Ermittlung der Aktivität von Taspase1

5.4.3.1 Taspase1-Aktivitätsassay

Zur Ermittlung der Taspase1-Aktivität wurden 2 µl des Taspase1-Substrates 2CL [30 bis 50 µM] zusammen mit 1 µl, nativ aufgereinigter Taspase1 [30 bis 50 µM] für 30 min bei 37°C inkubiert. Die übrigen Bestandteile des Assays waren: 10 µl 2x Taspase-Cleavage-Puffer, 2 µl 100 mM DTT und 5 µl H₂O. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schnittprodukte wenn nichts anderes erwähnt mit Hilfe eines 12% SDS-PAGE analysiert.

5.4.3.2 Taspase1-2CL-Inhibierungsassay

Im Taspase1-2CL-Standard-Inhibierungsassay wurde zuerst 1 µl nativ aufgereinigte Taspase1 [30 bis 50 µM] für 30 min bei 37°C zusammen mit 2 µl eines zu testenden, potentiellen Taspase1-Inhibitors [1 mM bis 0,4 µM], 2 µl 100 mM DTT und 3 µl H₂O inkubiert. Danach wurden 2 µl des Taspase1-Substrates 2CL [30 bis 50 µM], das in 8 µl 2x Taspase-Cleavage-Puffer aufgenommen war, zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schnittprodukte wenn nichts anderes erwähnt, mit Hilfe eines 12% SDS-PAGE analysiert.

6 Abkürzungen

2CL	MLL-Proteinfragment, 50 AS N- und C-terminal der beiden Taspase1- <i>Cleavage sites</i> CS1 und CS2
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Ampicilin
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CS1	<i>cleavagesite</i> 1
CS2	<i>cleavagesite</i> 2
der4	Derivat 4
der11	Derivat 11
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (kann Adenosin, Thymidin, Guanodin oder Cytosin bedeuten).
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	molar
MCS	Multiple cloning site
MEF	Embryonale Mausfibroblasten (<i>Mouse Embryonal Fibroblasts</i>)
min	Minute
mol	Mol
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> , offener Leserahmen
RNA	<i>Ribonucleic-acid</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

7 Literaturverzeichnis

- Aravind, L. and Landsman, D.: AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **26** (1998) 4413-21.
- Ayton, P., Sneddon, S.F., Palmer, D.B., Rosewell, I.R., Owen, M.J., Young, B., Presley, R. and Subramanian, V.: Truncation of the Mll gene in exon 5 by gene targeting leads to early preimplantation lethality of homozygous embryos. *Genesis* **30** (2001) 201-12.
- Bartram, C.R., Anger, B., Carbonell, F. and Kleihauer, E.: Involvement of chromosome 9 in variant Ph1 translocation. *Leuk Res* **9** (1985) 1133-7.
- Berthold, H., Frorath, B., Scanarini, M., Abney, C., Ernst, B. and Northemann, W.: Plasmid pGEX-5T an alternative System for Expression and Purification of recombinant Proteins. *Biotechnical letters* **14**, (4) (1992) 245-250.
- Bitoun, E., Oliver, P.L. and Davies, K.E.: The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* **16** (2007) 92-106.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. and Goldstein, J.L.: Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100** (2000) 391-8.
- Bursen, A., Moritz, S., Gaussmann, A., Moritz, S., Dingermann, T. and Marschalek, R.: Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* **23** (2004) 6237-49.
- Chen, C.S., Hilden, J.M., Frestedt, J., Domer, P.H., Moore, R., Korsmeyer, S.J. and Kersey, J.H.: The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia. *Blood* **82** (1993b) 1080-5.
- Chen, C.S., Sorensen, P.H., Domer, P.H., Reaman, G.H., Korsmeyer, S.J., Heerema, N.A., Hammond, G.D. and Kersey, J.H.: Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* **81** (1993a) 2386-93.
- Dimartino, J.F. and Cleary, M.L.: Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* **106** (1999) 614-26.
- Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B.D. and Evans, G.A.: A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* **2** (1992) 113-8.
- Faundez, V. and Hartzell, H.C.: Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci STKE* 2004 (2004) re8.
- Felix, C.A., Hosler, M.R., Slater, D.J., Megonigal, M.D., Lovett, B.D., Williams, T.M., Nowell, P.C., Spinner, N.B., Owens, N.L., Hoxie, J., Croce, C.M., Lange, B.J. and Rappaport, E.F.: Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Mol Diagn* **4** (1999) 269-83.

- Felix, C.A., Hosler, M.R., Winick, N.J., Masterson, M., Wilson, A.E. and Lange, B.J.: ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* **85** (1995) 3250-6.
- Fidanza, V., Melotti, P., Yano, T., Nakamura, T., Bradley, A., Canaani, E., Calabretta, B. and Croce, C.M.: Double knockout of the ALL-1 gene blocks hematopoietic differentiation in vitro. *Cancer Res* **56** (1996) 1179-83.
- Frestedt, J.L., Hilden, J.M., Moore, R.O. and Kersey, J.H.: Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genet Anal* **12** (1996) 147-9.
- Gaussmann, A., Wenger, T., Eberle, I., Bursen, A., Bracharz, S., Herr, I., Dingermann, T. and Marschalek, R.: Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* **26** (2007) 3352-63.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36** (1977) 59-74.
- Greil, J., Gramatzki, M., Burger, R., Marschalek, R., Peltner, M., Trautmann, U., Hansen-Hagge, T.E., Bartram, C.R., Fey, G.H., Stehr, K. and et al.: The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol* **86** (1994) 275-83.
- Gu, Y., Nakamura, T., Alder, H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C.M. and Canaani, E.: 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** (1992) 701-8.
- Guenther, M.G., Jenner, R.G., Chevalier, B., Nakamura, T., Croce, C.M., Canaani, E. and Young, R.A.: Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005) 8603-8.
- Gurney, J.G., Ross, J.A., Wall, D.A., Bleyer, W.A., Severson, R.K. and Robison, L.L.: Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* **19** (1997) 428-32.
- Hoiby, T., Mitsiou, D.J., Zhou, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Stunnenberg, H.G.: Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA. *Embo J* **23** (2004) 3083-91.
- Hsieh, J.J., Cheng, E.H. and Korsmeyer, S.J.: Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115** (2003) 293-303.
- Isnard, P., Core, N., Naquet, P. and Djabali, M.: Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* **96** (2000) 705-10.
- Johansson, B., Moorman, A.V., Haas, O.A., Watmore, A.E., Cheung, K.L., Swanton, S. and Secker-Walker, L.M.: Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* **12** (1998) 779-87.
- Julien, E. and Herr, W.: Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *Embo J* **22** (2003) 2360-9.

- Khan, J.A., Dunn, B.M. and Tong, L.: Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL. *Structure* **13** (2005) 1443-52.
- Kobayashi, N., Boyer, T.G. and Berk, A.J.: A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIIID-promoter complex assembly. *Mol Cell Biol* **15** (1995) 6465-73.
- Kuzin, B., Tillib, S., Sedkov, Y., Mizrokhi, L. and Mazo, A.: The *Drosophila trithorax* gene encodes a chromosomal protein and directly regulates the region-specific homeotic gene fork head. *Genes Dev* **8** (1994) 2478-90.
- Lieberman, P.: Identification of functional targets of the Zta transcriptional activator by formation of stable preinitiation complex intermediates. *Mol Cell Biol* **14** (1994) 8365-75.
- Look, A.T.: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278** (1997) 1059-64.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R.: Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268** (1995) 533-9.
- Marschalek, R., Nilson, I., Lochner, K., Greim, R., Siegler, G., Greil, J., Beck, J.D. and Fey, G.H.: The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* **27** (1997) 417-28.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D. and Hess, J.L.: MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10** (2002) 1107-17.
- Milne, T.A., Hughes, C.M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepf, R.W., Krankel, C., Livolsi, V.A., Gibbs, D., Hua, X., Roeder, R.G., Meyerson, M. and Hess, J.L.: Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005) 749-54.
- Mitelman, F.: Chromosomes, genes, and cancer. *CA Cancer J Clin* **44** (1994) 133-5.
- Nakamura, T., Alder, H., Gu, Y., Prasad, R., Canaani, O., Kamada, N., Gale, R.P., Lange, B., Crist, W.M., Nowell, P.C. and et al.: Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993) 4631-5.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M. and Canaani, E.: ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10** (2002) 1119-28.
- Nilson, I., Lochner, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J.D., Fey, G.H. and Marschalek, R.: Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* **93** (1996) 966-72.
- Nilson, I., Reichel, M., Ennas, M.G., Greim, R., Knorr, C., Siegler, G., Greil, J., Fey, G.H. and Marschalek, R.: Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* **98** (1997) 157-69.

- Paro, R.: Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr Opin Cell Biol* **5** (1993) 999-1005.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M. and Mazo, A.: Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* **294** (2001) 1331-4.
- Rabbitts, T.H.: Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372** (1994) 143-9.
- Rasio, D., Schichman, S.A., Negrini, M., Canaani, E. and Croce, C.M.: Complete exon structure of the ALL1 gene. *Cancer Res* **56** (1996) 1766-9.
- Reaman, G.H., Sposto, R., Sensel, M.G., Lange, B.J., Feusner, J.H., Heerema, N.A., Leonard, M., Holmes, E.J., Sather, H.N., Pendergrass, T.W., Johnstone, H.S., O'Brien, R.T., Steinherz, P.G., Zeltzer, P.M., Gaynon, P.S., Trigg, M.E. and Uckun, F.M.: Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* **17** (1999) 445-55.
- Reichel, M., Gillert, E., Angermuller, S., Hensel, J.P., Heidel, F., Lode, M., Leis, T., Biondi, A., Haas, O.A., Strehl, S., Panzer-Grumayer, E.R., Griesinger, F., Beck, J.D., Greil, J., Fey, G.H., Uckun, F.M. and Marschalek, R.: Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* **20** (2001) 2900-7.
- Ross, J.A.: Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Cancer Suppl* **11** (1998) 26-8.
- Rowley, J.D.: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243** (1973) 290-3.
- Rowley, J.D.: The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* **32** (1998) 495-519.
- Rubnitz, J.E., Behm, F.G., Curcio-Brint, A.M., Pinheiro, R.P., Carroll, A.J., Raimondi, S.C., Shurtleff, S.A. and Downing, J.R.: Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. *Blood* **87** (1996) 4804-8.
- Takeda, S., Chen, D.Y., Westergard, T.D., Fisher, J.K., Rubens, J.A., Sasagawa, S., Kan, J.T., Korsmeyer, S.J., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J.: Proteolysis of MLL family proteins is essential for *taspase1*-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* **20** (2006) 2397-409.
- Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D. and Zhang, D.E.: Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90** (1997) 489-519.
- Terranova, R., Agherbi, H., Boned, A., Meresse, S. and Djabali, M.: Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (2006) 6629-34.
- Teyssier, J.R., Bartram, C.R., Deville, J., Potron, G. and Pigeon, F.: *c-abl* Oncogene and chromosome 22 "bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **312** (1985) 1393-4.

- Thirman, M.J., Gill, H.J., Burnett, R.C., Mbangkollo, D., McCabe, N.R., Kobayashi, H., Ziemins-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., Sandberg, A.A. and et al.: Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* **329** (1993) 909-14.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y.: Caspases: enemies within. *Science* **281** (1998) 1312-6.
- Tkachuk, D.C., Kohler, S. and Cleary, M.L.: Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71** (1992) 691-700.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G.: The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* **13** (1994) 3822-31.
- Van den Berghe, H., David, G., Broeckaert-Van Orshoven, A., Louwagie, A., Verwilghen, R., Casteels-Van Daele, M., Eggermont, E. and Eeckels, R.: A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum Genet* **46** (1979) 173-80.
- Werner, M.: Kartierung und Spezialisierung bislang unbekannter Regionen des AF4-Gens auf PAC-Klonen. Diplomarbeit aus dem Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg. (1999).
- Wlodawer, A.: Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. *Structure* **3** (1995) 417-20.
- Ye, Y. and Fortini, M.E.: Proteolysis and developmental signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **11** (2000) 211-21.
- Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P.M., Cleary, M.L. and Ohki, M.: Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* **100** (2002) 3710-8.
- Yu, B.D., Hanson, R.D., Hess, J.L., Horning, S.E. and 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** (1998) 10632-6.
- Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A. and Korsmeyer, S.J.: Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378** (1995) 505-8.
- Zeleznik-Le, N.J., Harden, A.M. and 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** (1994) 10610-4.
- Zhou, H., Spicuglia, S., Hsieh, J.J., Mitsiou, D.J., Hoiby, T., Veenstra, G.J., Korsmeyer, S.J. and Stunnenberg, H.G.: Uncleaved TFIIA is a substrate for *taspase 1* and active in transcription. *Mol Cell Biol* **26** (2006) 2728-35.
- Ziemins-van der Poel, S., McCabe, N.R., Gill, H.J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S.D., LeBeau, M.M., Rowley, J.D. and et al.: Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991) 10735-9.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Jens Rabenstein
 Geboren am 03.04.1975 in Frankfurt am Main
 Familienstand ledig
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung:

08/1981-06/1986 Adolf Reichwein Schule in Frankfurt am Main-Zeilsheim (Grundschule)
 07/1986-07/1992 Leibniz-Gymnasium in Frankfurt am Main-Höchst
 08/1992-07/1995 Friedrich Dessauer-Gymnasium in Frankfurt am Main (Abschluss: Abitur)

Wehrdienst:

07/1995-04/1996 Hohenbergkaserne in Horb am Neckar (Reservelazarettgruppe)

Studium:

10/1996-08/2002 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
 09/2001-10/2001 Diplomprüfung (Zell- und Entwicklungsbiologie, Genetik, Zoologie)
 10/2001-08/2002 Diplomarbeit Untersuchung zum *Sporekiller*-Phänotyp bei dem Ascomyceten *Posospora anserina*
 08/2002 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologe
 06/2003-09/2005 Technischer Assistent:
 AK Prof. Dr. R. Marschalek im Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
 10/2005-04/2008 Promotionsstudium mit dem Thema:
 Inhibierung des pathomolekularen Mechanismus einer t(4;11)-assoziierten Leukämie
 AK Prof. Dr. R. Marschalek im Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main

Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung, geduldige Anleitung und Unterstützung, seinen steten Überblick, seine Wertschätzung und für die Aufnahme in einen tollen Arbeitskreis.

Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann für seine kritischen und kreativen Diskussionsbeiträge während der Arbeitsseminare.

Herrn Professor Gisbert Schneider und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Bettina Hoffmann, Evgeni Proschak und Steffen Renner für die Erstellung der dreidimensionalen Taspase1-Modelle und die Aufklärung des Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von MLL durch Taspase1.

Frau Dr. Ilse Zündorf für die kompetente und stets erfrischende Unterstützung bei der Bewältigung des Laboralltages.

Meinen unmittelbaren Laborkollegen Ute Steiner und Miriam Jacobi für die vielen lustigen Momente im und außerhalb des S1-Bereiches und dafür, dass sie es immer wieder geschafft haben mich aufzubauen, obwohl sie selbst schon jegliche Hoffnung aufgegeben hatten.

Dr. Jürgen Zech, der mit seinem nahezu allumfassenden Wissen (die Mikrowellentauglichkeit der Verpackung für die Eiscreme „Creissimo Bourbon-Vanille“ der Marke Langnese gehört nicht dazu) für jedes Problem die passende Lösung parat hatte.

Dr. Sebastian Scharf und Sabrina Baltruschat, für die vielen lustigen Erlebnisse im Labor, die netten Kinobesuche und diverse andere Treffen.

Dr. Thanh Chung und Leif Harmsen für die Einführung in die bunte Welt der internationalen Kochkünste und meine dadurch entstandenen Bauchmuskeln, die sich im Nachhinein leider als pures Fett herausgestellt haben.

Den Mitgliedern meiner Lauf- und Kochgruppe: Ute Steiner, Miriam Jacobi, Nadine Spilger, Johanna Bles, Irina Eberle, Birgit Bless, Anne Benedikt und Hagen Witzel, weniger für die anstrengende Lauferei, aber dafür umso mehr für das leckere Essen danach.

Dr. Eric Kowitz für die anregenden Gespräche über Zucht und Haltung von Aquarienfischen, den Krallenfrosch und vor allem das Mainboard, das bis zum heutigen Tage seinen Dienst, mit der Präzision eines Schweizer Uhrwerkes, verrichtet.

Dr. Ingo Jennes (der Besorger) für sein grandioses Kirschmuffinrezept, den Dreifachtimer und alle übrigen Laborutensilien, die über dunkle Kanäle zu mir gelangt sind.

Oli Siol, für die kleinen Bootsausflüge auf dem Main und den zwar erfolglosen, dafür aber kostenlosen Wakeboardunterricht.

Dr. Monika Baik, für die vielen lustigen Badminton-Abende und die 150 selbstgebrannten CDs.

Meinen übrigen Laborgenossen Dr. Claus Meyer, Dr. Heidi Bursen, Clarissa Oehm und Karen Schley für die fachliche Unterstützung und die vielen anregenden Gespräche.

Nicht zuletzt Samane Sabini, die mir mit ihrer herzlichen und gelassenen Art den Endspurt versüßt hat.

Den TAs Silvia Brachartz, Jenny Merkens, Julia Hofmann und vor allem Freia Pfeil, die beinahe unbemerkt aber äußerst effektiv im Hintergrund dafür gesorgt haben, dass alle grundlegenden Laborbedürfnisse gedeckt waren.

Meiner Familie, die stets dafür gesorgt hat, dass ich ausgewogen ernährt, mit frisch duftender Kleidung und vor allem angemessen motorisiert von A nach B gelangen konnte.