

---

---

# **Dimerisierung der Taspase1 ist eine Voraussetzung für ihre funktionelle Aktivierung**

---

---

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Samaneh Sabiani  
aus Frankfurt am Main

**Frankfurt am Main, 2011**

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek
2. Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann

Datum der Disputation: 5.10.2011

**Meiner Familie**

---

 INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Krebs und Krebsentstehung	5
2.2	Leukämie	6
2.3	Chromosomale Translokationen	7
2.3.1	Chromosomale Translokationen allgemein	7
2.3.2	Molekulare Grundlagen der t(4;11)-Translokation	8
2.3.3	Klinisches Erscheinungsbild einer t(4;11)-Leukämie	11
2.4	Struktur und Funktion des MLL-Proteins	12
2.4.1	Funktionelle Domänen des MLL-Proteins	12
2.4.2	Aufbau und Funktion des MLL-Proteinkomplexes	14
2.5	Struktur und Funktion des AF4-Proteins	18
2.5.1	Funktionelle Domänen des AF4-Proteins	18
2.5.2	Aufbau und Funktion des AF4-Proteinkomplexes	19
2.6	Die Fusionsproteine der t(4;11)-Translokation	21
2.6.1	Die Rolle der Fusionsproteine in der Leukämogenese	21
2.6.2	Das Fusionsprotein AF4-MLL	22
2.6.3	Das Fusionsprotein MLL-AF4	24
2.7	Taspase1	26
2.7.1	Autokatalytische Aktivierung von Taspase1	26
2.7.2	Taspase1-Kristallstruktur	27
2.7.3	Aktivierung des MLL-Proteins durch Taspase1	29
2.7.4	Beitrag des Enzyms Taspase1 an einer t(4;11)-assoziierte Leukämie	31
2.8	Enzymatische Hemmung	33
2.8.1	Inhibition durch „small molecules“	33
2.8.2	Inhibition durch <i>trans</i> -dominant-negative Mutation	33
2.9	Serin-Proteasen	34
2.10	Zielsetzung der Arbeit	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Proteinaufreinigung von Taspase1 und GST-MLL für das Taspase1-Proteolyse-Assay	38
3.1.1	Affinitäts-Reinigung von Taspase1	38
3.1.2	Affinitäts-Reinigung des artifiziellen Substratproteins GST-MLL	39
3.1.3	<i>In vitro</i> Taspase1-Proteolyse-Assay	40
3.2	<i>In silico</i> Modellierung von Taspase1-Proenzym	41
3.3	Untersuchung der Bindetasche	44
3.3.1	Identifizierung und Mutation wichtiger Aminosäuren in der Bindetasche	44
3.3.2	Entdeckung einer Serin-Protease	47
3.3.3	Überprüfung eines alternativen Autokatalyse-Mechanismus	49
3.4	Untersuchung des Protein-Interfaces	50
3.4.1	Identifizierung und Mutation wichtiger Aminosäuren im Interface	50
3.5	Die Funktionsweise der Taspase1	56

---

3.5.1	Postulierter Taspase1-Aktivierungsmechanismus	56
3.5.2	Etablierung eines Testsystems zur Analyse der Dimerisierungsfähigkeit	61
<b>3.6</b>	<b>Etablierung einer <i>trans</i>-dominant-negativen Taspase1-Variante (tdnTASP1)</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Modellierung der Kristallstruktur</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Tyrosin-61 spielt eine Rolle bei der korrekten Bindung des Substrates</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Intrinsische Serin-Protease-Variante katalysiert die Autokatalyse der Taspase1</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Taspase1-Autokatalyse verläuft nicht nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus</b>	<b>71</b>
<b>4.5</b>	<b>Postulierung und Validierung des Taspase1-Aktivierungsmechanismus</b>	<b>71</b>
<b>4.6</b>	<b>Homodimerisierung zweier Taspase1-Proenzyme stellt ein Schlüsselereignis dar</b>	<b>72</b>
<b>4.7</b>	<b>Herstellung einer <i>trans</i>-dominant-negativen Taspase1-Variante</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Material</b>	<b>76</b>
5.1.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen	76
5.1.2	Allgemeine Puffer	80
5.1.3	Synthetische Oligonukleotide	82
5.1.4	Verwendete Organismen	84
5.1.5	Vektoren und Plasmide	85
5.1.6	Verwendete Antikörper	87
<b>5.2</b>	<b>Standardmethoden</b>	<b>88</b>
5.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	88
5.2.2	Primergerichtete Doppelstrangmutagenese	88
5.2.3	Sequenzanalyse	88
<b>5.3</b>	<b>Proteintechniken</b>	<b>89</b>
5.3.1	Proteinaufreinigung durch native Nickelchelate-Affinitätschromatographie	89
5.3.2	Umpuffern nativ aufgereinigter Proteine	89
5.3.3	Ermittlung der Aktivität von Taspase1	89
<b>5.4</b>	<b>Zelltransfektion</b>	<b>90</b>
<b>5.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>90</b>
5.5.1	SDS-PAGE	90
5.5.2	Färbemethoden	91
5.5.3	Western Blot	91
5.5.4	Immunopräzipitationen	92
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>106</b>

# 1 Zusammenfassung

Taspase1 ist eine Threonin-Aspartase, die das MLL-Protein an zwei konservierten Erkennungssequenzen (CS1 und CS2) hydrolysiert. Die daraus entstehenden Spaltprodukte, p320N und p180C bilden ein stabiles Heterodimer und fügen sich mit zahlreichen Proteinen zu einem Multiproteinkomplex zusammen, der die epigenetischen Prozesse während der Embryogenese, Zellzyklus und Stammzell-Wachstum steuert. Der MLL-Komplex weist eine spezifische Histon-Methyltransferase-Aktivität für Lysin-4 des Histon 3 Proteins auf (H3K4me3). Diese spezifische Aktivität hält ein Muster der aktiven Gene während der Entwicklung und Zelldifferenzierung aufrecht. Das AF4-MLL Fusionsprotein, welches durch die chromosomale Translokation t(4;11) gebildet wird, ist ebenfalls ein Substrat von Taspase1. Die Hydrolyse dieses Fusionsproteins führt ebenfalls zu Spaltprodukten, die zunächst miteinander ein Heterodimer bilden, um anschliessend einen onkogenen Multiproteinkomplex auszubilden. Dieser Komplex scheint hämatopoietische Stammzellen zu "reprogrammieren" und den Ausbruch einer lymphoblastischen Leukämie auszulösen.

Die Aktivität der Taspase1 selbst wird durch Eigen-Proteolyse reguliert. Es wird zunächst als Proenzym (p50) hergestellt, das anschliessend durch Autoproteolyse in die enzymatisch aktive Form konvertiert wird. Taspase1 ist ein enzymatisch strikt kontrolliertes Enzym mit geringer Substratanzahl. Neben MLL gibt es nur wenige, bekannte Substrate; allerdings scheint Taspase1 in den Zellen solider Tumoren überexprimiert zu sein. Daraus kann postuliert werden, dass Taspase1/MLL-Aktivität für diese Tumorarten von Bedeutung ist. Taspase1 ist die einzige bislang bekannte Protease in Säugerzellen, die dazu befähigt ist, das Leukämie-spezifische AF4-MLL proteolytisch zu spalten und damit seine onkogenen Eigenschaften zu aktivieren. Eine spezifische Inhibierung der Taspase1 könnte deshalb eine mögliche Methode zur Therapie von t(4;11)-Leukämie darstellen. Aus diesem Grund war Taspase1 als ein potentielles Wirkstoffziel interessant und wurde im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

Um die Funktionsweise von Taspase1 zu untersuchen, wurde die 2005 veröffentlichte Kristallstruktur der Taspase1 als Grundlage für alle weiteren Arbeiten verwendet. Da die Struktur allerdings nur unvollständig aufgelöst war, wurden die unaufgelösten Bereiche mittels bioinformatischer Tools in Kooperation mit Tim Geppert (Arbeitskreis von Prof. Dr.

Gisbert Schneider) modelliert. Die Modellierung führte zu einem detaillierteren Modell des Taspase1-Proenzym, also dem Zustand vor der autokatalytischen Aktivierung.

Taspase1 weist interessanterweise nur Homologien zu L-Asparinasen-2 (Familie der Hydrolasen), darunter Glycosylasparaginase, auf. Glycosylasparaginase durchläuft ebenfalls einen Autokatalyse-Prozess, allerdings nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus. Daher wurde Taspase1 zunächst anhand geeigneter Experimente daraufhin überprüft, ob hier ebenso ein solcher Mechanismus für die Autokatalyse in Betracht kommt. Allerdings widerlegten die durchgeführten Experimente diese Vermutung.

Um die molekulare Funktionsweise der Taspase1 zu eruieren, wurde nun das modellierte Taspase1-Proenzym verwendet. Dies erlaubte die Identifizierung von kritischen Aminosäuren. Durch Mutationsanalysen konnte so die Funktion von Taspase1 aufgeklärt werden. So wurde ein intrinsischer Serin-Protease-Mechanismus für den Prozess der Autokatalyse entdeckt. Dabei spielt Serin-291 - unmittelbar in der Nähe des katalytischen Zentrums - eine wesentliche Rolle.

Anhand weiterer Mutationsanalysen konnte dann schrittweise der Aktivierungsmechanismus von Taspase1 aufgeklärt werden. Dabei scheint die Homodimerisierung zweier Taspase1-Proenzyme der wesentliche Schlüssel für die vollständige Aktivierung der Taspase1 zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aminosäuren Tryptophan-173, Arginin-262, und Glutaminsäure-295 als kritische Aminosäuren identifiziert.

Weiterhin konnte anhand der funktionellen Analyse aller Mutanten zuletzt eine *trans*-dominant-negative Taspase1-Variante (C163E-S291A; tdn-TASP1) hergestellt werden. Das proenzymatische Monomer dieser Mutante ist dabei befähigt, mit einem Wildtyp-Taspase1-Monomer zu heterodimerisieren und seine Aktivität vollständig zu inhibieren. Die Funktion dieser *trans*-dominant-negativen Mutante validierte den in dieser Arbeit postulierten Aktivierungsmechanismus der Taspase1, der nun zukünftig für ein rationales Wirkstoff-Design verwendet werden kann.

## 2 Einleitung

### 2.1 Krebs und Krebsentstehung

Tumoren (Synonyme sind die Begriffe Neoplasie und Gewächs) sind Gewebeveränderungen, die nach ihrem biologischen Wachstumsverhalten und nach dem Ursprungsgewebe der Neoplasie eingeteilt werden. In Abhängigkeit von der Dignität des Tumors, also seiner Fähigkeit, Metastasen auszubilden, unterscheidet man benigne (gutartige), maligne (bösartige) und semimaligne Tumoren.

- Benigne (gutartige) Tumoren verdrängen durch ihr Wachstum umliegendes Gewebe, durchwachsen (*infiltrieren*) es aber nicht und bilden keine Metastasen.
- Maligne Tumoren sind bösartige Tumoren, die sich dadurch auszeichnen, dass sie sich der normalen Wachstumskontrolle des Organismus entziehen. Die "entarteten" Zellen vermehren sich ungebremst. Sie wachsen in umliegendes Gewebe ein und zerstören es. Sie können in Blutbahnen und Lymphgefäße eindringen und mit dem Blut- und Lymphstrom in andere Körperorgane gelangen. Dort können sie sich ansiedeln und sich weiter vermehren – es entstehen Metastasen.
- Semimaligne Tumoren bilden in der Regel keine Metastasen, zerstören aber umliegendes Gewebe und wachsen in dieses hinein (*Destruktion* und *Infiltration*).

Krebs bezeichnet in der Medizin einen bösartigen Tumor und ist eine Krankheit des Erbguts. Es existieren verschiedene Arten von Krebserkrankungen. Diese gehen jeweils aus einer bestimmten Zelle hervor, die sich aufgrund genetischer Veränderungen in eine unkontrolliert wachsende Tumorzelle umgewandelt hat.

Aus der molekulargenetischen Forschung ist bekannt, dass Krebs durch nicht wieder zu reparierende Schäden von bestimmten Genen entsteht. Vor allem drei Gruppen von Genen, so genannte Protoonkogene, Tumorsuppressor-Gene und DNA Reparaturgene sind häufig bei Krebs mutiert. Diese Gene sind in allen gesunden Körperzellen vorhanden und regulieren dort üblicherweise Proliferation und Differenzierung: Sie überwachen die korrekte Reduplikation der DNA, entscheiden über die Notwendigkeit von Reparaturvorgängen, halten den Zellzyklus an, bis die Reparaturen ausgeführt sind, und veranlassen gegebenenfalls eine Apoptose (programmierter Zelltod), falls die Reparatur nicht erfolgreich war. Während



Protoonkogene nach Aktivierung prinzipiell das Zellwachstum fördern, wird dieser von Tumorsuppressor-Genen unterdrückt. Verliert dieses genetische Kontrollsystem seine Balance wird die Koordination von Wachstum, Teilung und Apoptose außer Kraft gesetzt. Regulierende Faktoren werden nicht erkannt oder nicht ausgeführt und es entsteht durch ein unkontrolliertes Wachstum ein Tumor. Als Ursachen genetischer Veränderungen sind heute chemische Substanzen, Viren und Strahlen bekannt.

## 2.2 Leukämie

Die Leukämie, auch Blutkrebs oder „Leukose“ genannt, wurde erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben und ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems. Der Begriff leitet sich von den griechischen Wörtern „leukos“ für „weiß“ und „haima“ für „Blut“ ab. Laut deutschem Kinderkrebsregister sind Leukämien mit etwa 600 Neuerkrankungen im Jahr und mit einem Anteil von etwa 34% die häufigsten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter.

Leukämien zeichnen sich durch eine stark vermehrte Bildung von pathologisch veränderten Leukozyten im Knochenmark aus. Diese abnormalen Zellen führen zu Knochenmarkinsuffizienz und treten in der Regel auch stark vermehrt im peripheren Blut auf. Sie können Leber, Milz, Lymphknoten und weitere Organe infiltrieren und dadurch ihre Funktion beeinträchtigen. Durch die Störung der Blutbildung kommt es zur Verminderung der normalen Blutbestandteile. Aufgrund des Mangels an Sauerstoff transportierenden Erythrozyten sowie an Thrombozyten und funktionstüchtigen Leukozyten entsteht eine Anämie.

Es gibt Hinweise, dass die t(4;11)-Leukämien durch eine einzige Mutation in einer Knochenmarkszelle entstehen und sich danach mitotisch vermehren. Im Gegensatz zu soliden Tumoren treten in Leukämien allgemein kaum Zweitmutationen auf (Greenman *et al.*, 2007).

Die Klassifikation der Leukämien basiert auf morphologischen und immunologischen Eigenschaften der Leukämiezellen. Zunehmend gewinnen auch zytogenetische und molekularbiologische Merkmale an Bedeutung. Je nach beteiligtem Zelltyp unterscheidet man zunächst myeloische und lymphatische 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. So lassen sich Leukämien grob in akute lymphatische (ALL), akute myeloische (AML), chronische lymphatische (CLL) und chronische myeloische (CML) Leukämien klassifizieren. Akute Leukämien können unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tode führen, während eine chronische Leukämie sich über viele Jahre hinziehen kann.

Die weitere Unterteilung der akuten Leukämien aufgrund der Morphologie erfolgt mit Hilfe der Vorgaben der French-American-British Working Group for Leukemia Classification (FAB). Die akute myeloische Leukämie (AML) ist in acht Subgruppen unterteilt (M<sub>0</sub> bis M<sub>7</sub>), die akute lymphatische Leukämie (ALL) in drei (L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>) (Hoffbrand *et al.*, 2003).

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist – mit einem Anteil von 80 % – die häufigste Form der Leukämie bei Kindern und Jugendlichen. Sie macht fast ein Drittel aller Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter aus. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist – nach der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) – mit knapp 20 % die zweithäufigste Leukämie bei Kindern und Jugendlichen. (<http://www.kinderkrebsregister.de/> Rev. 1.5.2011)

## **2.3 Chromosomale Translokationen**

### **2.3.1 Chromosomale Translokationen allgemein**

Die meisten Leukämien sind durch genetische Veränderungen (Mutationen) gekennzeichnet. Oftmals wird die Entstehung dieser Krankheit mit reziproken Translokationen assoziiert. Diese chromosomalen Translokationen führen zur Bildung von chimären Genprodukten (Look, 1997; Tenen *et al.*, 1997). Bei den betroffenen Genpositionen handelt es sich häufig um Transkriptionsfaktoren oder allgemein um Gene, die an entscheidenden Entwicklungsprozessen der Zelle beteiligt sind und deren Produkte wichtige Protein-Protein-Interaktionen eingehen (Rabbitts, 1999). Diese Transkriptionsfaktoren sind mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems verbunden und sind daher an der Tumorentstehung beteiligt.

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 erfolgt eine Reparatur der Brüche. Die wichtigsten Reparatursysteme, die dabei aktiv werden, sind die Systeme der *Homologous Recombination* (HR) und des *Non Homologous End Joining* (NHEJ). Fehlerhafte Reparaturen können dabei zu chromosomalen Veränderungen führen.

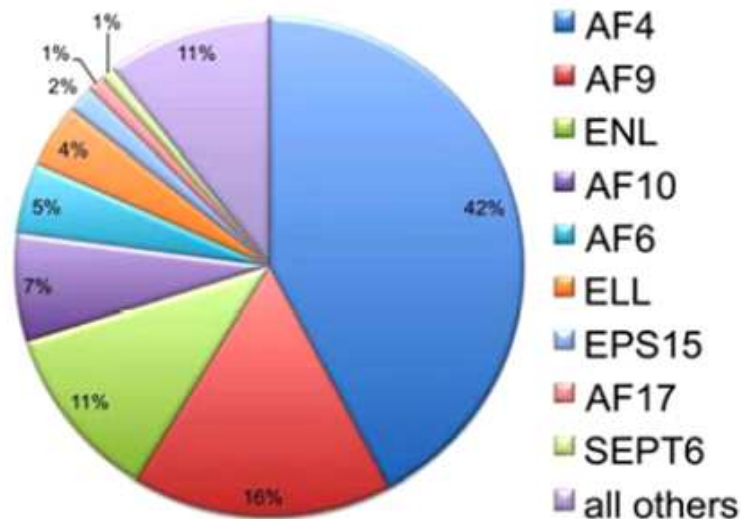
Es existieren zwei Formen von chromosomalen Translokationen: Balancierte und unbalancierte Translokation. Während bei einer "unbalancierten Translokation" durch eine Veränderung des Erbgutes entweder genetisches Material verloren (Deletion) oder dazugewonnen wird (Duplikation), handelt es sich bei der "balancierten Translokation" um eine genetische Veränderung, in der sich die Gesamtmenge des genetischen Materials nicht verändert, wohl aber die Positionen bestimmter Gene.

Bei den balancierten Translokationen wird zusätzlich in TypI- und TypII-Translokationen unterschieden. Ein Beispiel für eine TypI-Translokation ist die Translokation t(8;14) beim Burkitt-Lymphom. Dabei treten Genumlagerungen auf, die dazu führen, dass ein zelluläres Proto-Onkogen, in diesem Fall das MYC Gen, unter den Einfluss eines starken immunzellspezifischen Enhancers gebracht und dadurch aktiviert wird. Die häufigeren TypII-Translokationen sind durch die Bildung von chimären Fusionsgenen gekennzeichnet. Ein sehr bekanntes Beispiel ist die Translokation t(9;22), die zum sogenannten Philadelphia-Chromosom führt. Die Ursachen und Mechanismen zur Entstehung der Translokation sowie die Auswirkungen der Expression der Fusionsprodukte sind jedoch meist nicht bekannt. Ein weiteres Beispiel für eine Typ-II-Translokation ist die Translokation t(4;11).

### **2.3.2 Molekulare Grundlagen der t(4;11)-Translokation**

In akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien sind häufig reziproke Translokationen des *MLL*-Gens (*Mixed Lineage Leukemia*), welches auf Chromosom 11, Bande q23 liegt, mit über 60 Partnergenen zu beobachten. Das *AF4*-Gen (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*), welches auf Chromosom 4, Bande q21 lokalisiert ist, ist in 42% aller *MLL*-Translokationen

reziprok mit *MLL* fusioniert und ist damit das häufigste Partnergen (siehe Abb. 2.1) (Chen *et al.*, 1993a; Meyer *et al.* 2006; Meyer *et al.*, 2009).



**Abb. 2.1 Häufigkeits-Verteilung der *MLL*-Fusionspartnergene**

Verteilung der häufigsten Fusions-Partnergene von *MLL*. Die Hauptfusionspartner sind AF4 mit 42% (meist ALL), AF9 mit 16% (meist AML) und ENL mit 11% (ALL und AML). Für diese Statistik wurden insgesamt 760 Patienten analysiert (Meyer C und Marschalek R, DCAL, 2009).

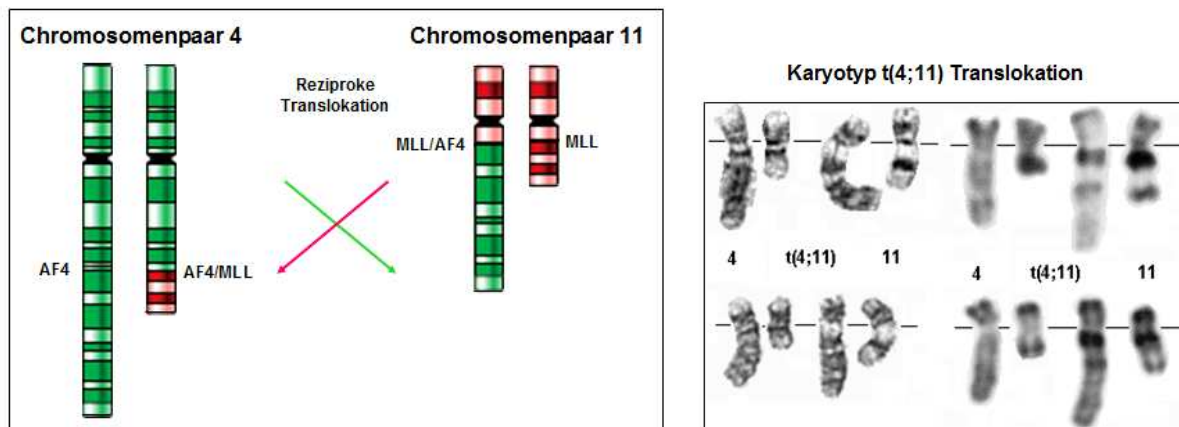
Der mit 30 bis 40% größte Teil der t(4;11)-assoziierten Leukämien wurde bei Kleinkindern und Säuglingen diagnostiziert, hingegen nur ca. 5% bei älteren Patientengruppen. Diese wiesen jedoch eine Sekundärleukämie als Folge einer Chemotherapie auf (Felix, 1995; Johansson 1998).

Für die t(4;11)-Leukämien gibt es im Gegensatz zu anderen akuten lymphatischen Leukämien kaum Therapiemöglichkeiten, die Prognose ist daher in aller Regel ausgesprochen schlecht. Die Rückfallquote nach einer kurzzeitigen Erholung in Folge einer Chemotherapie ist sehr hoch, weitere Therapierversuche bringen danach keine erneute Verbesserung. Wegen dieser Therapieresistenz und der sich daraus ergebenden schlechten Prognose werden sämtliche Leukämien mit einer Translokation des *MLL*-Gens als Hochrisiko-Leukämien bezeichnet.

DNA-Doppelstrangbrüche auf beiden beteiligten Chromosomen sind die Voraussetzungen für eine Translokation. Diese Brüche finden in einem abgegrenzten Bereich, der sogenannten Bruchpunkts-Cluster-Region (BCR) statt (Gu *et al.*, 1992; Reichel *et al.*, 1999), die sich meist

in bestimmten Intronbereichen der fusionierenden Gene befindet, so dass Fusionsgene mit intaktem Leserahmen entstehen (Marschalek *et al.*, 1997). Die Bruchpunktsregion von *MLL* liegt zwischen den Exons 8 und 14; die von *AF4* liegt zwischen den Exons 3 und 6 (Nilson *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 2001). Während für das *AF4*-Gen kein weiterer Fusionspartner bekannt ist, existieren für das *MLL*-Gen eine Vielzahl anderer Translokationspartner. Die häufigsten *MLL*-Fusionspartner-Gene sind *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10*, *AF6* und *ELL*. Diese Gene kodieren für Faktoren des Aktivierungskomplexes der RNA-Polymerase II (Bitoun, 2007).

Die t(4;11)-Translokation entsteht durch die reziproke Fusion des langem Arms vom Chromosom 11 im Leserahmen des *MLL*-Gens mit dem langen Arm des Chromosoms 4 im Leserahmen des *AF4*-Gens, wodurch zwei abnorme Derivatchromosomen entstehen (siehe Abb. 2.2). Durch diese Fusion entstehen zwei Fusionsgene: *MLL-AF4*, bestehend aus dem N-terminalen Abschnitt von *MLL* und dem C-terminalen Abschnitt von *AF4* sowie das reziproke *AF4-MLL* (Nilson *et al.*, 1996; Nilson *et al.*, 1997).



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung und Karyotyp einer t(4;11)-Translokation**

Links: Bei einer t(4;11)-Translokation kommt es zum Austausch zweier Chromosomenarme der Chromosomen 4 (Bande q21) und Chromosom 11 (Bande q23), wodurch die Gene *AF4* und *MLL* reziprok miteinander fusioniert werden. Rechts: Karyotyp: t(4;11) (q21;23) H. Norback, B. Johnson, S. Morrison-Delap, (UW Cytogenetic Services)

### 2.3.3 Klinisches Erscheinungsbild einer t(4;11)-Leukämie

Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens sind mit diversen Krankheiten des blutbildenden Systems verbunden. Dazu gehören T- und B-ALL, akute myeloische Leukämie (AML), therapiebedingte Myelodysplasien (t-MDS) und lymphoblastische Lymphome (Daser & Rabbitts, 2005; Hess *et al.*, 2004; Thirman *et al.*, 1993).

Die Symptome der akuten Leukämien sind sehr vielfältig. Sie können mit einem schweren Krankheitsgefühl, Blässe, Fieber, häufig mit einer hartnäckigen Infektion einhergehen, was Folge der Blutarmut (Anämie) und starker Abwehrschwäche durch relativen Mangel an funktionsfähigen weißen Blutzellen (Leukozyten) ist. In vielen Fällen klagen die Patienten auch über gehäuftes Nasen- oder Zahnfleischbluten und eine verstärkte Neigung zu blauen Flecken. Ursache hierfür ist ein Mangel an Blutplättchen (Thrombozyten). Gelegentlich, besonders bei jüngeren Patienten, sind auch Knochenschmerzen die ersten Symptome einer akuten Leukämie.

Zu den klinischen Merkmalen einer t(4;11)-Leukämie zählen neben dem geringen Alter der Patienten, eine erhöhte Vermehrung der Lymphozyten (Hyperleukozytose), eine Vergrößerung der Leber und Milz (Hepatosplenomegalie), sowie eine starke Infiltration der leukämischen Blasten des zentralen Nervensystems und ein sehr schlechter Therapieverlauf (Chen, 1993b; Rubnitz, 1996 ; Felix, 1999; Reaman, 1999).

Zur Diagnose einer ALL sind umfassende Blutuntersuchungen sowie Knochenmarkpunktionen notwendig. Die entnommenen Proben werden mit Hilfe zytologischer, immunologischer und genetischer Verfahren ausgewertet. Eines der Kriterien zur Diagnosestellung ist der Nachweis eines Anteils lymphatischer Blasten von mindestens 20% bis 25% im Knochenmark. Weiterhin ist die Zuordnung der Blasten zur lymphatischen Reihe durch Immunphänotypisierung notwendig. Dabei wird mit Hilfe markierter monoklonaler Antikörper die Antigenausstattung der entsprechenden Zellen bestimmt. Bei vielen der untersuchten Antigene handelt es sich um in der CD-Nomenklatur erfasste Leukozyten-Antigene. Die leukämischen Zellen zeigen sowohl lymphatische (CD13, CD19) als auch myeloische (CD15, CD65) Oberflächenmarker, werden aber aufgrund ihrer Morphologie als Lymphozyten klassifiziert (Pui *et al.* 1991; Hess *et al.* 1997). Aufgrund dieses Befundes liegt nahe, dass die Vorläufer der transformierten Zellen pluripotent hämatopoietisch sind. Dies

würde bedeuten, dass sie fähig sind, Nachkommen von beiden Linien des hämatopoietischen Systems zu erzeugen.

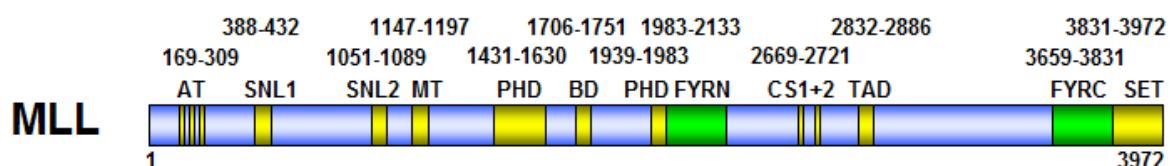
Ein weiteres Kriterium zur Diagnosestellung einer ALL ist ein Nachweis charakteristischer genetischer Veränderungen. Es ist wichtig nach der Diagnose einer Leukämie den jeweiligen Translokationspartner zu identifizieren, da die Therapieabläufe je nach Translokation unterschiedlich sind. Als sehr zuverlässige Methode zur Identifizierung der Translokations-Partnergene hat sich die Probenuntersuchung mittels LDI-PCR (*Long Distance Inverse PCR*) herausgestellt. Mit dieser Methode ist es möglich die jeweiligen Translokationspartner von *MLL* in vier PCR-Reaktionen mit geringen Mengen von Patienten-DNA (1 µg DNA entspricht ca. 300.000 Zellen) zu identifizieren (Meyer *et al.*, 2005).

## 2.4 Struktur und Funktion des MLL-Proteins

### 2.4.1 Funktionelle Domänen des MLL-Proteins

MLL steht für „Mixed Lineage Leukemia“ oder „Myeloid Lymphoid Leukemia“ da leukämische Blasten von MLL-assoziiierter Leukämie für gewöhnlich sowohl lymphoide als auch myeloide Oberflächenmarker tragen. Dementsprechend können MLL-Translokationen sowohl zu ALL, AML als auch zu MLL führen (Han Liu *et al.*, 2009).

Das *MLL*-Gen ist auf dem Chromosom 11; Bande q23 lokalisiert und wurde erstmals 1991 von Ziemin-van der Poel beschrieben (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991). Das *MLL*-Gen hat eine Länge von 92 kb und kodiert für 37 Exons, die für ein Protein mit 3972 Aminosäuren (435 kDa) kodieren (siehe Abb. 2.3) (Nilson *et al.*, 1996; Marschalek *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2006).



**Abb. 2.3 Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des MLL-Proteins**

Die Gesamtlänge des MLL-Proteins beträgt 3972 Aminosäuren, die Positionen der einzelnen Domänen sind angegeben. **AT**: drei AT-Haken; **SNL**: *speckled nuclear localization* 1 und 2; **MT**: Methyltransferase-homologe Domäne; **PHD**: Plant Homeo Domain 1-3 und 4; **BD**: Bromodomäne;

**FYRN**: F/Y-reicher Abschnitt im N-Terminus; **CS**: *Cleavage site* 1 und 2; **TAD**: Transaktivierungsdomäne; **FYRC**: F/Y-reicher Abschnitt im C-Terminus; **SET**: *Suppressor of variegation*-, *Enhancer of zeste*- und *Trithorax*-Domäne.

Das MLL-Protein verfügt über insgesamt zwölf bisher beschriebene Domänen. Im Folgenden werden diese Domänen aufgeführt:

- AT-Haken: DNA-Bindedomänen, die sequenzspezifisch in der kleinen Furche der Doppelhelix an Adenin-Thymin-reiche Sequenzen binden können.
- Kernlokalisations-Sequenzen (*speckled nuclear localization* SNL1 und 2): führen zur Lokalisation des Proteins in bestimmten Chromatinbereichen (Yano *et al.*, 1997).
- MT-Domäne: Cysteinreicher Bereich, der spezifisch an unmethylierte CpG-Dinukleotid Sequenzen bindet und mit Histondeacetylasen sowie mit einigen PcG-Proteinen interagieren kann (Xia *et al.*, 2003).
- PHD-Finger (*Plant Homeo Domain*): Zink-Finger-Motive, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können.
- Bromodomänen: binden an acetylierte Lysinreste von Histonen und sind in vielen Chromatin assoziierten Proteinen, die durch Veränderungen des Chromatins die Transkription beeinflussen können, zu finden (Dhalluin *et al.*, 1999).
- CS (*cleavage site*) 1 und 2: konservierte Protease-Erkennungssequenzen, die von der Threonin-Aspartase Taspase1 geschnitten werden. Dieser Schritt führt zur Aktivierung des MLL-Proteins (Hsieh *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2002).
- Phenylalanin (F)- und Tyrosin (Y)-reiche Sequenzen (FYR): durch die Interaktionsdomänen FYRN und FYRC wird die Heterodimerisierung der beiden prozessierten MLL-Fragmente vermittelt. Dies führt zur Stabilisierung des MLL-Komplexes und zu seiner Überführung in den Nukleus, wo sich dann ein Multiproteinkomplex ausbildet (Nakamura *et al.*, 2002).
- Transaktivierungsdomäne (TAD): wird von dem nuklearen Coaktivator **CREB-Binding-Protein** (CREBBP) erkannt. Durch diese Interaktion kann das phosphorylierte CREB-Protein (**cAMP Response-Element-Binding**) an die sogenannte **cAMP-Response-Element-Sequenz** (CRE) binden, die in den Promotoren einiger Gene vorhanden ist, und diese transkriptionell aktivieren (Ernst *et al.*, 2001).



- SET-Domäne (*Suppressor of variegation* su(var)3-9, *Enhancer of zeste*, Trithorax): ist an der Regulation von transkriptionellen Prozessen beteiligt und weist die größte Homologie zu anderen Proteinen der Trithorax-Gruppe (Tschiersch *et al.*, 1994).

#### 2.4.2 Aufbau und Funktion des MLL-Proteinkomplexes

Das humane MLL-Protein wird aufgrund seiner Sequenzhomologie mit dem Trithorax-Protein, das in *Drosophila* maßgeblich an Differenzierungsprozessen beteiligt ist, der Trithorax-Gruppe (TrxG) zugeordnet (Djabali *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992). Trithorax-Gruppenproteine sind Chromatinregulierende Proteine, die für die Aufrechterhaltung der Genexpression verantwortlich sind. Proteine dieser Gruppe können verschiedene Multiprotein-Chromatin-Komplexe bilden. Die Hauptfunktion eines solchen Komplexes ist es die Transkription durch Trimethylierungen an Lysin-4 von Histon 3 (H3K4me3) an bestimmten Zielgenen zu aktivieren (van Lohuizen, 1999). Die Gegenspieler der Trithorax-Proteine sind die Proteine der Polycomb-Gruppe (PcG-Proteine), die eine transkriptionelle Inaktivierung ihrer Zielgene durch Trimethylierung an Lysin-27 von Histon 3 (H3K27me3), bewirken. In Stammzellen sorgen PcG-Proteine für den inaktiven Status von Genen, die eine Proliferation hemmen (Tumorsuppressor-Gene). Gleichzeitig bewirken TrxG-Proteine den aktiven Status von Genen für die Pluripotenz der Zellen. Durch das Zusammenspiel der Proteine dieser Gruppen entstehen epigenetische Histon-Markierungen, die an die Tochterzellen weitervererbt werden und somit ein „zelluläres Gedächtnis“ etablieren.

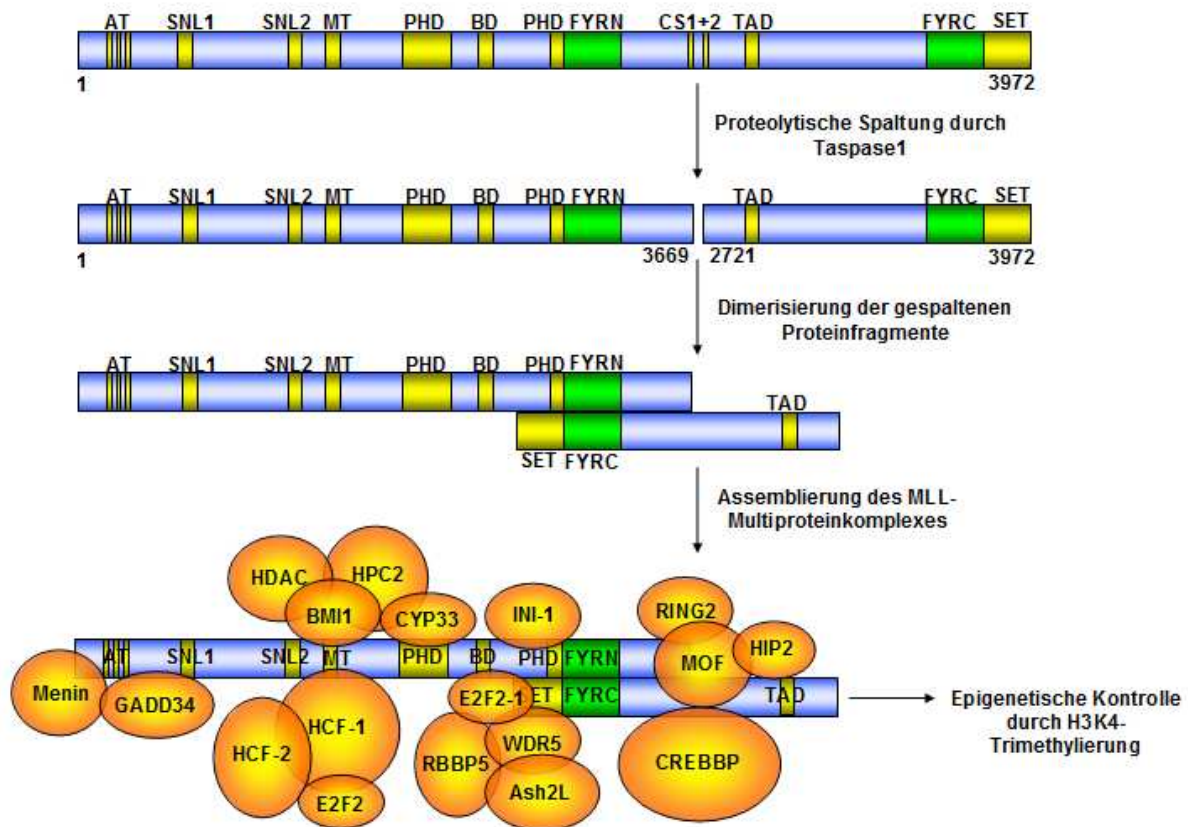
Der hohe Grad an Homologie zwischen TRX und MLL ist ein Beweis dafür, dass es sich bei MLL ebenfalls um ein für die Embryonalentwicklung wichtiges Protein handelt. Ein homozygoter *Mll-knock-out* führt bei Mäusen zu einem Verlust der *HOX*-Gen-Expression und ist bereits am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung letal. Die Expression der für die Segmentierung während der Embryonalentwicklung essentiellen *HOX*-Gene (Homeobox-Gene) konnte in diesen Embryonen nicht mehr nachgewiesen werden. Dabei wurde die Expression der *HOX*-Gene zwar regulär gestartet, konnte aber aufgrund des fehlenden MLL-Proteins nicht aufrechterhalten werden (Yu *et al.*, 1998). Zudem wiesen heterozygote Embryonen homöotische Fehlbildungen des Skeletts auf (Yu *et al.*, 1995).

MLL kontrolliert die *HOX*-Genexpression durch die Bindung an *HOX*-Regulationselemente in Verbindung mit anderen Transkriptionsregulatoren. So ist bekannt, dass MLL an die Promotoren von *HOXA9* und *HOXC8* bindet, wo es sowohl für die Acetylierung von Histon

H3 und H4 (Petruk *et al.*, 2001), als auch die Methylierung an Lysin-4 von Histon H3 sorgt (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002).

Neben seiner Funktionen bei der Embryonalentwicklung, besitzt das MLL-Protein auch Aufgaben bei der Hämatopoese. Es konnte in den Organen des hämatopoietischen und des lymphoiden Systems nachgewiesen werden (Butler *et al.*, 1997). Weiterhin konnte die Abhängigkeit der hämatopoietische Differenzierung von einer normalen HOX-Genexpression gezeigt werden (Look *et al.*, 1997): MLL-defiziente Embryonen-Mäuse wiesen eine fehlerhafte fötale Hämatopoese auf (Hess *et al.*, 1997). Zudem konnte die Notwendigkeit des MLL-Proteins für die Entwicklung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen gezeigt werden. (Ernst *et al.*, 2004).

Das MLL-Protein ist das wichtigste Zielprotein der Taspase1. Es besitzt zwei Schnittstellen CS1 (D/GADD) und CS2 (D/GVDD), die evolutionär hoch konserviert sind. Mutationen an diesen Stellen beeinträchtigen die Proteolyse (Hsieh *et al.*, 2003). Taspase1 erkennt diese Schnittsequenzen des MLL-Proteins und spaltet CS1 hinter Aspartat-2.702 und CS2 hinter Aspartat-2.754. Nach proteolytischer Spaltung an CS1 und CS2 entstehen zwei große Proteinfragmente, das N-terminale Fragment mit 320 kDa (p320N) und das C-terminale Fragment mit 180 kDa (p180C). Diese lagern sich zusammen zu einem Heterodimer. Dabei interagiert die FYRN-Domäne des N-terminalen Fragments direkt mit der FYRC- und SET-Domäne des C-terminalen Fragments (Nakamura *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2003; Pless *et al.*, 2011). Die Heterodimerisierung ist wichtig für die Stabilisierung des p320N-Fragments und die korrekte nukleäre Lokalisation des Komplexes (Hsieh *et al.*, 2003). Das Heterodimer dient als Plattform für die Bildung eines Multiproteinkomplexes (Nakamura *et al.*, 2002), welches über H3K4-Trimethylierung an entsprechenden Promotorbereichen, aktivierend auf die Expression der *HOX*-Gene und ca. 2.000 anderer Gene wirkt (siehe Abb. 2.4) (Günther *et al.*, 2005).



**Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Entstehung des MLL-Multiproteinkomplexes**

Die durch Taspase1 bewirkte Prozessierung des MLL-Proteins führt zu anschließender Heterodimerisierung der entstandenen Proteinfragmente an den Interaktionsdomänen FYRN und FYRC. Die Proteinfragmente werden dadurch stabilisiert und bilden eine Plattform zur Ausbildung eines Multiprotein-Komplexes (MPC), durch die Anlagerung einer Vielzahl von Proteinen.

Die Existenz der transkriptionregulierenden Domänen innerhalb MLL und ihre Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsaktivatoren und -repressoren weisen darauf hin, dass viele verschiedene Interaktionsproteine die Regulationsrolle von MLL vermitteln. Im Jahr 2002 konnten Nakamura *et al.* 29 Proteine identifizieren, die am MLL-Komplex beteiligt sind (Nakamura *et al.*, 2002). Dazu zählen u.a. HPC2, BMI1, SWI/SNF-Komplex, TFIID-Komplex, MENIN, HCF1, E2F, CYP33, MOF, RBBP5, WDR5, ASH2L und CREBBP. Im Folgenden werden einige wichtige Funktionen dieser Komponenten vorgestellt.

Der große Anteil dieser 29 Proteine gehört zu den Histondeacetylasen. Sie interagieren mit der MLL-Repressionsdomäne und sind für die Deacetylierung der Lysinreste an Histone

verantwortlich. Gleichzeitig rekrutieren sie die Polycomb-Proteine HPC2 und BMI1, die antagonistische Funktionen auf die Segmententwicklung besitzen. Embryonale Fibroblasten mit MLL- bzw. BMI1-Defizit weisen reziproke Expressionsmuster der *HOX*-Gene auf (Hanson *et al.*, 1999).

Komponenten des SWI/SNF-Komplexes (*Switch/Sucrose-NonFermentable*) besitzen chromatinremodellierende Funktionen (Nakaruma *et al.*, 2002).

Komponenten des TFIID-Komplexes (*transcription factor II D*) leiten durch die Bindung an den Promotoren der zu transkribierenden Gene die Bildung des Prä-Initiationskomplexes ein (Nakaruma *et al.*, 2002).

MENIN ist ein Tumorsuppressor, der häufig in Neoplasien endokriner Organe mutiert ist. Es ist mit dem N-Terminus von MLL assoziiert und bindet an transkriptionelle Zielgene (Caslini *et al.*, 2007; Milne *et al.*, 2005b). Es wird angenommen, dass Menin an der Aufrechterhaltung der *HOX*-Genexpression beteiligt ist, da es mit dem *HOXC8* Promotor interagiert und sein *knock-down* die Expression von *HOXC8* verringert (Hughes *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2004).

Die Zellzyklus Regulatoren HCF1 und E2F im Komplex mit MLL binden während des G1/S-Phase an die E2F-Promotoren, die für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig sind (Tyagi *et al.*, 2007). MLL aktiviert die Cycline sowie die cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren. (Milne *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006). Eine Untersuchung des MLL-Proteinlevels während des Zellzyklus ergab, dass MLL biphasisch exprimiert wird, da es sowohl den G1/S-Übergang als auch die M-Phase kontrolliert. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass es im Zellzyklus des MLL zu einem Wechsel von Expression und Abbau kommen muss, da nur so der Zellzyklus normal ablaufen kann. (Liu *et al.*, 2007).

Der zweite PHD-Finger wird für die Homodimerisierung des MLL-Proteins benötigt. Der dritte PHD-Finger bindet an Cyclophilin CYP33. Eine Überexpression von CYP33 führt zu einer modifizierten Expression einiger *HOX*-Gene, welche zu den Zielgenen des MLL-Proteins zählen (Fair *et al.*, 2001).

Die Histon-Acetyltransferase MOF bindet über einen Zinkfinger direkt an den C-Terminus von MLL und hat sowohl eine H3K4-Methyltransferase-Aktivität als auch eine H4K16-Acetyltransferase-Aktivität (Dou *et al.*, 2005). Der *knock-down* von MOF führt zu einer stark verminderten Expression von *HOXA9*. Aufgrund der gegenseitigen Verstärkung von Methylierung und Acetylierung erfolgt eine erhöhte Aktivierung der Genexpression.

RBBP5, WDR5 und ASH2L (trxG) bilden den Histon-Methyltransferase-Komplex (HMT), der an die SET-Domäne von MLL bindet und Mono-, Di- und Trimethylierungen am Lysin-4 von Histon 3 (H3K4) bewirkt (Yokoyama *et al.*, 2004, Dou *et al.*, 2006). Dabei bindet WDR5 an H3K4 und bringt es in eine herausgehobene Stellung, so dass es methyliert werden kann (Han *et al.*, 2006). Im Rahmen von *knock-down* Studien des WDR5-Proteins zeigte sich der Methylierungslevel von H3K4 genomweit reduziert, ebenso die Expression der Gene *HOXC8* und *HOXA9* (Wysocka *et al.*, 2005).

CREBBP kontrolliert die Genexpression durch Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren und seine intrinsische Histon-Acetyltransferase-Aktivität (Ernst *et al.*, 2001).

## 2.5 Struktur und Funktion des AF4-Proteins

### 2.5.1 Funktionelle Domänen des AF4-Proteins

Erstmals 1992 wurde das *AF4*-Gen (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*), auch *AFF1* (*AF4/FMR2 family member1*) genannt, auf dem Chromosom 4, Bande 21 als Fusionspartner von MLL in einer Leukämie identifiziert (Gu *et al.*, 1992). Das *AF4*-Gen hat eine Länge von über 300 kb und besteht aus 23 Exons, die für ein 10,5 kb langes Transkript kodieren (Chen *et al.*, 1993a; Nilson *et al.*, 1997; Werner, 1999), das für ein Protein mit einem prädiktiertem Molekulargewicht von 131 kDa kodiert (apparent 175 kDa) und ist mit 42% der häufigste Fusionspartner von MLL (siehe Abb. 2.5).



### Abb. 2.5 Schematische Darstellung des AF4-Proteins

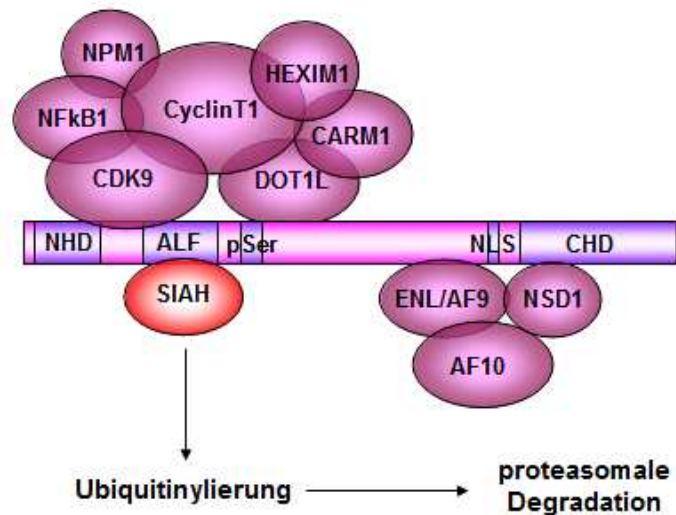
Die Gesamtlänge des AF4-Proteins beträgt 1212 Aminosäuren. **NHD**: N-terminale Homologie-Domäne der ALF-Proteine; **ALF**: konservierte Domäne der ALF-Proteine; **pSer**: Serin-/Prolinreiche Sequenz; **NLS**: Nukleare Lokalisationssequenz; **CHD**: C-terminale Homologie-Domäne der ALF-Proteine. Zahlen: Aminosäurepositionen

AF4, LAF4, FMR2 und AF5q31 werden zur ALF-Familie zusammengefasst, da sie in fünf konservierten Domänen NHD, ALF, pSer, NLS und CHD homolog sind (Nilson *et al.*, 1997; Taki *et al.*, 1999). Im Folgenden werden diese fünf Domänen aufgeführt.

- **N-terminale Homologie-Domäne (NHD)**: ist wahrscheinlich für die Homodimerisierung von AF4 verantwortlich (Benedikt *et al.*, 2011).
- **ALF-Domäne**: vermittelt die Interaktion mit den E3-Ligasen SIAH1 und SIAH2, die zu einer Poly-Ubiquitinylierung und damit zum proteasomalen Abbau von AF4 führt (Bursen *et al.*, 2004). Dadurch wird die Proteinmenge von AF4 stringent kontrolliert, so dass das zelluläre Level von AF4 in der Regel sehr gering ist.
- **pSer (poly-Serin)-Domäne**: prolin- und serinreicher Bereich, der wahrscheinlich für die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen verantwortlich ist (Ma & Staudt *et al.*, 1996; Nilson *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 1995).
- **Nukleare Lokalisations-Sequenz (NLS)**: ist für den Transport der Proteine in den Nukleus verantwortlich.
- **C-terminale Homologie-Domäne (CHD)**, repräsentiert möglicherweise eine Heterodimerisierungsdomäne und erlaubt die Bindung von AF4 an AF5, da das verkürzte FelC, das nur aus dem N-Terminus von AF4 mit der NHD und einem Teil der ALF-Domäne besteht, nicht mit AF5 heterodimerisieren kann (Benedikt *et al.*, 2011).

### 2.5.2 Aufbau und Funktion des AF4-Proteinkomplexes

Zu den Komponenten des AF4-Proteinkomplexes gehören CYCLINT1, CDK9, DOT1L, CARM1, HEXIM1, NPM1, NFkB1, AF9, ENL, AF10 und NSD1 (siehe Abb. 2.6). Im Folgenden werden einige von diesen Komponenten in Zusammenhang mit ihren Funktionen dargestellt.



### Abb. 2.6 Darstellung des AF4-Multiproteinkomplexes

Das Schema zeigt den AF4-Proteinkomplex anhand der bisher für AF4 nachgewiesenen Interaktionsproteine. AF4 interagiert mit zahlreichen Proteinen und bildet so einen Multiproteinkomplex. Die E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 erkennen die ALF-Domäne des AF4-Proteins und binden daran. Dies führt zu Ubiquitylierung und proteasomalem Abbau des Proteins, wodurch der zelluläre AF4-Level strikt reguliert wird (Benedikt *et al.*, 2011).

Dem AF4-Protein wird eine Rolle als Transkriptionsfaktor zugewiesen, da funktionelle Untersuchungen zeigen konnten, dass das AF4-Protein im Kern lokalisiert ist und über transkriptionsaktivierende Eigenschaften verfügt (Ma & Staudt *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 1995).

Homozygot defiziente Mäuse zeigten Defekte in der B- und T-Zellen-Entwicklung, woraus eine verringerte Anzahl reifer B- und T-Zellen resultiert. Da die myeloische Entwicklung nicht beeinträchtigt ist, kann davon ausgegangen werden, dass AF4 eine bedeutende Rolle in der lymphoiden Entwicklung hat (Isnard *et al.*, 2000).

Das AF4-Protein hat ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems. Kommt es zu einer Mutation der ALF-Domäne, so resultiert dies in einem Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn, was zu einer Einschränkung der motorischen Fähigkeiten führt (Isaacs *et al.*, 2003).

Die Überexpression des AF4-Proteins in MEF-Zellen (*Murine Embryonic Fibroblasts*) führte zum Verlust der Kontakt-Inhibition und damit zur Wachstumstransformation. Die durch die

SIAH-Ligasen vermittelte Ubiquitylierung führt zu einem Abbau von AF4 und somit zu einer strikten Regulierung des AF4-Proteinlevels in gesunden Zellen (Bursen *et al.*, 2004). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Erkennungssequenz für die SIAH1- und SIAH2-Ligasen in der N-terminal gelegenen ALF-Domäne liegt (Bursen *et al.*, 2004).

Das murine AF4-Protein spielt eine große Rolle in der Transkriptionskontrolle. Es interagiert nämlich mit dem *Positive Transcription Elongation Factor b* (P-TEFb), der aus CDK9 und CCNT1 (Cyclin T1) zusammengesetzt ist. Dadurch wird die Kinase-Aktivität von CDK9 aktiviert, der seinerseits die Aminosäure Serin 2 der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II phosphoryliert. Die nach der Initiation arretierte RNA-Polymerase II wird dadurch von den inhibierenden Faktoren DSIF und dem NELF Komplex befreit und kann mit der Elongationsphase der Transkription fortfahren. Damit ist AF4 direkt an der Regulation der transkriptionellen Elongation beteiligt (Estable *et al.*, 2002; Bitoun *et al.*, 2007).

Das AF4-Protein ist zusätzlich an epigenetischen Histon-Modifikationen beteiligt, da die Komplexpartner AF9, ENL und AF10 rekrutieren, welches wiederum mit DOT1 interagiert. DOT1 kann eine H3K79-Methylierung am Chromatin verursachen, so dass das Fortschreiten der Transkription begünstigt wird. AF4, AF9 und ENL müssen allerdings ständig neu transkribiert werden, da P-TEFb auch diese phosphoryliert, wodurch sie bevorzugt degradiert werden (Bitoun *et al.*, 2007).

## **2.6 Die Fusionsproteine der t(4;11)-Translokation**

### **2.6.1 Die Rolle der Fusionsproteine in der Leukämogenese**

Die Translokationspartner von MLL sind sehr unterschiedlich und führen zu Leukämien von unterschiedlichen lymphatischen Vorläuferzellen. Die Art der leukämischen Zelle und des jeweiligen Fusionspartners von MLL bestimmen den Phänotyp der Leukämie (So *et al.*, 2003). Auch der Verlauf der Leukämien variiert je nach Translokationspartner. Verschiedene Translokationspartner führen zu unterschiedlichen Mechanismen zur Entartung der Zelle. Bei einer *MLL*-Translokation entsteht immer ein Fusionsprodukt, welches den N-Terminus des MLL-Proteins enthält. Für die verschiedenen Fusionspartner konnten jedoch keine strukturellen Gemeinsamkeiten definiert werden. Daher stellte Rowley 1992 die Hypothese auf,



dass das MLL-AF4 Fusionsprotein auch bei der t(4;11)-Leukämie das Protein mit dem onkogenen Charakter darstellt (Rowley *et al.*, 1992). Kowarz *et al.* konnten aber nachweisen, dass in 80% der Patienten neben dem *MLL-AF4*- auch ein *AF4-MLL*-Fusionstranskript vorhanden ist, während die restlichen 20% der Leukämien auf komplexe Translokationen mit weiteren Translokationspartnern zurückzuführen sind (Kowarz *et al.*, 2007). Gaussmann *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass bereits die alleinige Expression von AF4-MLL ausreicht, um eine Wachstumstransformation von murinen Zellen herbeizuführen (Gaussmann *et al.*, 2007); zudem war das AF4-MLL Fusionsprotein alleine in der Lage, eine akute Leukämie im Mausmodell auszulösen (Bursen *et al.*, 2010). Daher scheint die Expression des AF4-MLL für die Leukämogenese von Bedeutung zu sein.

Die durch eine Translokation entarteten Zellen weisen ein anderes Genexpressionsprofil als gesunde Zellen auf. Aufgrund dieser Erkenntnis ist davon auszugehen, dass die Zellentwicklung durch die Bindung der Fusionsproteine an andere Zielgene gestört wird. Auf diese Weise wird die Differenzierung der leukämischen Zellen blockiert, so dass es zu einem anormalen Proliferationsverhalten kommt (Cleary *et al.*, 1991; Rabbitts *et al.*, 1991).

### 2.6.2 Das Fusionsprotein AF4-MLL

Je nach Bruchpunkt hat das Fusionsprotein AF4-MLL eine Länge von ca. 2800-3200 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 300-350 kDa. Dessen N-Terminus besteht aus dem N-Terminus des AF4-Proteins mit der NHD- und der ALF-Domäne. Der C-Terminus enthält die vier PHD-Finger, die Bromodomäne, die Interaktionsdomänen FYRN und FYRC, die Taspase-Schnittstellen CS1+2, die Transaktivierungsdomäne TAD sowie die SET-Domäne des MLL-Proteins (siehe Abb. 2.7).

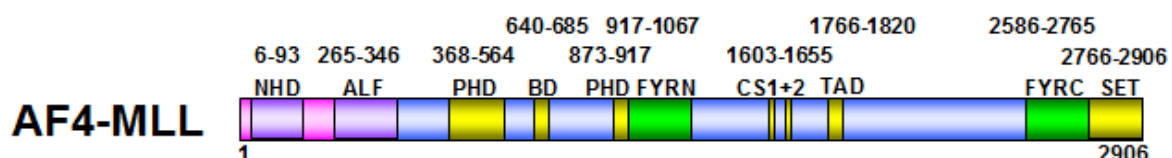


Abb. 2.7 Schematische Darstellung des AF4-MLL Fusionsproteins

Das Schema zeigt das Fusionsprotein AF4-MLL mit den vorhandenen Proteindomänen. Das Fusionsprotein enthält den N-Terminus von AF4 (pink/lila) sowie den C-Terminus von MLL (blau/gelb), und hat eine Gesamtlänge von 2906 Aminosäuren. Zahlen: Aminosäurepositionen.

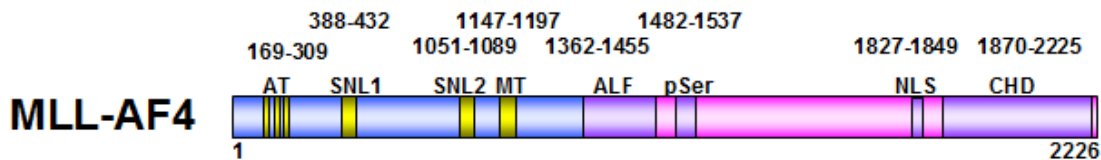
Einige Domänen, die in MLL- bzw. AF4-Wildtyp-Proteinen enthalten sind, bleiben auch im AF4-MLL-Fusionsprotein erhalten. Daher können auch viele Komplexpartner, die mit den Wildtyp-Proteinen interagieren, ebenfalls an das AF4-MLL Fusionsprotein binden. Der SET-Domänen-Komplex am C-Terminus von MLL, bestehend aus ASH2L, RBBP5 und WDR5 wird auch im AF4-MLL Fusionsprotein vollständig aufgebaut, weshalb AF4-MLL in der Lage ist, eine H3K4-Histon-Methylierungs-Aktivität auszuführen. Da MENIN das Fusionsprotein AF4-MLL nicht mehr an spezifische Zielgene rekrutieren kann, könnte der SET-Domänen-Komplex unspezifische H3K4-Trimethylierungsmuster verursachen. Auch das ASH2L-bindende DPY30 konnte im AF4-MLL-Multiproteinkomplex nachgewiesen werden. Von den Komplexpartnern des AF4-N-Terminus konnten NFkB1, CYCLINT1, CDK9, CARM1, HEXIM1, DOT1L und NPM1 im AF4-MLL Proteinkomplex nachgewiesen werden. Es wird für möglich gehalten, dass AF4-MLL durch die Rekrutierung der Trimethylierungs-Aktivität des SET-Domänen-Komplexes an NFkB1-Zielgenen eine unnatürliche H3K4-Trimethylierung ausführt (Benedikt *et al.*, 2011). MLL-Komplexpartner, wie SMARCB1, MOF, HIP2, RING2, E2F-Faktoren, GADD34, BMI1 und MENIN konnten nicht als Bindepartner im AF4-MLL-Komplex nachgewiesen werden.

Der AF4-MLL-Multiproteinkomplex verfügt über Histon-Acetylierungs-Aktivität, eine hyperaktive P-TEFb Kinase-Aktivität und H3K4- sowie H3K79-Histon-Methyltransferase-Aktivität. Benedikt *et al.* konnten 2011 zeigen, dass die für AF4-MLL ermittelte H3K79-Histon-Methyltransferase-Aktivität der des MLL-Proteins stark ähnelt (Benedikt *et al.*, 2011). Bereits 2008 stellte Kristov *et al.* die Vermutung auf, dass abweichende H3K79-Methylierungsmuster für die Entwicklung von Leukämien verantwortlich sind (Krivtsov *et al.*, 2008). Daher wurde von einer wichtigen Rolle des AF4-MLL Fusionsproteins in der Entstehung der t(4;11)-Leukämie ausgegangen. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Auswirkung von AF4-MLL in murinen Fibroblasten, in denen die Expression von AF4-MLL zum Verlust der Kontaktinhibition führt. Das Gleiche konnte beobachtet werden, wenn die Zellen zusätzlich MLL-AF4 exprimierten, mit einer zusätzlichen Steigerung der NANOG- und OCT4-Expression in diesen Zellen (Gaussmann *et al.*, 2007). NANOG und OCT4 sind für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Differenzierung von embryonalen Stammzellen zuständig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das AF4-MLL, eine Leukämie im Maus-

modell hervorrufen kann (Bursen *et al.*, 2010). Anscheinend tragen beide Fusionsproteine zu der Entstehung und Aufrechterhaltung einer t(4;11)-Leukämie bei.

### 2.6.3 Das Fusionsprotein MLL-AF4

Das MLL-AF4 Fusionsprotein hat eine Länge von ca. 2100-2400 Aminosäuren (abhängig von der Lage der Bruchstelle) und ein Molekulargewicht von 230-260 kDa. Es enthält den N-Terminus von MLL mit dem AT-Haken, SNL1+2 und die MT-Domäne und den C-Terminus von AF4 mit der pSer-Region, die NLS und die C-terminale Homologie-Domäne (CHD) (siehe Abb. 2.8).



**Abb. 2.8 Schematische Darstellung des MLL-AF4 Fusionsproteins**

Das Schema zeigt das Fusionsprotein MLL-AF4 und die vorhandenen Proteindomänen. Das Fusionsprotein enthält den N-Terminus von MLL (blau/gelb) sowie den C-Terminus von AF4 (pink/lila), und hat eine Gesamtlänge von 2226 Aminosäuren. Zahlen: Aminosäurepositionen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das MLL-AF4 Fusionsprotein ein Einfluss auf die *HOX*-Genexpression hat. Allerdings führt die Überexpression von MLL-AF4 zu einem verlangsamten Wachstum und Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie zu einer gesteigerten Resistenz gegen Apoptose (Bertrand *et al.*, 2003; Caslini *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007). Unterstützt wurden diese Ergebnisse von einem MLL-AF4 *knock-down*-Experiment durch siRNA, welches zu einem Anstieg der Apoptoserate führte (Thomas *et al.*, 2005).

Der von MLL-AF4 ausgelöste Zellzyklusarrest in der G1-Phase könnte durch die Bindung des Fusionsproteins an MENIN ausgelöst werden, da MENIN für die Regulation der Expression der Cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren p18 und p27 verantwortlich ist. Der Cyclinabhängige Kinase-Inhibitor (CKI) p27 ist ein Tumorsuppressor, da das Fehlen von p27 im Mausmodell zu einer vermehrten Zellteilung in vielen Organen führt. Weiterhin führte eine Überexpression von p27 zu einer geringeren Teilungsrate, weshalb die Zellen eine Resistenz

gegen die meisten Zytostatika erhielten. Bestätigt wurde dies durch die Beobachtung, dass die Expression von MLL-AF4 zu einem Anstieg der Verdopplungszeit führte (Milne *et al.*, 2005b; Xia *et al.*, 2005).

Nakamura *et al.* konnten 2007 die Korrelation der MLL-Fusionsproteine mit der positiven Regulation spezifischer miRNAs zeigen. MiRNAs sind nicht-kodierende RNAs, die einen Einfluss auf die Genregulation haben, indem sie zum spezifischen Abbau oder zur Translations-Hemmung von RNAs führen (Bartel *et al.*, 2004). Für diesen Effekt könnte das Binden von MLL-AF4 an das Protein DROSHA, das bei der Prozessierung von miRNAs eine Rolle spielt, verantwortlich sein. Im Jahr 2009 wurde nachgewiesen, dass es aufgrund der Überexpression der mikroRNA mir-196b zu einer erhöhten Proliferation in Knochenmarks-Vorläuferzellen und in deren Folge zur Inhibition der Differenzierung kommt. Mir-196b liegt im *HOX*-Gencluster und wird mit *HOX*-Genen co-exprimiert (Popovic *et al.*, 2009). Es konnte jedoch bislang keine Interaktion zwischen AF4- bzw. MLL-Wildtyp-Proteinen mit DROSHA gezeigt werden. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass das MLL-AF4 Fusionsprotein auch auf die Transkription von bestimmten miRNAs wirkt.

Die ersten Mausmodelle mit einem *knock-in* von *MLL-AF4*, kontrolliert durch den endogenen MLL-Promotor, zeigten nach einer langen Latenzzeit (540 bzw. 720 Tage) ein disseminiertes B-Zell-Lymphom, welches allerdings dem humanen ALL-Phänotyp nicht ähnelte (Chen *et al.*, 2006; Metzler *et al.*, 2006). Krivtsov *et al.* konnten 2008 in einem induzierbaren *MLL-AF4 knock-in* Modell die Ausbildung von ALL und AML durch die Expression von MLL-AF4 einleiten. Die H3K79-Methylierungsmuster der ALL waren denen der humanen t(4;11)-Leukämien sehr ähnlich. (Krivtsov *et al.*, 2008).

2010 konnten Bursen *et al.* im Rahmen von retroviralen Transduktions-/Transplantations-Experimenten murine hämatopoetische Stammzellen mit den Fusionsallelen *MLL-AF4* oder *AF4-MLL* bzw. beiden zusammen transduzieren und in Mäuse transplantieren.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Krivtsov *et al.* konnte in Mäusen, die nur MLL-AF4 exprimierten keine Leukämie-Entwicklung beobachtet werden. Die Expression von AF4-MLL nach einer durchschnittlichen Latenzzeit von 245 Tagen führte jedoch zu einer proB-ALL, einer B/T akuten biphänotypischen Leukämie (ABL) oder einer „*mixed lineage leukemia*“ (MLL). In Anwesenheit von beiden Fusionsproteinen wurden nur akute biphänotypische Leukämien beobachtet (Bursen *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis

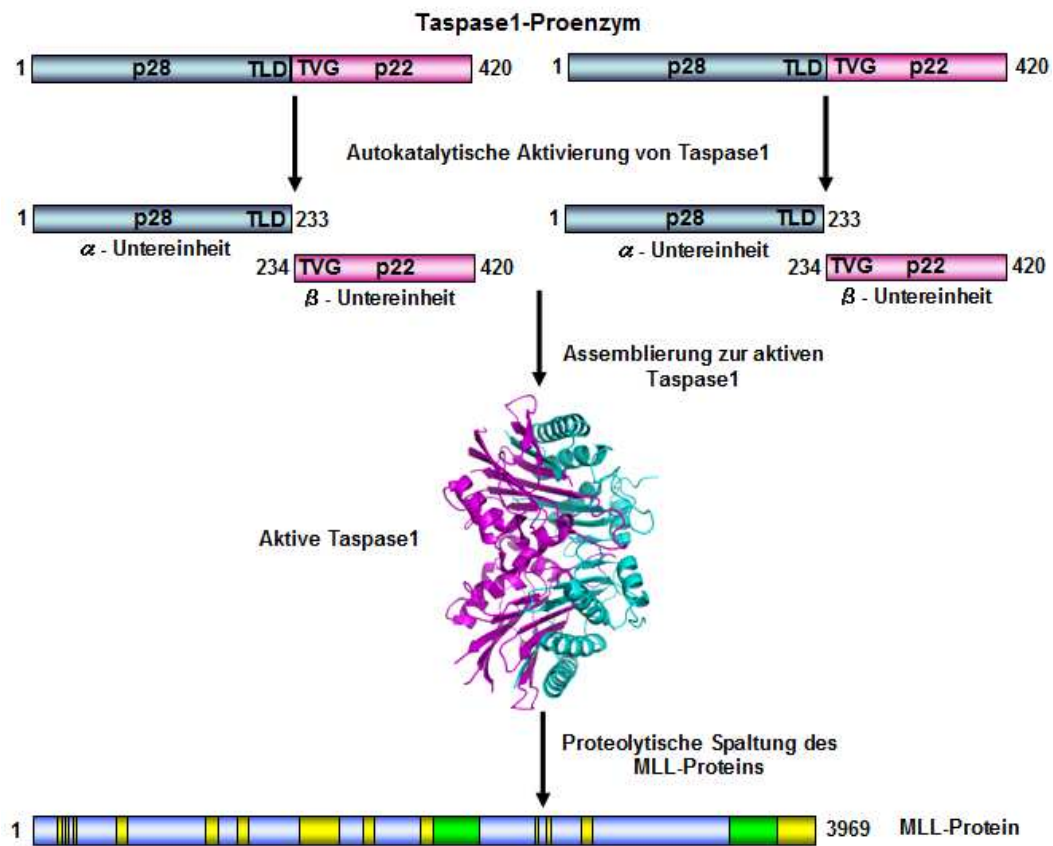
dafür sein, dass beide Fusionsproteine bei der Entstehung der t(4;11)-Leukämie eine Rolle spielen.

## 2.7 Taspase1

### 2.7.1 Autokatalytische Aktivierung von Taspase1

Erstmals im Jahre 2003 wurde Taspase1 als für die Prozessierung des MLL Proteins verantwortliche Protease beschrieben (Hsieh *et al.*, 2003a). Das humane *Taspase1*-Gen ist auf dem Chromosom 20, Bande p12.1 lokalisiert und hat eine Länge von 250 kb. Sie enthält 14 Exons und kodiert für ein Protein, das 420 Aminosäuren lang ist und ein Molekulargewicht von 50 kDa hat. Taspase1 steht für Threonin-Aspartase1 und verdankt ihren Namen der Tatsache, dass sie ihr Substrat nach der Aminosäure Aspartat schneidet, wobei das Threonin in ihrem aktiven Zentrum als Nukleophil fungiert.

Taspase1 wird zunächst als 420 Aminosäuren langes Protein translatiert. Zwei solcher Proteine lagern sich zusammen zu einem Proenzym der Taspase1. Das Proenzym unterliegt einem autokatalytischen Prozess, der zur Spaltung der Proteine zwischen der Aminosäure Aspartat-233 und dem Threonin-234 führt. Diese Autokatalyse generiert ein N-terminales Fragment von 28 kDa ( $\alpha$ -Untereinheit) und ein C-terminales Fragment von 22 kDa ( $\beta$ -Untereinheit). Dabei wird die Hydroxylgruppe des Threonin-234, freigesetzt, welches nun für den nukleophilen Angriff auf das Substrat bereit steht. Die auf diese Weise aktivierte Taspase1 besteht nun aus einem Hetero-Tetramer und ist *in vitro* und *in vivo* aktiv (siehe Abb. 2.9).



**Abb. 2.9 Autokatalytische Aktivierung von Taspase1**

Taspase1 wird als 420 Aminosäuren langes Protein translatiert. Zwei solcher Proteine lagern sich zusammen zu einem Proenzym und schneiden sich autokatalytisch zwischen Aspartat-233 und dem Threonin-234. Dadurch entstehen die beiden Proteinformen:  $\alpha$ -Untereinheit (p28) und  $\beta$ -Untereinheit (p22). Dabei wird die Aminogruppe des Threonin-234 freigesetzt, welches nun bei der Prozessierung des MLL-Proteins als Nukleophil fungiert (Khan *et al.*, 2005).

### 2.7.2 Taspase1-Kristallstruktur

Im Oktober 2005 wurden die Kristallstrukturen der aktiven Taspase1 und des Proenzym in der PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>; PDB-Code der aktiven Taspase1: 2A8J, PDB-Code des Proenzym: 2A8I) veröffentlicht (Khan *et al.*, 2005). Durch eine Röntgenstrukturanalyse wurde die Struktur der aktiven Taspase1 in einer Auflösung von 1,9 Å und die des Proenzym (D233A-Mutante) von 2,0 Å bestimmt. Die Strukturen deckten signifikante Unterschiede zwischen der aktiven Taspase1 und dem Proenzym bzw. anderen Typ2-Asparinasen auf. Da man für die Röntgenstrukturanalyse nicht in der Lage war, das Proenzym und die autokatalytisch aktivierte Taspase1 voneinander zu trennen, wurde die

aktive Taspase1 durch Co-Expression der beiden Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) des Enzyms in *E. coli* hergestellt. Für die Herstellung des Proenzym wurde seine Autokatalyse durch die Mutation D233A verhindert (Hsieh *et al.*, 2003a). Die Kristallstruktur der aktiven Taspase1 enthält die Aminosäurereste 41-155, 158-183 bzw. 41-156, 159-182 für die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten und Aminosäurereste 234-349, 364-416 bzw. 234-351, 362-416 für die beiden  $\beta$ -Untereinheiten. Die Kristallstruktur des Proenzym enthält ein Dimer, bestehend aus den Aminosäuren 41-205, 230-351, 363-416 des ersten Monomers und den Aminosäuren 41-153, 159-202, 232-356, und 361-416 des zweiten Monomers. Die Aminosäuren 1-40 und 203-229 des Enzyms konnten nicht aufgelöst werden (Khan *et al.*, 2005). Die Gesamtstruktur des Proenzym ist dennoch dem der aktivierten Taspase1 sehr ähnlich.

Taspase1 wird aufgrund ihrer Asparaginase\_2 Homologiedomäne der Typ2-Asparaginase-Familie zugewiesen und teilt mit dem humanen lysosomalen Aspartylglucosaminidase (AGA) eine Aminosäure-Sequenzidentität von 27 % (Oinonen *et al.*, 1995). Andere Mitglieder dieser Familie, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten existieren, sind Amidohydrolasen, L-asparaginase, und Glycosylasparaginase. Ein Strukturvergleich der Asparaginasen zeigt, dass Taspase1 signifikante Unterschiede zu anderen Asparaginasen, insbesondere in der Region des aktiven Zentrums, aufweist. Dies könnte der Grund sein, weshalb Taspase1 der einzige Vertreter dieser Familie ist, welcher nicht nur ein *cis*- sondern auch eine *trans*-Aktivität aufweist. Daher stellt Taspase1 eine besondere Klasse von sequenzspezifischen proteolytischen Enzymen dar und ihre katalytische Aktivität wird von den meisten üblichen Protease-Inhibitoren nicht beeinträchtigt (Hsieh *et al.*, 2003a).

Weiterhin wird Taspase1 in die Gruppe der N-terminalen Nukleophil-Hydrolase eingeteilt. Mitglieder dieser Familie weisen ein N-terminales Nukleophil auf und katalysieren eine Hydrolysereaktion (Brannigan *et al.*, 1995; Oinonen and Rouvinen *et al.*, 2000; Wlodawer *et al.*, 1995). Ein Vertreter dieser Familie ist die Glycosylasparaginase (GA). Dieses Enzym verwendet einen Autoproteolyse-Mechanismus über einen N-O-Acyl-shift (shift im Sinne von Umlagerung), um in einen reifen und aktiven Zustand überzugehen (Xu *et al.*, 1999). In diesem Fall findet die Autoproteolyse zwischen den konservierten Aminosäuren Aspartat-151 und Threonin-152 statt, welches zu Freisetzung des Threonins führt, das dann eine zentrale Rolle bei der Enzymaktivität spielt (Qian *et al.*, 2003). Ohne Autoproteolyse kann der GA-Vorläufer nicht aktiviert werden, und ist somit nicht in der Lage die  $\beta$ -N-Aspartylglucosylamin-Bindung, Asparagin-gekoppelter Glykoproteine, zu spalten. Dies führt

zu einer genetischen Krankheit beim Menschen, bekannt als Aspartylglycosaminuria (AGU) (Mononen *et al.*, 1993; Aronson, 1999; Qian *et al.*, 2003)

Um die Rolle der Aspartat-233 und des Threonin-243 bei der Autokatalyse einschätzen zu können, wurden Mutationsstudien durchgeführt. Mutationen der Aminosäuren D233A, D233N, T234A, T234S und T234C verhinderten zwar die Autokatalyse der Taspase1, führten jedoch nur bei T234A- und T234V-Mutanten zum vollständigen Verlust der Taspase-Aktivität *in trans* (Hsieh *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005). Die übrigen Mutanten zeigten eine stark verminderte, proteolytische Aktivität. Folglich ist anzunehmen, dass die Freisetzung der Aminogruppe des Threonin-234 als Nukleophil für die Taspase1-Aktivität von entscheidender Bedeutung ist. Histidin-47, Tyrosin-61, Asparagin-100, Aspartat-116, Threonin-234, Serin-252, Glutamin-265 sowie Serin-291 wurden im Rahmen von Mutationsstudien als jene Aminosäuren um das reaktive Threonin in der Bindetasche identifiziert, die für die Aktivität der Taspase1 relevant sind (Khan *et al.*, 2005).

Weiterhin wurde in der Kristallstruktur der aktivierten Taspase1 jeweils ein Chlorid-Ion im katalytischen Zentrum entdeckt, das in einer quadratisch-planaren Geometrie an die Stickstoff-Atome der Seitenketten von Glycin-49, Asparagin-100 und Threonin-234 koordiniert ist (Khan *et al.*, 2005). Kinetische Daten konnten zeigen, dass Chlorid-Ionen die Aktivität der Taspase1 in einer konzentrationsabhängigen Weise hemmen können, wobei die ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte bei 26 mM liegt und damit im Bereich der erwarteten intrazellulären Konzentration von Chlorid-Ionen (Faundez und Hartzell *et al.*, 2004). Daher wird vermutet, dass die Aktivität der Taspase1 teilweise *in vivo* auch durch Chlorid-Ionen gehemmt werden kann.

### 2.7.3 Aktivierung des MLL-Proteins durch Taspase1

*In vivo* Taspase1 *knock-out*-Experimente konnten einen direkten Zusammenhang zwischen der Taspase1-Aktivität und endogener *HOX*-Genexpression zeigen (Takeda *et al.*, 2006). Taspase1-defiziente neugeborene Mäuse zeigen klassische homeotische Transformationen, die die Rolle der Taspase1 bei der Regulierung der Körpersegmentierung bestätigen. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen Taspase1 und Zellproliferation aufgedeckt werden. Es gibt mehrere phänotypische Merkmale, die auf eine intrinsische Rolle von



Taspase1 in der Zellzykluskontrolle hinweisen: Erstens sind Taspase1-defiziente Mäuse kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister. Zweitens, Taspase1-defiziente MEFs wachsen langsam. Drittens, Deletion von Taspase1 *in vivo* resultiert in einer Beeinträchtigung des Ausbaus der DP-Thymozyten, die autonome Funktionen von Taspase1 in einer Zelle bestätigen (Takeda *et al.*, 2006).

Eine Untersuchung von homozygot Taspase1-defizienten Mäusen ergab eine deutlich verringerte Expression von Cyclin A, B und E (Takeda *et al.*, 2006). Diese Cycline wirken nach Anlagerung von cyclinabhängigen Kinasen aktivierend auf Transkriptionsfaktoren, die für die Zellproliferations-Kontrolle zuständig sind. Weiterhin konnte eine Überexpression der Kinaseinhibitoren p16Ink4a, p21 und p27 nachgewiesen werden. Diese Prozesse bewirken einen deutlich verlangsamten Zellzyklus und die geringere Körpergröße der Mäuse (Takeda *et al.*, 2006). Die deregulierte Expression der Cycline und Kinaseinhibitoren wird durch die fehlende Prozessierung des MLL-Proteins durch Taspase1 und die damit zusammenhängende Verminderung der H3K4-Trimethylierungsaktivität hervorgerufen. Taspase1 ist daher eine Protease, die durch ihre spezifische Aktivität ganz entscheidenden Einfluss auf die genregulatorischen Prozesse hat (Takeda *et al.*, 2006).

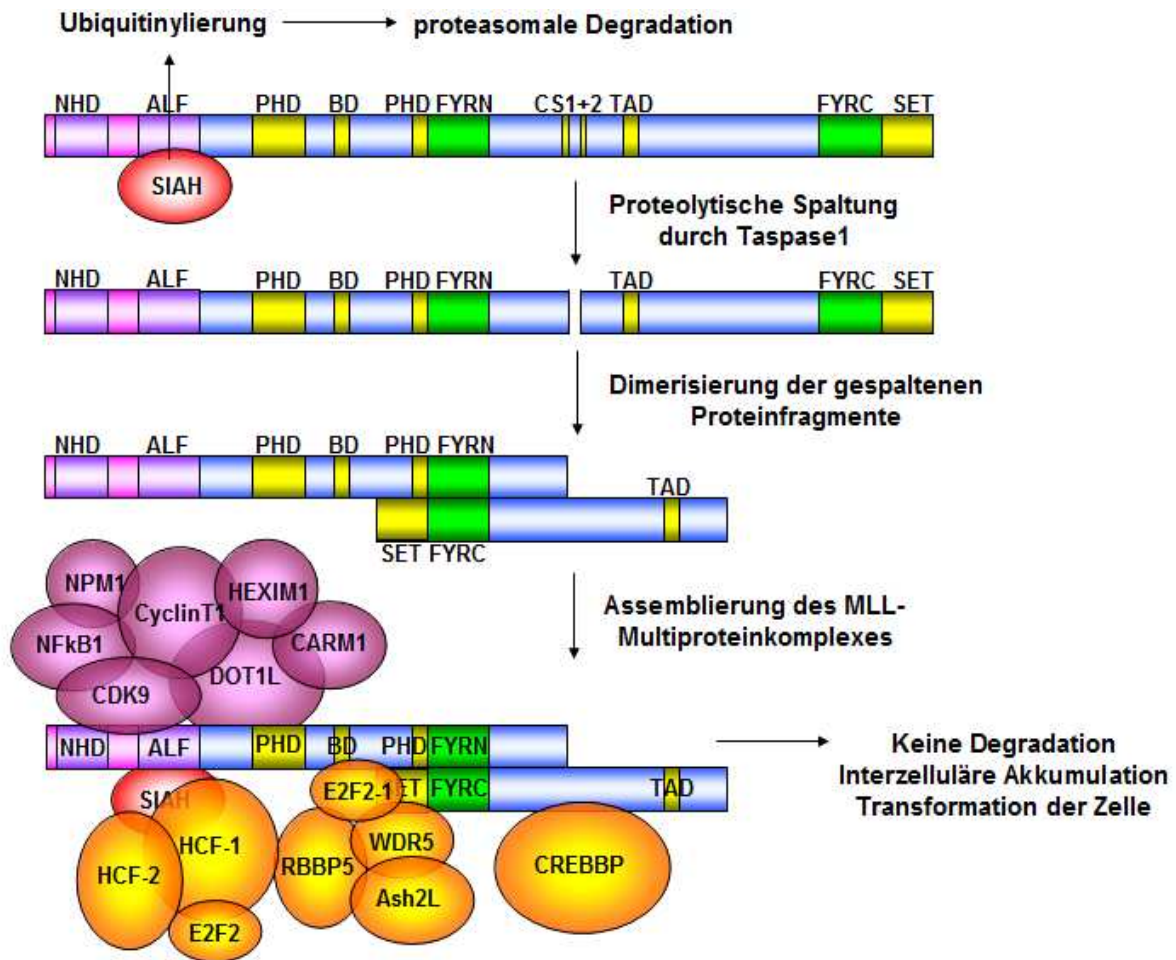
Ein weiteres Zielprotein der Taspase1 ist der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIIA. Er besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , wobei die beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  erst nach proteolytischer Spaltung des TFIIA- $\alpha$ - $\beta$ -Vorgängers durch Taspase1 entstehen. TFIIA weist eine für Taspase1 typische Erkennungssequenz QXDGXXD (X steht für jede beliebige Aminosäure) auf und wird so wie bei MLL nach Aspartat an Position 3 gespalten (Zhou *et al.*, 2006). Die Funktion des TFIIA beinhaltet die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Gene, die eine Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen spielen (Kobayashi *et al.*, 1995; Lieberman *et al.*, 1994). Ein TFIIA-*knock-down* bei *Xenopus laevis* führt zu diversen phänotypischen Defekten. In der Zelle liegt stets ein geringer Anteil an nicht prozessierten TFIIAs vor. Die Spaltung von TFIIA $\alpha$ - $\beta$  reguliert zwar seine Stabilität, beeinträchtigt jedoch nicht seine transkriptionelle Aktivität, da sowohl prozessiertes als auch unprozessiertes TFIIA transkriptionsaktivierendes Potential besitzt. (Hoiby *et al.* 2004; Zhou *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass die Spaltung des TFIIA durch Taspase1 an der Feineinstellung der Transkriptionsregulation einiger Gene während der Differenzierung und Entwicklung beteiligt ist (Hoiby *et al.*, 2004).

Es gibt bei Säugetieren ein zusätzliches Trithorax-Homolog, MLL2, das die konservierte Schnittsequenz CS2 enthält (Huntsman *et al.* 1999). Obwohl es Hinweise für eine MLL2-Proteolyse gibt, bleibt unklar, ob diese durch Taspase1 entstehen (Hughes *et al.* 2004, Takeda *et al.*, 2006).

Inhibitoren von mehreren Klassen von Proteasen einschließlich Serinproteasen, Cysteinproteasen, Metalloproteasen und sauren Proteasen wurden untersucht, sie zeigten keine ausgeprägte Hemmung der MLL-Proteolyse. Nur Wärme-Inkubation bei 70°C für 30 Minuten inaktivierten die proteolytische Aktivität (Hsieh *et al.*, 2003).

#### **2.7.4 Beitrag des Enzyms Taspase1 an einer t(4;11)-assoziierte Leukämie**

Da AF4-MLL im C-Terminus über die beiden Schnittsequenzen CS1 und CS2 verfügt, kann es analog zu MLL durch Taspase1 proteolytisch gespalten werden. Vor der proteolytischen Spaltung durch Taspase1 können die E3-Ligasen SIAH1 bzw. SIAH2 an AF4-MLL anlagern und es zu einem Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau führen. Nach der Spaltung entstehen die beiden Proteinfragmente AF4-MLL-N (p178) und MLL-C (p134), die analog zu MLL über die beiden Interaktionsdomänen FYRN und FYRC heterodimerisieren und die Basis für den Aufbau eines Proteinkomplexes ermöglichen. Die Dimerisierung dieser beiden Fragmente führt zur Stabilisierung des AF4-MLL Fusionsproteins, da es von den SIAH-Ligasen nicht mehr zum proteasomalen Abbau geführt werden kann. Dies führt zur Akkumulation des AF4-MLL Fusionsproteins, die anschließend zur Entwicklung onkogener Eigenschaften sowie Wachstumstransformation der Zelle führt (siehe Abb. 2.10) (Bursen *et al.*, 2004). Dies konnte in einem *in vitro* Zellkultur-Modellsystem bestätigt werden: MEF-Zellen (*murine embryonic fibroblasts*), die mit AF4-MLL transfiziert wurden, zeigten verstärkte Wachstumsraten und einen Verlust der Kontaktinhibition (Gaussmann *et al.*, 2007).



**Abb. 2.10 Pathomolekularer Mechanismus des AF4-MLL Fusionsproteins**

Das Schema zeigt die Prozessierung des Fusionsproteins AF4-MLL und der anschließenden Heterodimerisierung der entstandenen Proteinfragmente. Dies führt zu Stabilisierung und Anlagerung vieler Proteine zu einem Multiproteinkomplex. Die SIAH-Ligasen sind noch fähig, an die verkürzte ALF-Domäne am N-Terminus zu binden, allerdings findet in diesem Zustand kein Abbau des Fusionsproteins mehr statt. Dadurch akkumuliert der AF4-MLL-Komplex in der Zelle und führt zu ihrer Transformation.

Derzeit ist Taspase1 das einzig bekannte, MLL prozessierende Enzym (Hsieh *et al.*, 2003b). Es liegt daher nahe, dass eine Therapie der akuten Hochrisiko-Leukämie durch eine spezifische Inhibierung der Taspase1 entwickelt werden könnte. Bislang fehlt es an einem spezifischen Inhibitor für die Taspase1. Die Anwendung von bekannten Protease-Inhibitoren erzielte keine Wirkung (Hsieh *et al.*, 2003b). Das gleiche gilt für die Inhibitoren des Proteasoms (Hsieh *et al.*, 2005), welches ebenfalls ein N-terminales Threonin für die Proteolyse verwendet (Wlodawer, 1995).

## 2.8 Enzymatische Hemmung

### 2.8.1 Inhibition durch „small molecules“

Die Inhibition einer Protein-Protein-Wechselwirkung, wie z.B. die Wechselwirkung zwischen den beiden Taspase1-Monomeren, setzt die spezifische Interaktion eines niedermolekularen Liganden mit einer konformationell stabilen und Lösungsmittel-zugänglichen Region der Kontaktfläche voraus. Inzwischen ist das Design von Molekülen, welche die aktive Tasche eines Enzyms erkennen Routine geworden, während die Entwicklung von kleinen, wirkstoffähnlichen Molekülen, auch „*small-molecules*“ genannt, zur spezifischen Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen eine größere Herausforderung darstellt. Wichtig sind bei der Auswahl eines Inhibitors die Größe und die Polarität der Kontaktfläche, die daran beteiligten Sekundärstrukturelemente und die Größe und Geometrie des *Hot Spots*. Da zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen an Signalkaskaden beteiligt sind, welche bei einer Deregulation zur Entstehung von Krebs führen können, ist die Pharma-Industrie an diesem Forschungsgebiet besonders interessiert.

Erste Arbeiten, die sich Screening-Methoden bedienten führten zu Inhibitoren, die selektiv an den *Hot Spot* von Interleukin 2 (IL-2) binden und dessen Interaktion mit dem Interleukin-2 Rezeptor (IL2-R $\alpha$ ) hemmen (Braisted *et al.*, 2003). Eine weitere Entdeckung war die Entwicklung von wirkstoffähnlichen Molekülen, welche die Interaktion zwischen dem antiapoptotischen Protein MDM2 und dem Tumorsuppressorprotein p53 *in vivo* inhibieren (Buolamwini *et al.*, 2005)

### 2.8.2 Inhibition durch *trans*-dominant-negative Mutation

Dominant-negative Mutation, auch genannt „antimorphe“ Mutation, beschreibt die Hemmung der biologischen Wirkung eines Wildtyp-Genproduktes durch ein überexprimiertes, mutiertes und inaktives Genprodukt, das heißt das aktive Wildtyp-Produkt wird von dem inaktiven Mutanten-Genprodukt dominiert. Diese Mutationen resultieren in der Regel in eine veränderte molekulare Funktion - oft inaktiv - und sind durch einen dominanten oder semi-dominanten Phänotyp charakterisiert. Die dominant-negative Mutante eines Proteins bedarf vorhandener und funktionsfähiger Domänen des Wildtyp-Proteins, von denen jedoch einige durch Modifikation funktionsunfähig sein oder fehlen müssen (Ira Herzkowitz, 1987).

Der Einsatz von dominant-negativen Mutationen könnte möglicherweise Informationen über die *in vivo* Funktionen der Proteine bzw. Protein-Protein-Interaktionen liefern und damit die Entwicklung neuer inhibitorischer Moleküle ermöglichen (Ira Herzkowitz, 1987). Sofern das katalytische Zentrum und die Protein-Protein-Kontaktfläche nicht dieselbe Region im Protein-Komplex besetzen und das Protein nur im Komplex (z.B. Dimer) aktiv sein kann, ist eine Mutation in der Kontaktfläche sinnvoll. Das Verfahren hat den Vorteil, dass es einen dominanten bedingten Defekt verursachen kann, wodurch die nicht erwünschten Proteine funktionell deaktiviert werden können.

Beim Menschen ist das Marfan-Syndrom - eine Krankheit des Bindegewebes- ein Beispiel für eine dominant-negative Mutation, welche in einer autosomal-dominant vererbten Krankheit vorkommt. Dabei antagonisiert das defekte Glykoprotein-Produkt des Fibrillin-Gens (FBN1) das Produkt aus dem Wildtyp-Allel (Judge *et al.*, 2004).

Eine weitere autosomal-dominant vererbte Erkrankung ist das Li-Fraumeni-Syndrom. Patienten mit dieser Krankheit tragen eine angeborene Mutation im *p53-Gen* (Tumorsuppressor-Gen). Bereits in frühester Kindheit treten diverse Tumore, wie Brustkrebs, Leukämie und Hirntumore auf. Anhand eines Mausmodells mit einer *knock-in* Mutation des *p53-Gens* konnte gezeigt werden, dass das mutierte p53-Protein die Tumorbildung und Metastasierung durch dominant-negative Inhibition des Wildtyp-p53-Proteins fördern kann (Goh *et al.*, 2011).

## 2.9 Serin-Proteasen

In Säugetierzellen, spielen Proteasen eine Rolle bei der Angiogenese, Apoptose, Differenzierung, Immunantwort, Matrix-Remodellierung und Proteinaktivierung. Sie sind in vielen Organellen der eukaryontischen Zellen auffindbar. Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms konnten mehr als 500 Proteasen in humanen Zellen identifiziert werden (Puente *et al.*, 2005), die mit einer Anzahl von Krankheiten assoziiert sind. Dazu gehören u.a. Alzheimer Krankheiten, Krebs, Autoimmunkrankheiten und Entzündungen (Dogan Ekici *et al.*, 2008). Proteasen sind typischerweise in vier Klassen gruppiert: Cystein-, Serin-, Metallo- und Asparaginsäure-Proteasen.

Die bekannteste Klasse der Proteasen ist die Serin-Protease-Klasse, die eine klassische katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat verwendet. Dabei fungiert das Serin als Nukleophil, Histidin sowohl als Base als auch als Säure, und Aspartat orientiert den Histidinrest und neutralisiert die während der Transition aufgebaute Ladung (Dogan Ekici et al., 2008). Hierbei spielt es keine Rolle in welche Reihenfolgen diese Aminosäuren innerhalb der Triade angeordnet sind (Polgar, 2005). Mitglieder dieser Klasse sind Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Subtilisin. Die dreidimensionale Struktur des Chymotrypsins wurde 1967 (Mattheus et al., 1967) erstmals aufgelöst und die erste Trypsin-Struktur 1974 (Huber et al., 1974; Stroud et al., 1974).

Zusätzlich zu den Ser/His/Asp-Serinproteasen gibt es Proteasefamilien, bei denen diese Komponenten variieren können (Polgar, 2005). Diese atypischen Serinproteasen verwenden neuartige Triaden wie Ser/His/Glu, Ser/His/His oder Ser/Glu/Asp, Dyaden wie Ser/Lys oder Ser/His, oder einen einzelnen katalytischen Serinrest. Es gibt auch Proteasen, in denen die nukleophile Hydroxylgruppe eher von dem Threonin abstammt (Dogan Ekici et al., 2008). Beispiel hierfür sind das Proteasom oder die bereits erwähnte Glycosylasparaginase.

Die einfachste Variante einer Serinprotease verwendet eine Konfiguration, die nur auf Serin basiert. Proteasen, die solch eine Konfiguration verwenden, werden in einer Vorläuferform bzw. einem Proenzym hergestellt und unterlaufen eine Autoprozessierung, um einen aktiven Aminosäurenrest an Position 1 des reifen Proteins zu generieren. Diese Variante wurde im Enzym L-Amino-peptidase (D-Alanin-Esterase/Amidase) des Bakteriums *Ochrobacterium anthropi* gefunden. Nach der Hydrolyse wird Serin-250 der erste Aminosäurerest des reifen Proteins. Die alpha-Aminogruppe des dabei entstandenen N-Terminus dient als die allgemeine Base, die die Abspaltung des Protons der Hydroxygruppe des Serins-250 katalysiert (Dogan Ekici et al., 2008). Die neue Proteinfaltung dieser Protease wird durch die vierlagige  $\alpha\beta\alpha$ -Topologie charakterisiert (Bompard-Gilles et al., 2000), die auch N-terminale Nukleophil-Hydrolasefaltung genannt wird (Brannigan et al., 1995).

## 2.10 Zielsetzung der Arbeit

Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens (11q23) sind mit der Entwicklung von Hochrisiko-Leukämien mit sehr schlechter Prognose assoziiert. Die häufigste chromosomale Translokation von *MLL* ist die t(4;11)-Translokation, die zur Ausbildung einer akuten lymphatischen Leukämie führt (Daser *et al.*, 2005). Die onkogenen Eigenschaften des AF4-*MLL* Fusionsproteins kommen durch die Prozessierung, initiiert durch das Enzym Taspase1 und die anschließende Heterodimerisierung der beiden entstandenen Proteinfragmente zustande, wodurch das Fusionsprotein gegen proteasomalen Abbau stabilisiert wird.

Die Arbeitshypothese zu dieser Arbeit geht davon aus, dass eine spezifische Inhibierung der Taspase1 geeignet ist um die Transformation der Zelle in Folge einer t(4;11)-Translokation zu verhindern. Um eine Inhibierung zu bewerkstelligen, muss zunächst die Funktionsweise der Taspase1 analysiert und verstanden werden. Daher war es das Ziel der Arbeit, die Taspase1-Funktionsweise zu analysieren und auf dieser Grundlage einen Taspase1-Inhibitor zu konstruieren. Dazu sollten folgende Fragen beantwortet bzw. Untersuchungen durchgeführt werden:

### 1. Kann man den Aktivierungsprozess der Taspase1 verhindern?

Um den Aktivierungsprozess der Taspase1 verhindern zu können, ist es wichtig, den Mechanismus, nach dem die Aktivierung des Taspase1-Proenzym funktioniert zu analysieren. Dafür sollte die Kristallstruktur des Taspase-Proenzym als Grundlage verwendet werden. Da diese allerdings nur unvollständig aufgeklärt war, sollte zunächst eine teilweise strukturelle Modellierung für ein aufschlussreicheres Gesamtbild vorgenommen werden. Die Modellierung wurde in Kooperation mit Tim Geppert durchgeführt.

### 2. Welche Aminosäuren sind für die Autokatalyse essenziell?

Um festzustellen, welche Aminosäuren für die Aktivierung des Proenzym eine Rolle spielen, sollten diese über Mutationsstudien auffindig gemacht werden. Für die Mutationen wurden Aminosäuren in der Region der Autokatalyse ausgesucht. Weiterhin sollte durch geeignete Experimente ausgeschlossen werden, dass die Autokatalyse der Taspase1 nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus, wie es bei Glycosylasparaginase der Fall ist, verläuft.

**3. Welche Rolle spielt die Dimerisierung für die Autokatalyse des Proenzym?**

Um die Rolle der Dimerisierung herauszufinden, sollte die Kontaktfläche bzw. die Dimerisierungsregion der Taspase1 untersucht werden und auch hier sollten über Mutationsanalysen wichtige Aminosäuren identifiziert werden. Für die Mutationen wurden diejenigen Aminosäuren gewählt, bei denen eine Interaktion vermutet wurde. Anschließend sollte der zur Autoaktivierung führende Mechanismus formuliert werden.

**4. Wie kann man Taspase1 inhibieren?**

Aufbauend auf die Mutationsanalysen sollte eine *trans*-dominant-negative Taspase1-Monomer-Mutante konstruiert werden, die in der Lage ist mit einem Wildtyp-Taspase1-Monomer zu dimerisieren und seine Aktivierung zu unterbinden.



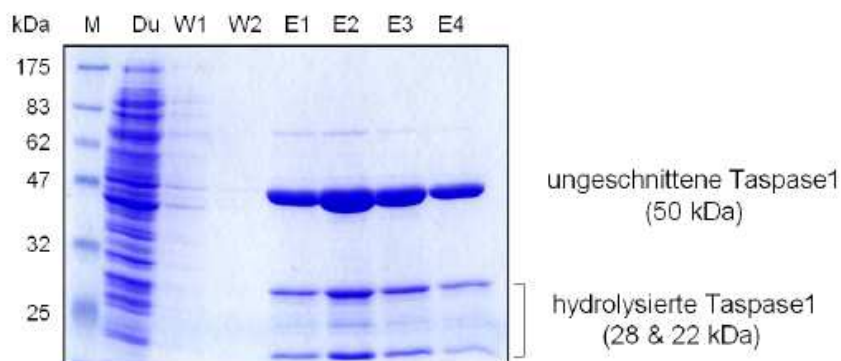
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Proteinaufreinigung von Taspase1 und GST-MLL für das Taspase1-Proteolyse-Assay

Um Taspase1 inhibieren zu können, wurde von Dr. Jens Rabenstein ein Taspase1-Aktivitätsassay etabliert, mit dessen Hilfe ihre Aktivität und Inhibierung sichtbar gemacht werden sollte. Für die Etablierung dieses Assays wurde zunächst Taspase1 und ihr artifizielles Substratprotein GST-MLL, erweitert mit einem 6xHis-Tag, rekombinant hergestellt.

##### 3.1.1 Affinitäts-Reinigung von Taspase1

Um Taspase1 klonieren zu können wurde ihr offener Leserahmen in einer PCR anhand des cDNAs aus SEM-Zellen vervielfältigt. Dabei wurden die Primer Taspase-NdeI\*3 und Taspase-XhoI\*5 verwendet. Das Amplifikat wurde dann über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI in den Vektor pET22b+ (Expressionsvektor) eingefügt. Um eine höhere Protein-Ausbeute von Taspase1 zu erhalten, wurde sie in BL21\*DE3 exprimiert. Als nächster Schritt wurde Taspase1 anhand des 6xHis-Tags mittels einer nativen Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigungsschritte wurden zur Kontrolle auf einem SDS-PAGE aufgetragen und durch Comassie-Blau sichtbar gemacht. In allen Taspase1-Aufreinigungen lagen das Proenzym und die autokatalytisch aktivierte Taspase1 in gleichen Mengen vor, was darauf hinwies, dass die Autokatalyse die Affinitätsreinigung nicht behinderte (siehe Abb. 3.1).



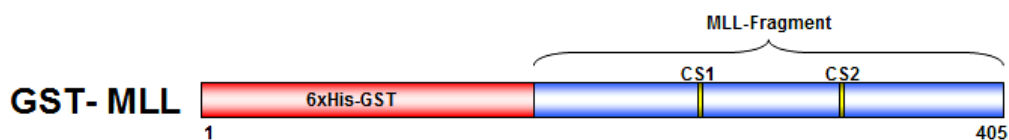
### Abb. 3.1 Kontrolle der nativen Aufreinigungen von Taspase1

Die Aufreinigungsschritte wurden zur Kontrolle auf einem 12%-igem SDS-PAGE aufgetragen. Auf dem SDS-PAGE ist der Marker, der Durchlauf (Du), zwei Waschfraktionen (W1 und W2) und die vier Elutionsschritte (E1 bis E4) zu sehen. In den Elutionsfraktionen ist die Taspase1 mit ihren drei Banden zu erkennen, wobei die Bande bei 50 kDa, die noch nicht autokatalytisch aktivierte Taspase1 (Proenzym) und die Banden bei 28 und 22 kDa, die bereits autokatalytisch geschnittene Taspase1 darstellen. (Jens Rabenstein)

### 3.1.2 Affinitäts-Reinigung des artifiziellen Substratproteins GST-MLL

Da das gesamte MLL-Protein für die vorgesehenen Versuche zu groß ist, wurde ein artifizielles Substratprotein hergestellt. Es ist ein 6xHis-GST-MLL-Fusionsprotein mit einer Länge von 405 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 50 kDa. Das MLL-Fragment des Fusionsproteins ist 158 Aminosäuren lang (2.650-2.808) und enthält die beiden Taspase1-Erkennungssequenzen CS1 und CS2 (siehe Abb. 3.2).

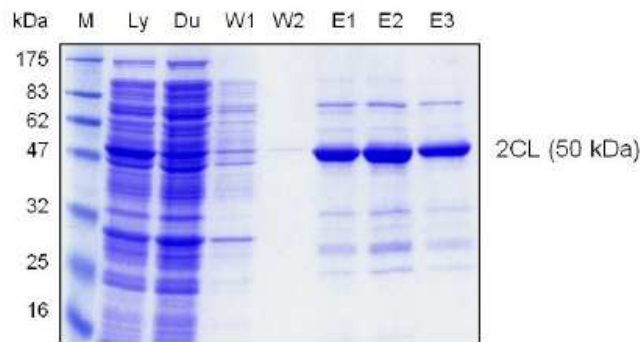
Für die Klonierung des artifiziellen GST-MLL wurde der offene Leserahmen des pUHD3-4-MLL in einer PCR amplifiziert. Dabei wurden die Primer 2CL-EcoRI\*3 und 2CL-XhoI\*5 verwendet. Das Amplifikat wurde über die Restriktionschnittstellen EcoRI und XhoI in den Expressionsvektor pGEX5T eingefügt.



### Abb. 3.2 Schematische Darstellung des artifiziellen Substratproteins GST- MLL

Das artifizielle 6xHis-GST-MLL-Fusionsprotein ist 405 Aminosäuren lang und enthält ein MLL-Fragment (blau) von 158 Aminosäuren, die die beiden Taspase1-Erkennungssequenzen (CS1 und CS2) enthalten. Das 6xHis-GST ist in rot dargestellt.

Für eine bessere Protein-Ausbeute wurde in diesem Fall die Expression im Expressionsstamm W3110 vorgenommen und ebenfalls anhand des 6xHis-Tags mittels einer nativen Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Auch hier wurden zur Kontrolle die Aufreinigungsschritte auf einem SDS-PAGE analysiert.

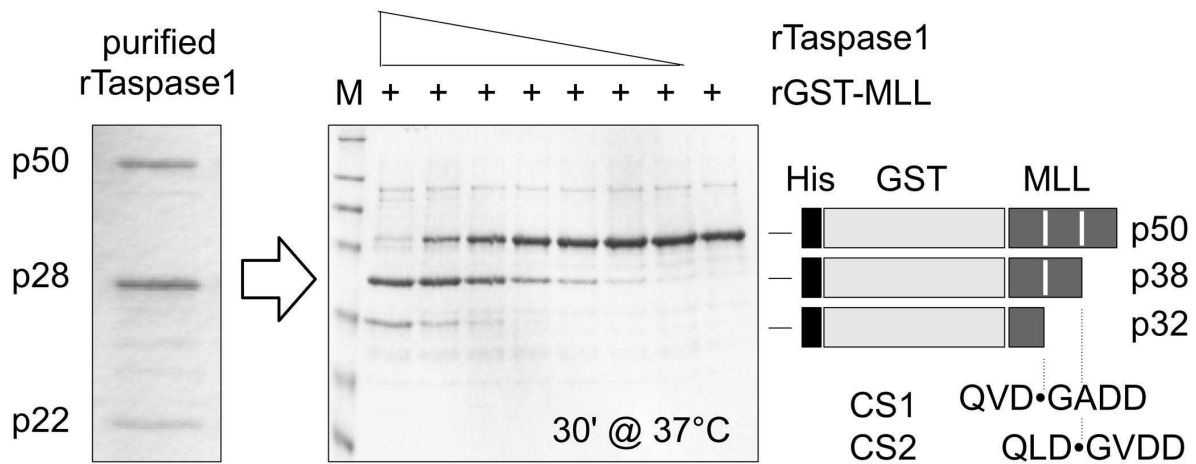


### Abb. 3.3 Kontrolle der nativen Aufreinigungen des Substratproteins GST-MLL

Die Aufreinigungsschritte wurden zur Kontrolle auf einem 12%-igem SDS-PAGE aufgetragen. Auf dem SDS-PAGE ist der Marker (M), das Lysat (Ly) der Durchlauf (Du), zwei Waschfraktionen (W1 und W2) und die drei Elutionsschritte (E1 bis E3) zu sehen. In den Elutionsfraktionen ist das 6xHis-GST-MLL Fusionsprotein mit 50 kDa zu sehen. (Dr. Jens Rabenstein)

### 3.1.3 *In vitro* Taspase1-Proteolyse-Assay

Für das Taspase1-Proteolyse-Assay mit dem Substratprotein mussten die Taspase1- und GST-MLL-Aufreinigungen zunächst in einem für das Assay geeigneten Inkubationspuffer umgepuffert werden. Dieser besteht aus 40 mM Hepes/KOH pH 7.9, 10 mM KCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Eine photometrische Messung ergab sowohl bei Taspase1 als auch bei GST-MLL eine Protein-Ausbeute von ca. 50 µM. Für das Proteolyse-Assay wurden Taspase1-Proteine in verschiedenen Konzentrationen mit konstanter Menge an GST-MLL Substrat-Proteinen in einem für das Proteolyse-Assay bestimmten Puffer 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem SDS-PAGE aufgetragen. Dabei war die Spaltung des Substrat-Proteins in einem 1:1-Verhältnis zwischen Taspase1 und Substrat-Protein am besten zu beobachten (siehe Abb. 3.4). Daher wurden alle weiteren *in vitro* Proteolyse-Assays mit gleichen Mengen an Taspase1 und Substrat-Protein durchgeführt. Dieses Assay wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Taspase1 und alle Mutanten zu analysieren.



**Abb. 3.4 Taspase1-Proteolyse-Assay**

Links: Dargestellt ist die aufgereinigte Taspase1, wobei die Bande bei 50 kDa dem Proenzym und die Banden bei 28 kDa und 22 kDa der aktiven Form der Taspase1 entsprechen. Mitte: Um die Aktivität einer gereinigten Taspase1 zu ermitteln, wurde sie in verschiedenen Konzentrationen mit dem Substratproteins GST-MLL 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschliessend auf einem 12%-igen SDS-PAGE analysiert. Aufgetragen wurden ein Marker (M) und das Proteolyse-Assay, wobei Taspase1 von unverdünnt und bis zu einem Verdünnungsfaktor von 1:128 mit konstanter Menge an GST-MLL inkubiert wurde. Es werden drei Banden bei 50 kDa, 38 kDa und 28 kDa sichtbar, wobei die Bande bei 50 kDa dem ungeschnittenen GST-MLL, die Bande bei 38 kDa dem Schnittprodukt nach dem Schneiden an CS2 und die Bande bei 28 kDa dem Schnittprodukt nach dem Schneiden an CS1 entspricht. Die Banden der Taspase1 sind auf dem SDS-PAGE nicht zu sehen, da sie in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt wurde. Rechts: Dargestellt ist das GST-MLL Substrat-Protein mit den Positionen der beiden Schnittstellen.

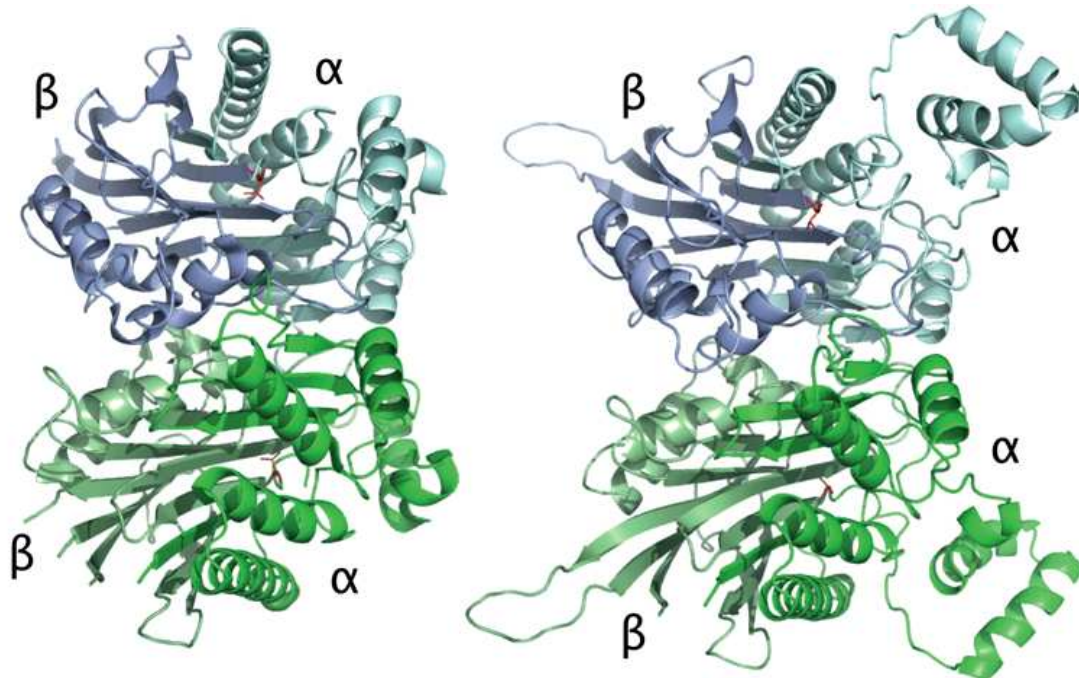
### 3.2 *In silico* Modellierung von Taspase1-Proenzym

Die Kristallstruktur von Taspase1 enthält wie schon erwähnt unaufgelöste Regionen. Da aber für die Untersuchungen von Taspase1 ihre vollständige Struktur benötigt wurde, wurde die Modellierung der fehlenden Strukturbereiche in Kooperation mit Tim Geppert durchgeführt. Für die Homologie-Modellierung der Taspase1 wurden die in der PDB-Bank vorhandenen vier Taspase1-Kristallstrukturen (PDB IDs: 2A8I, 2A8J, 2A8L, 2A8M) untersucht. Die Kette A der PDB-Struktur 2A8J wurde für die Homologie-Modellierung als Grundlage verwendet. Dieses Model enthält 66 Aminosäurelücken, die in drei zu modellierenden Lücken unterteilt wurden:

1. Lücke mit zwei fehlenden Aminosäuren (157-158),
2. Lücke mit 50 fehlenden Aminosäuren (183-233), und
3. Lücke mit 14 fehlenden Aminosäuren (350-363)

Die zwei Aminosäuren der ersten Lücke (157-158) und 25 Aminosäuren der zweiten Lücke (183-233) wurden auf Grundlage von 2A8I (Kette A) modelliert. Von den restlichen 25 Aminosäuren der zweiten Lücke wurden 24 Aminosäuren auf Grundlage der Proteinstruktur der Glycosylasparaginase (1P4K, chain C; Qian et al., 2003) modelliert. Eine Aminosäure dieser Lücke wurde *de novo* modelliert. Zehn Aminosäuren der dritten Lücke (350-363) wurden auf der Grundlage der Kette B des Taspase1-Proenzym (2A8I) modelliert. Die restlichen vier Aminosäuren wurden *de novo* modelliert.

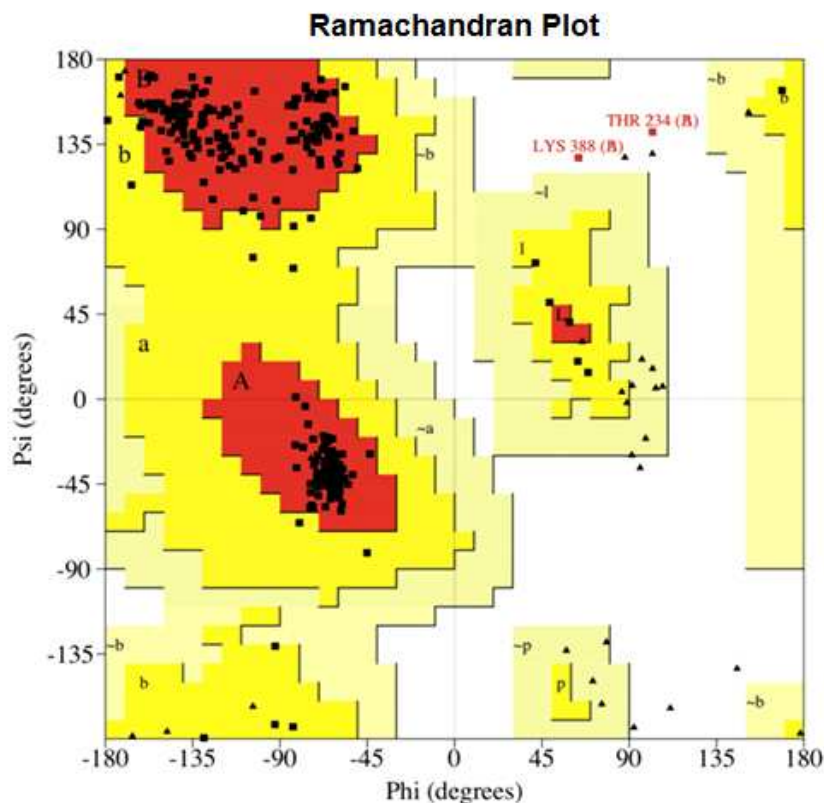
Insgesamt wurde eine Strukturähnlichkeit zwischen den Proteinstrukturen 2A8J und der ebenfalls autokatalytisch aktiven 1P4K festgestellt. Die Modellierungsprozesse wurden anhand des Homologie-Modellierungs-Software-Packets MODELLER 9v3 (Eswar *et al.*, 2006) durchgeführt (siehe Abb. 3.5).



**Abb. 3.5 *In silico* Modellierung der Taspase1-Proenzym**

Links: Kristallstruktur der unvollständig aufgelösten Taspase1 (PDB: 2A8J). Rechts: Durch Modellierung der fehlenden Strukturen entstandene Taspase1-Proenzym. Das Threonin-234 ist in rot dargestellt. Dieses Modell wurde in Kooperation mit Tim Geppert erstellt.

Zur Bewertung der Qualität der modellierten Taspase1 wurde ein Ramachandran Plot erstellt (PROCHECK, Laskowski et al., 1993). Der Ramachandran Plot ist eine 2D Darstellung des Protein-Rückgrads. Er trägt die Psi-Winkel auf der Y-Achse gegen die Phi-Winkel auf der X-Achse auf. Jeder Aminosäurerest des Proteins kann auf diese Weise in den Plot eingetragen werden. Es gibt drei bevorzugte Regionen im Plot. Diese entsprechen den Sekundärstrukturen die ein Protein am häufigsten ausbildet. So enthält beispielsweise der Bereich, welcher durch einen Psi-Winkel zwischen  $90^\circ$  und  $180^\circ$  sowie einen Phi-Winkel von  $-180^\circ$  und  $-45^\circ$  beschrieben ist, Aminosäuren die beta-Faltblatt Strukturen bilden. Als Maß der Güte einer Protein 3D Struktur wird ein Grenzwert von 90% Aminosäuren in bevorzugten Regionen verwendet. Die neu modellierte Struktur wurde hinsichtlich ihrer Güte basierend auf diesem Grenzwert analysiert (siehe Abb. 3.6).



**Abb. 3.6 Ramachandran Plot validiert die modellierte Taspase1**

Das Ramachandran Plot der modellierten Taspase1 zeigt, dass 92,3% aller Aminosäurereste in eine bevorzugte Position lokalisiert sind. Wenn  $>90\%$  aller Aminosäurereste in einer bevorzugten Region lokalisiert sind, kann von einer guten Qualität des Modells ausgegangen werden. Dieser Plot wurde mithilfe des Programms PROCHECK erstellt.

Die Plot-Statistik des Programms PROCHECK, mit welchem der Ramachandran Plot erstellt wurde, hat folgende Informationen bezüglich des Taspase1-Modells berechnet:

Aminosäurereste in bevorzugte Regionen: 596 entsprechen 92,3%

Aminosäurereste in zusätzlich erlaubte Regionen: 46 entsprechen 7,1 %

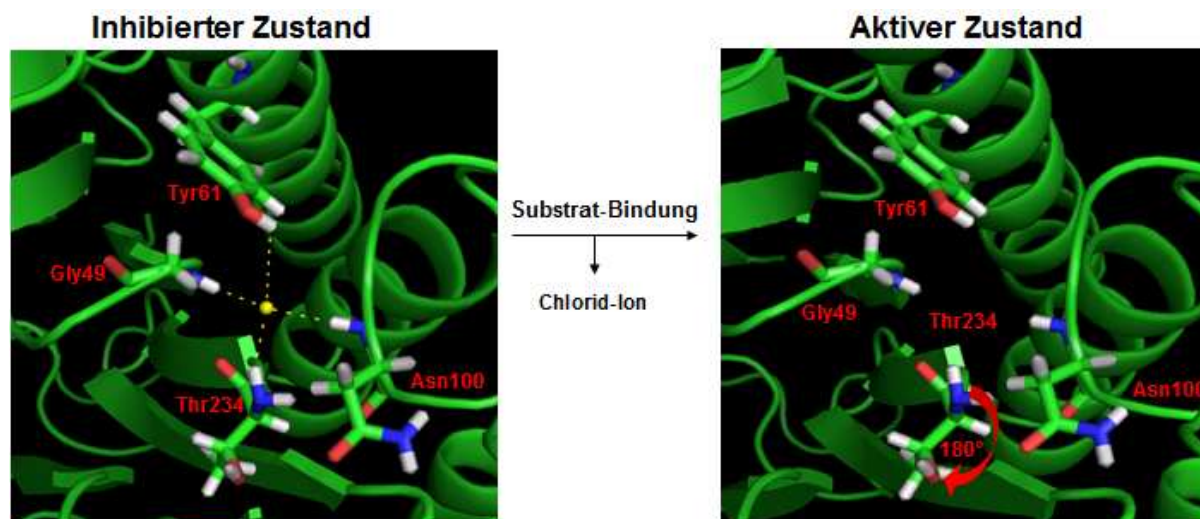
Aminosäurereste in nicht erlaubten Regionen: 4 entsprechen 0,6%

Basierend auf dem berechneten Wert von 92.3% Aminosäureresten in bevorzugten Regionen lässt sich schließen, dass das modellierte Protein die Mindestanforderung einer qualitativ hochwertigen Struktur erfüllt. Zur Erstellung einer Taspase1 Dimer Struktur wurde im Folgenden die modellierte Struktur dupliziert und jedes Duplikat auf eine der beiden Strukturen des Taspase1 Dimers 2A8J aligniert. Beide Schritte wurden im Programm Paket Pymol durchgeführt. (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC)

### **3.3 Untersuchung der Bindetasche**

#### **3.3.1 Identifizierung und Mutation wichtiger Aminosäuren in der Bindetasche**

In der Veröffentlichung von Khan *et al.* wurde eine inhibitorische Wirkung des Chlorid-Ions in der Bindetasche der Taspase1 festgestellt (Khan *et al.*, 2005). Dieses Chlorid-Ion wird über die Aminogruppen des Peptidrückgrads der Aminosäuren Glycin-49, Threonin-234, Asparagin-100 über Wasserstoff-Brückenbindungen gebunden. Eine Interaktion zwischen der Hydroxylgruppe der Aminosäure Tyrosin-61 und das Chlorid-Ion wurde erstmals in der Diplomarbeit von Bettina Hofmann postuliert (siehe Abb. 3.7). Solange das Chlorid-Ion in der Bindetasche sitzt, liegt Taspase1 inhibiert vor und das Threonin-234 ist so angeordnet, dass kein nukleophiler Angriff auf ein potentielles Substrat erfolgen kann. Erst die Freisetzung des Chlorid-Ions - wahrscheinlich ausgelöst durch die korrekte Bindung des Substrates am enzymatischen Zentrum - erlaubt die korrekte Positionierung von Threonin-234 und eine nachfolgende Hydrolyse der entsprechenden Substrat-Peptidbindung (QXD-GXDD) (siehe Abb. 3.7).



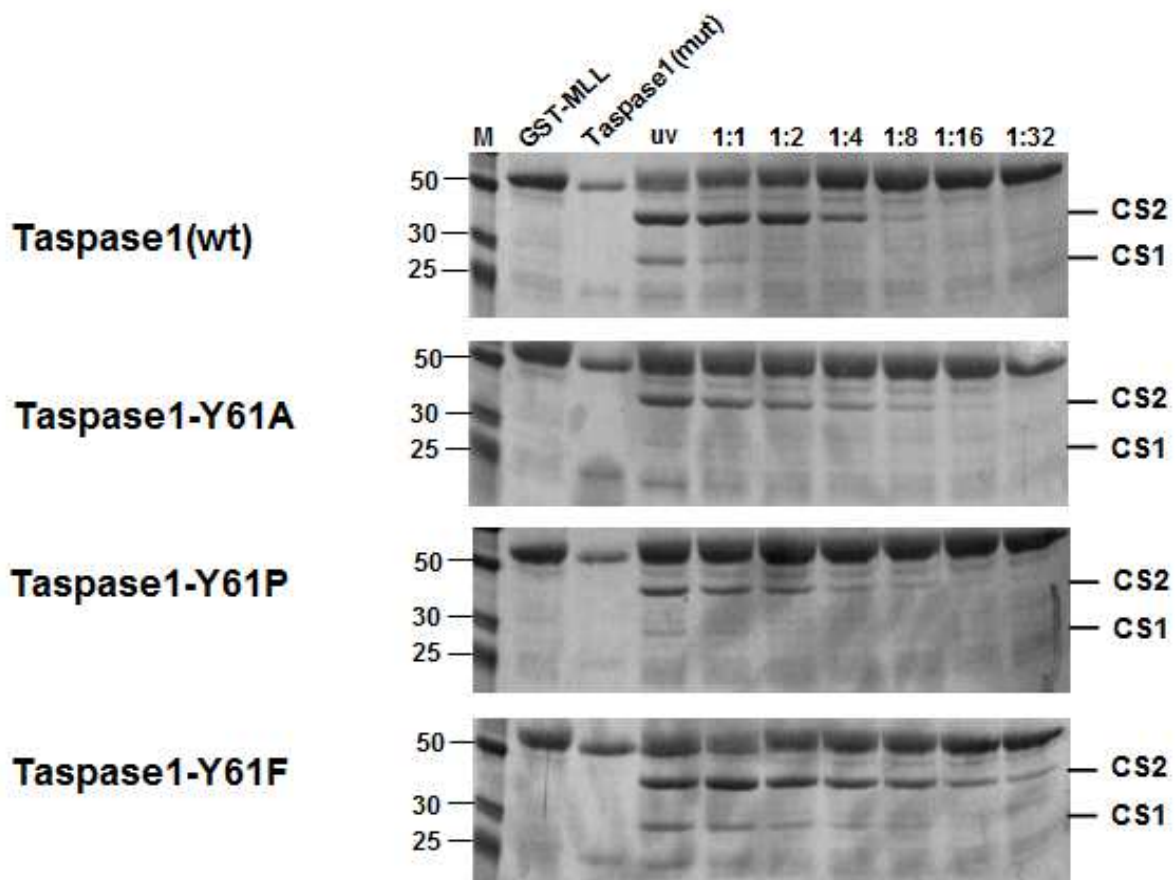
**Abb. 3.7 Intrinsischer Inhibitor-Mechanismus der Taspase1**

Links: Das Chlorid-Ion (gelb) im katalytischen Zentrum der Taspase1 (PDB-Code:2A8J) wird über Aminogruppen der Peptidbindungen der Aminosäuren Glycin-49, Asparagin-100, Threonin-243 und der Hydroxylgruppe des Tyrosin-61 über Wasserstoff-Brückenbindungen gebunden. Rechts: Durch die Substrat-Bindung wird das Chlorid-Ion verdrängt. Dabei dreht sich Threonin-234 um etwa 180° um den nukleophilen Angriff auf das Substrat starten zu können. An der Koordination beteiligte Aminosäuren sind in Form von „sticks“ dargestellt und beschriftet. Dieses Bild wurde anhand des Programmpackets Pymol erstellt.

Unter der Annahme, dass das gebundene Chlorid-Ion durch das Substrat aus der Bindetasche verdrängt und nach der Hydrolyse wieder in der Bindetasche zurückkehren kann, sollte deshalb die Funktion von Tyrosin-61 durch gezielte Mutagenese dieser Aminosäure in Alanin, Prolin und Phenylalanin analysiert werden. Tyrosin-61 wurde deshalb für Mutagenese ausgewählt, da es das Chlorid-Ion mit seiner Hydroxylgruppe bindet, während dieses von den anderen Aminosäuren – Glycin-49, Asparagin-100 und Threonin-234 – durch deren Peptidbindungen gebunden wird. Von den beiden Mutationen Y61A und Y61P wurde vorhergesagt, dass sie die Koordination des Chlorid-Ions derart stören sollten, dass sich das inhibitorische Chlorid-Ion möglicherweise auch ohne Substrat aus dem enzymatischen Zentrum entfernen lassen sollte. Mit der Mutation Y61F sollte genau das Gegenteil bewirkt werden, da die Aminosäure Phenylalanin größer ist als der Tyrosin-Rest an dieser Position. Dadurch sollte sich das Chlorid-Ion weniger leicht aus dem enzymatischen Zentrum entfernen lassen, bzw. die Rückkehr des Chlorid-Ions erschwert werden. Dadurch sollte es auf jeden Fall zu einer messbaren Beeinträchtigung der Taspase1 Aktivität kommen. Alle drei Mutanten der Taspase1 zeigten eine minimal veränderte Aktivität im *in vitro* Taspase1-Assay, allerdings waren alle drei Mutanten nach wie vor in der Lage die Autoproteolyse korrekt



durchzuführen und - wenn auch mit verminderter Aktivität - ihr Substrat korrekt zu hydrolysieren. Die Unterschiede der Mutanten bezüglich ihrer Aktivität konnte erst in einer Verdünnungsreihe beobachtet werden. Während die Mutanten Y61A und Y61P verdünnt kaum noch aktiv waren, war die Y61F-Mutante im Vergleich zur Taspase1(wt) sogar bei einer stärkeren Verdünnung (1:32) noch in der Lage das GST-MLL zu schneiden (siehe Abb. 3.8). Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass nach initialer Verdängung des Chlorid-Ions durch das GST-MLL Substrat die Rückkehr des inhibitorischen Chlorid-Ions erschwert wird.

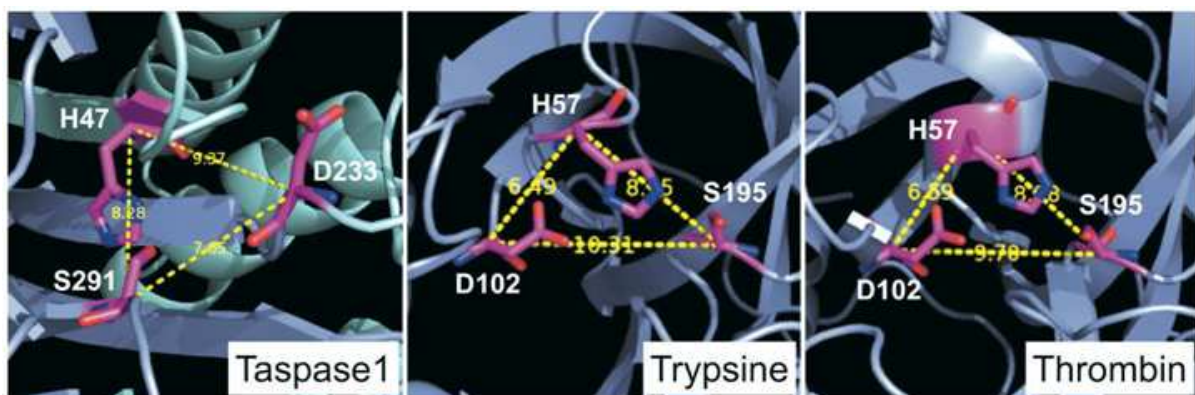


**Abb. 3.8 Proteolyse-Assay der Mutanten Y61A, Y61F und Y61P**

Taspase1-Mutanten wurden unverdünnt (uv) und verdünnt (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) mit GST-MLL 30 Minuten bei 37°C in einem Proteolyse-Puffer inkubiert und auf 15% SDS-Page aufgetragen. GST-MLL ohne Taspase1 und die jeweilige Taspase1-Mutante (10x) wurden als Kontrollen aufgetragen. Beim unverdünnten Einsatz der Mutanten, waren die resultierenden GST-MLL-Spaltprodukte bei 38 und 32 kDa zu sehen. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Mutanten konnten erst beim Vergleich der Aktivitäten innerhalb der Verdünnungsreihe beobachtet werden. Während die Mutanten Y61A und Y61P unverdünnt kaum noch aktiv waren, war die Y61F-Mutante im Vergleich zur Taspase1(wt) sogar bei einer stärkeren Verdünnung (1:8) noch in der Lage das GST-MLL zu schneiden.

### 3.3.2 Entdeckung einer Serin-Protease

Weiterhin wurde bei der Untersuchung der Bindetasche eine spezifische Anordnung von drei Aminosäuren entdeckt, die eine hohe geometrische Ähnlichkeit zu den bekannten katalytischen Triaden von Serin-Proteasen aufwies. In den Serin-Proteasen wie z.B. Trypsin oder Thrombin finden sich dazu jeweils ein Histidin-, ein Aspartat- sowie ein katalytisch aktiver Serin-Rest, die in einer Art Dreieck zueinander angeordnet sind. Eine ähnliche Situation findet man auch bei Taspase1: Histidin-47, Serin-291 und Aspartat-233 sind mit ähnlicher Geometrie und Abstand im Taspase1 Molekül angeordnet (siehe Abb. 3.9).

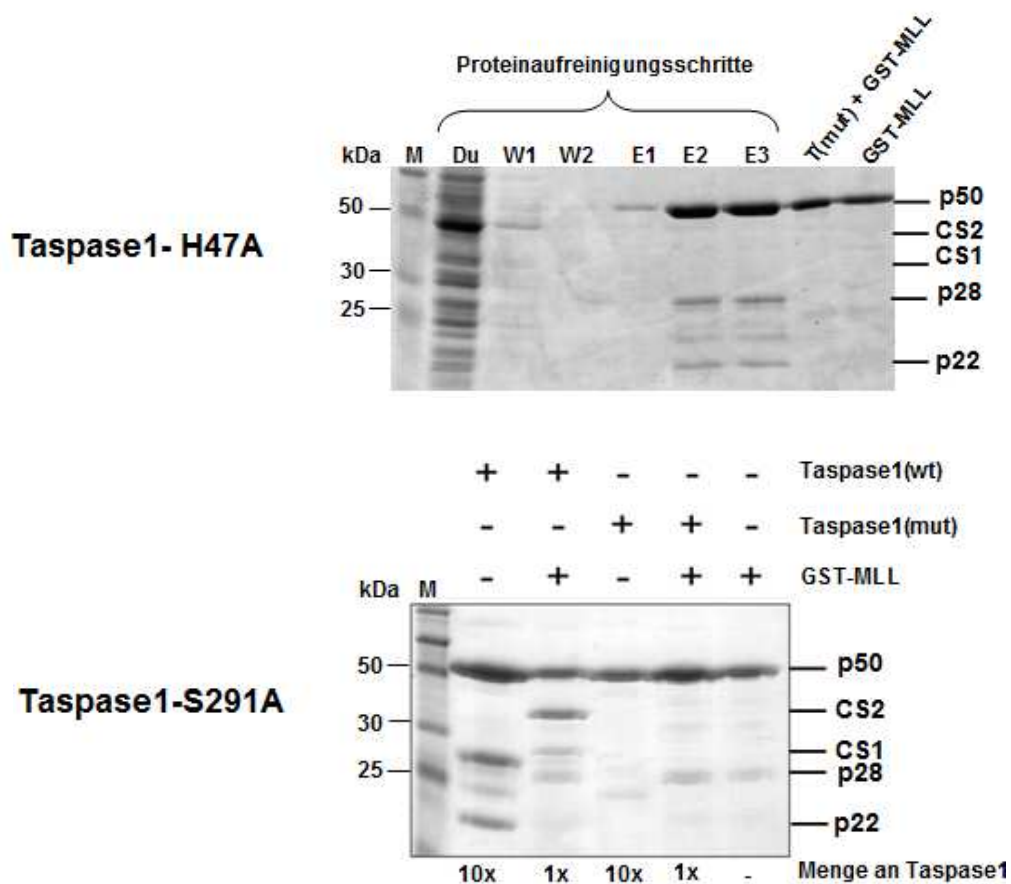


**Abb. 3.9 Vergleich der Triaden von Taspase1-Proenzym, Trypsin und Thrombin**

An der katalytischen Triade sind die Aminosäuren Histidin, Serin und Aspartat beteiligt. Die Abstände der einzelnen Aminosäuren sind in Angström angegeben. Dargestellt ist links Taspase1, in der Mitte Trypsin und rechts Thrombin.

Da Serin-Protease-Inhibitoren allerdings nicht die Substrat-Proteolyse der Taspase1 hemmen können, wurde postuliert, dass nach Reinigung der rekombinanten Taspase1 aus *E. coli* bereits soviel Taspase1 im autoproteolytisch aktivierten Zustand vorhanden ist, dass eine Hemmung durch Serin-Protease-Inhibitoren nicht mehr möglich ist, bzw. die Menge an bereits aktivierter Taspase1 ausreichend ist, so dass keine Hemmung der Substrat-Proteolyse in den durchgeführten Experimenten zu beobachten ist. In der Tat findet man nach Affinitätsaufreinigungen aus *E. coli* ca. 50% der gereinigten Taspase1 als p50 (nicht-proteolytisch aktivierte Taspase1) und ca. 50% in der bereits aktivierten Form, mit einer p28 ( $\alpha$ -Untereinheit) und p22 ( $\beta$ -Untereinheit). Desweiteren wurde postuliert, dass die autokatalytische Spaltung der Taspase1 durch einen Serin-Protease-Mechanismus stattfindet.

Aufgrund der besonderen Anordnung von Histidin-47, Serin-291 und Aspartat-233 wurden wiederum Mutanten hergestellt, um die Funktion dieser spezifischen Aminosäuren zu testen. Die Mutation D233A wurde bereits von Khan *et al.* verwendet. Diese Mutante war bereits als autokatalytisch inaktive Variante der Taspase1 beschrieben worden (Khan *et al.*, 2005). Daher wurden nur die Aminosäuren Histidin-47 und Serin-291 in Alanin mutiert. Die Mutation H47A hatte keinerlei Auswirkungen auf die autoproteolytische Aktivität der Taspase1, dennoch war diese Mutante zur Substratproteolyse nicht fähig. Die Mutation S291A führte zu einer autoproteolytisch und Substrat-proteolytisch inaktiven Taspase1 (siehe Abb. 3.10).



**Abb. 3.10** Proteolyse-Assays der Taspase1-H47A und Taspase1-S291A Mutante

Auf den beiden 15%-igen SDS-PAGE sind oben die Proteinaufreinigungsschritte und Proteolyse-Assay von H47A-Mutante zu sehen und unten das Proteolyse-Assay von S291A mit 1) Marker, 2) Taspase1(wt), 3) Taspase1 in Inkubation mit dem GST-MLL als Kontrolle, 4) S291A-Mutante und 5) in Inkubation mit dem GST-MLL und 6) GST-MLL alleine als Kontrolle aufgetragen. Es ist zu sehen, dass die Mutante H47A zur Autokatalyse fähig, zur Substrathydrolyse aber nicht befähigt ist. Die Mutante S291A ist völlig inaktiv. Sowohl die Autokatalyse-Fragmente p28 und p22 als auch die resultierenden GST-MLL-Spaltprodukte p38 und p32 fehlen.

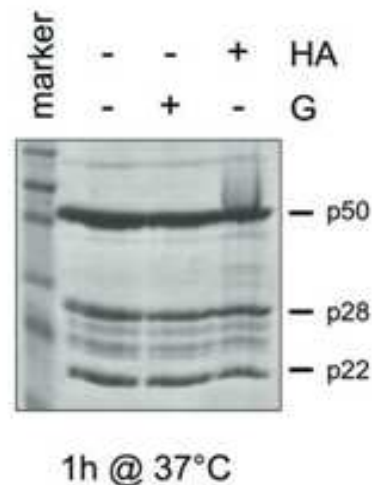
### 3.3.3 Überprüfung eines alternativen Autokatalyse-Mechanismus

Um den Mechanismus der Autoproteolyse genauer zu untersuchen, wurde Hinweisen aus der Literatur nachgegangen. Es war bereits bekannt, dass eine Autoproteolyse innerhalb der Familie der "Glycosylasparaginase" (GA) nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus funktionieren sollte. Taspase1 wurde aufgrund der Sequenzhomologie dieser Proteinfamilie zugeordnet (Hsieh et al., 2003). Der N-O-Acyl-shift-Mechanismus beruht auf der Anwesenheit einer unter Spannung stehenden Peptidbindung zwischen einem Aspartat (D151) und der nachgeschalteten Aminosäure (Qian *et al.*, 2003).

N-O-Acyl-shift kommt in Nachbarschaft von Threonin-, Serin- oder Cysteinresten in Polypeptiden vor. Der nukleophile Angriff der Aminosäuren-Seitenkette an dem Carbonyl-Kohlenstoff der spaltbaren Peptidbindung führt zu einem (Thio)-Esterbindung-Zwischenprodukt (Albert et al., 1998; Ekstrom et al., 2001). Von dem (Thio)-Ester-Zwischenprodukt durchläuft eine Gruppe von verschiedenen Proteinen diverse Arten von Autokatalyse, indem sie diesen mit einem zweiten Nukleophil angreifen, was zu einem Schnitt der Verbindungen zwischen Threonin, Serine oder Cystein und der Vorläufer-Aminosäure führt. Normalerweise begünstigt das Gleichgewicht eines N-O-Acyl-shifts die Amidbindung, was zu einer Peptidbindung führt, die nicht oft am Threonin, Serin oder Cystein bricht. Die Tatsache, dass sich einige Proteine an den spaltbaren Peptidbindungen selbst prozessieren können legt nahe, dass diese keine typischen Peptidbindungen sind. Diese Auffassung wurde durch die kristallographischen Analysen der autoproteolytisch aktiven GA-Vorläufer in Komplex mit einem reversiblen Glycin-Inhibitor gestützt, die zeigten, dass das Rückgrat in der unmittelbaren Nähe der spaltbaren Peptidbindung in verdrehter bzw. deformierter *trans*-Konformation vorliegt (Xu et al., 1999; Qian et al., 2003).

Studien an anderen Vertretern dieser Proteinfamilie hatten bereits gezeigt, dass in Anwesenheit von 500 mM Hydroxylamin die N-O-Acyl-shift-Reaktion massiv beschleunigt werden kann, während 20 mM Glycin diese Reaktion vollständig inhibieren kann. Aus diesem Grund wurde Affinitäts-gereinigte Taspase1 mit diesen beiden Chemikalien in den angegebenen Konzentrationen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die Menge an p50, p28 und p22 mit unbehandelter, aber ebenfalls für 1 Stunde bei 37°C inkubierter Taspase1 verglichen. Dabei zeigte sich, dass keinerlei Veränderungen der Mengen an autokatalytisch prozessiertem Taspase1 Enzym zu beobachten waren (siehe Abb. 3.11). Zudem findet sich in

der Kristallstruktur keine unter Spannung stehende Peptidbindung zwischen den beiden Aminosäuren Aspartat-233 und Threonin-234. Aufgrund dieser Daten und Ergebnisse wurde der Schluss gezogen, dass der N-O-Acyl-shift-Mechanismus nicht für Taspase1 gültig ist, sondern dass Taspase1 nach dem oben beschriebenen Serin-Protease-Mechanismus autokatalytisch aktiviert wird.



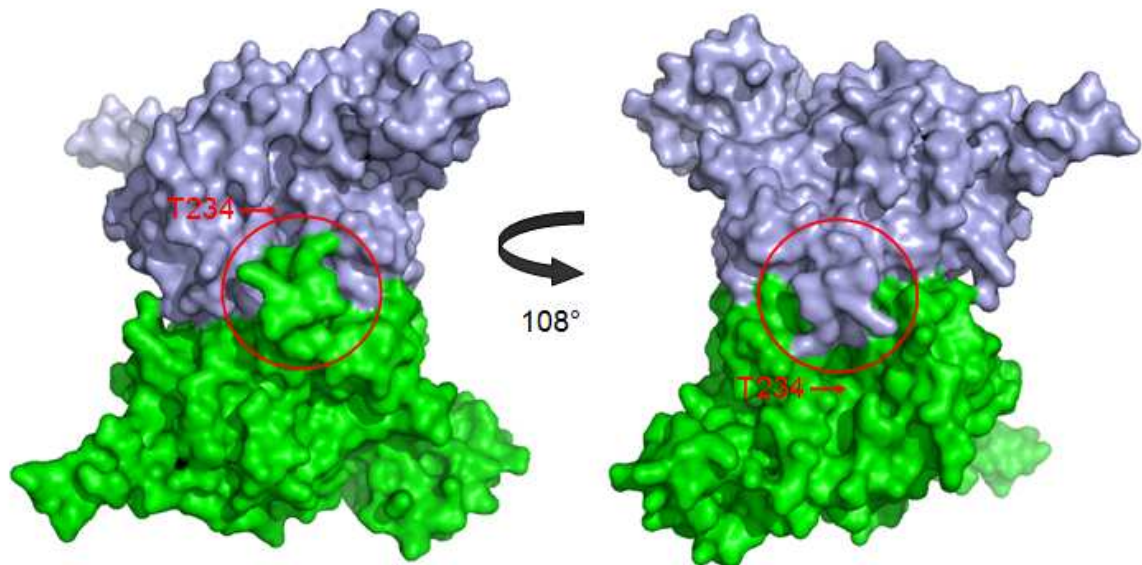
**Abb. 3.11 Taspase1-Inkubation mit Hydroxylamin und Glycin**

Auf dem SDS-PAGE wurden 20 µl Taspase1-Aufreinigung nach einstündiger Inkubation mit 500 mM Hydroxylamin bzw. 20 mM Glycin bei 37 °C aufgetragen. Es ist zu sehen, dass die Autokatalyse der Taspase1 weder durch Hydroxylamin beschleunigt noch durch Glycin blockiert wird.

## 3.4 Untersuchung des Protein-Interfaces

### 3.4.1 Identifizierung und Mutation wichtiger Aminosäuren im Interface

Bei der Untersuchung der neu modellierten Taspase1 fiel zunächst auf, dass beide Taspase1 Monomere eine Proteindomäne aufweisen - im Folgenden als „Zapfen“ benannt - die direkt Unterhalb des katalytischen Zentrums in die jeweils andere Untereinheit hineinragt (siehe Abb. 3.12). Diese "zapfenförmige Domäne" besteht aus den Aminosäuren 154 bis 162 und könnte - so wurde postuliert - für den Dimerisierungsprozess von Bedeutung zu sein. Erstaunlicherweise war dieser Zapfen nicht in dieser Form in der publizierten Kristallstruktur sichtbar gewesen; dies deutet daraufhin, dass es sich hierbei um eine wenig strukturierte Domäne von Taspase1 handelt.



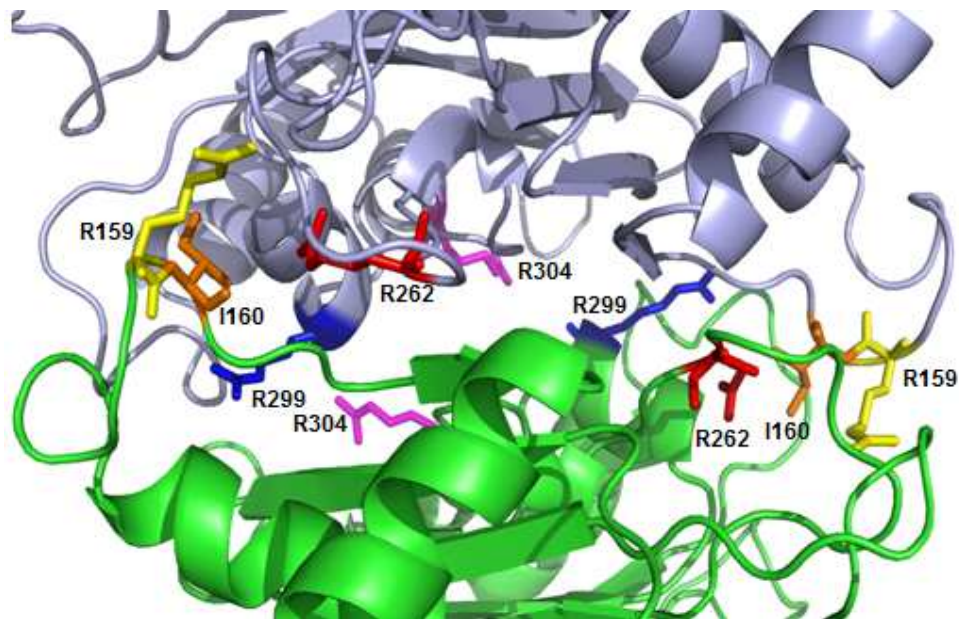
**Abb. 3.12 Darstellung der „Zapfen-Domäne“**

Dargestellt ist die vervollständigte PDB-Struktur der Tspase1 von vorne (links) und von hinten (rechts) bei einer Drehung von  $108^\circ$ . Kette A ist in cyan und Kette B in grün farblich markiert. Mit der Funktion „surface“ des Pymol-Programm-Packets konnte die Oberfläche des Proteins sichtbar gemacht werden. Die Zapfen-Domäne der jeweiligen Kette, die mit der anderen Kette gekoppelt ist, ist durch einen roten Kreis gekennzeichnet und befindet sich unmittelbar unterhalb des katalytischen Zentrums. Der rote Pfeil markiert die Position des katalytischen Threonins-234.

Da sich diese Domäne in so enger räumlicher Nähe zum Katalysezentrum des jeweiligen Tspase1 Monomers befindet, wurde darüber spekuliert, ob (1) die Dimerisierung etwas mit der Tspase-Aktivität, oder aber, (2) ob die Dimerisierung etwas mit der Autokatalyse der Tspase1 Monomere zu tun haben könnte. Um diese beiden Hypothesen experimentell zu verifizieren wurde die Protein-Protein-Kontaktfläche bzw. das Interface der beiden Tspase1 Monomere *in silico* untersucht. Dabei fiel auf, dass sehr viele Arginine in diesem Bereich der Tspase1 vorkommen. Auch aus anderen Interface-Untersuchungen geht hervor, dass die Aminosäure Arginin oftmals vertreten ist (Chakrabarti *et al.*, 2002). Von einigen Aminosäuren innerhalb des Interaktions-Interfaces wurde postuliert, dass sie einen wesentlichen Beitrag zu Protein-Protein-Wechselwirkungen, z.B. in Form von Wasserstoff-Brückenbindungen oder  $\pi$ -Stacking leisten. Diese wurden dann für eine gezielte Mutagenese ausgewählt, um den Einfluss dieser Aminosäuren auf die Tspase1 Auto- und Substrat-Proteolyse zu untersuchen. Es wurden Interaktionen in Form von Wasserstoff-Brücken-

bindungen zwischen folgende einzelne Aminosäuren der beiden Taspase1 Monomere postuliert:

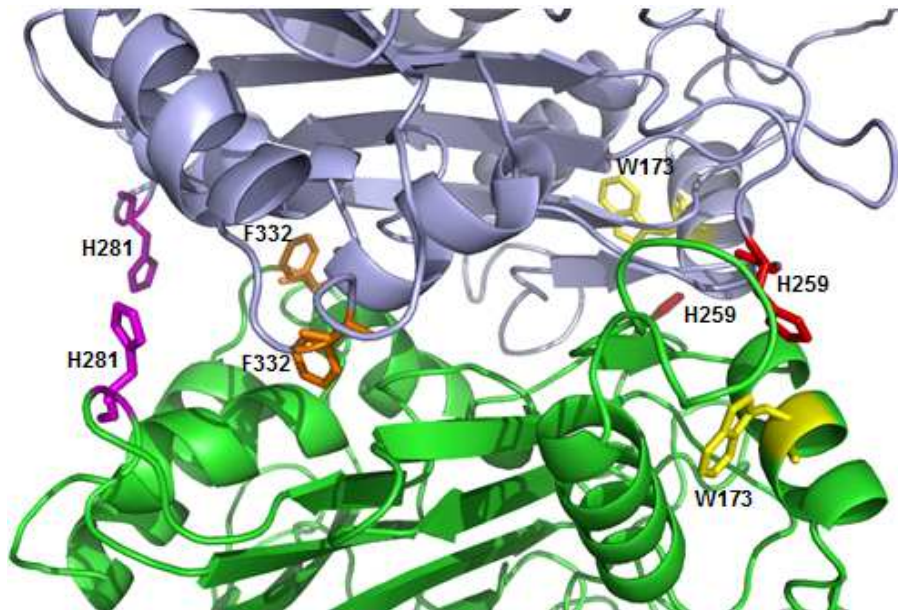
Arginin-159 .....Leucin-257  
 Isoleucin-160.....Glutaminsäure-295  
 Arginin-262.....Isoleucin-160  
 Arginin-299..... Asparagin-126  
 Arginin-304..... Arginin-304 (siehe Abb. 3.13)



**Abb. 3.13 Darstellung des Interfaces von Taspase1**

Dargestellt ist das Interface der Taspase1: Kette A (cyan) und Kette B (grün). Aminosäuren, von denen ein Beitrag zur Protein-Protein-Wechselwirkung in Form von H-Brückenbindung postuliert wurden, sind in Form von „Sticks“ und farblich dargestellt: Arginin-159 (gelb), Isoleucin-160 (orange), Arginin-262 (rot), Arginin-299 (blau) und Arginin-304 (pink).

$\pi$ -Stacking-Interaktionen existieren innerhalb der Struktur von Taspase1 zwischen den Aminosäuren Histidin-281 und Phenylalanin-332, sowie zwischen Tryptophan-173 und Histidin-259 (siehe Abb. 3.14). Die aromatischen Ringe des Histidins-281 und des Phenylalanins-332 sind parallel zueinander positioniert und haben einen Abstand von 8,3 Å zueinander. Die aromatischen Ringe des Tryptophans-173 und des Histidins-259 sind T-förmig zueinander positioniert mit einem Abstand von 4,24 Å.



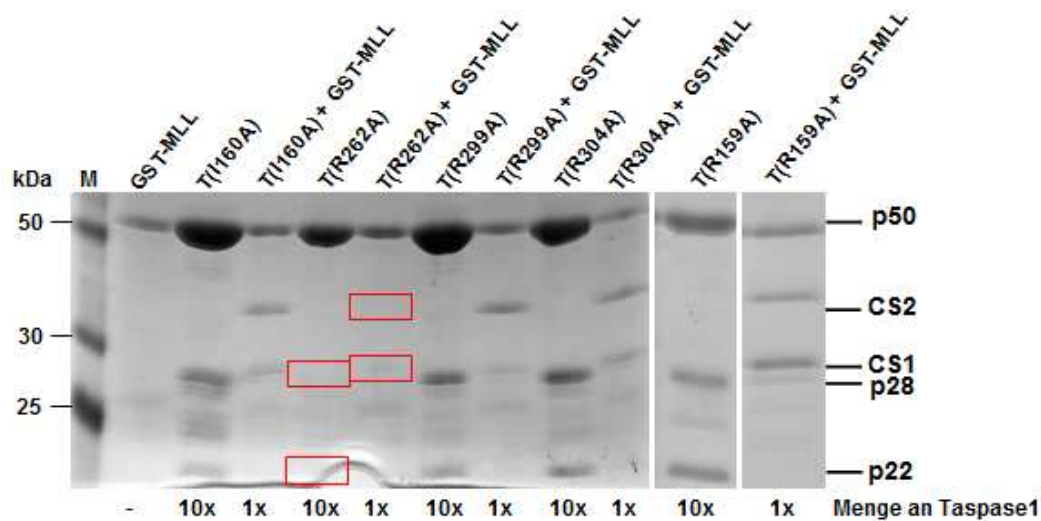
**Abb. 3.14 Darstellung der postulierten  $\pi$ -Stackings innerhalb der Dimerisierungsebene**

Dargestellt ist das Interface der Taspase1: Kette A (cyan) und Kette B (grün). Aminosäuren, von denen ein Beitrag zur Protein-Protein-Wechselwirkung in Form von  $\pi$ -Stacking postuliert wurde sind in Form von „Sticks“ und farblich dargestellt. Es wurde  $\pi$ -Stackings zwischen Tryptophan-173 (gelb) und Histidin-259 (rot) sowie zwischen Histidin-281 (pink) und Phenylalanin-332 (orange) postuliert.

Die Aminosäuren Arginin-159, Isoleucin-160, Trptophan-173, Histidin-259, Arginin-262, Histidin-281, Arginin-299, Arginin-304 und Phenylalanin-332 wurden unter Verwendung eines kommerziellen Mutagenese Kits (siehe Material und Methoden) alle zu Alanin mutiert. Alle mutierten Taspase1-Plasmide wurden anschließend in dem Expressionsstamm BL 21\*DE3 transformiert, die Proteinexpression induziert, und die mutierten Taspase1-Proteine durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und final in Taspase1-Proteolyse-Puffer umgepuffert. Um die Autoproteolyse und Proteolyse-Aktivität dieser Mutanten zu testen wurden die Taspase1-Mutantenproteine ohne oder mit dem GST-MLL Substratprotein für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Bande der Mutanten-Proteine auf dem SDS-PAGE sichtbar zu machen, wurden sie für den Autoproteolyse-Test in 10-facher Konzentration eingesetzt, während sie bei dem Substrat-Proteolyse-Aktivitäts-Test nur in 1-facher Konzentration eingesetzt wurden. Schließlich wurden die Assays auf dem SDS-PAGE aufgetragen (siehe Abb. 3.15, Abb. 3.16 und Abb. 3.17).



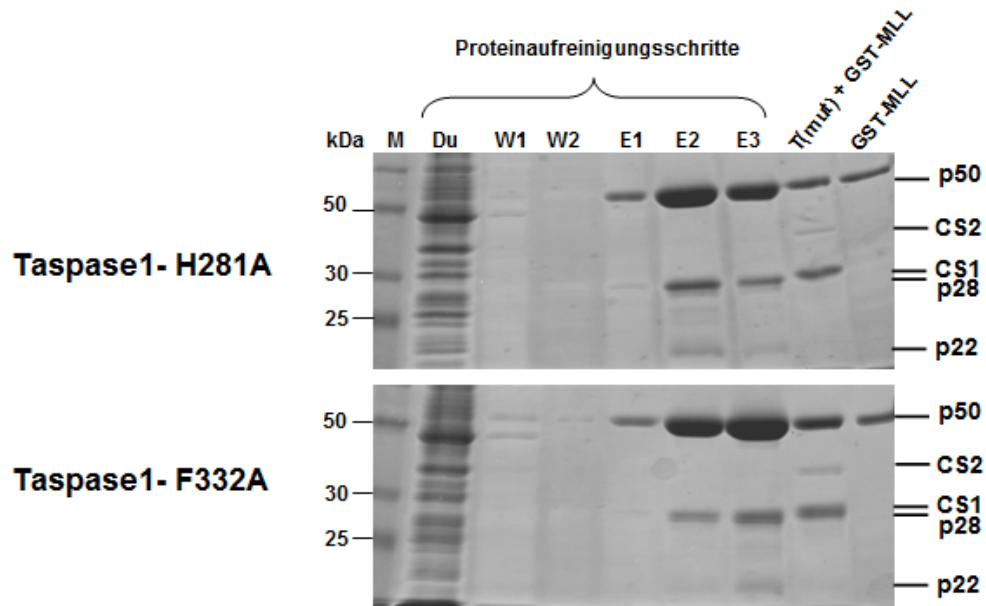
Wie aus der Abb. 3.15 zu entnehmen, ist die Mutante Taspase1-R262A nicht fähig sich autokatalytisch zu prozessieren, denn die beiden Banden bei 28 und 22 kDa waren nicht sichtbar. Diese Mutante ist daher auch nicht fähig ihr Substrat zu schneiden. Dementsprechend fehlten auch die typischen Spaltprodukte bei 38 kDa (CS2) und 32 kDa (CS1) (siehe Abb. 3.15).



**Abb. 3.15 Analyse der Autokatalyse- und Proteolyse-Aktivität auf dem SDS-PAGE**

Auf dem 15%-igen SDS-PAGE sind der Marker, das Substrat GST-MLL und die Mutanten (10x) ohne Substrat und in Inkubation mit dem Substrat (1x) dargestellt. Wie zu sehen ist sind die Mutanten I160A, R299A, R304A und R159A weiterhin in der Lage sich autokatalytisch zu aktivieren und ihr Substrat zu schneiden. Lediglich die Mutante R262A ist autokatalytisch inaktiv (die Banden 28 und 22 kDa fehlen, roter Kasten) und ist nicht fähig ihr Substrat zu schneiden (die Banden 38 und 32 kDa fehlen, roter Kasten).

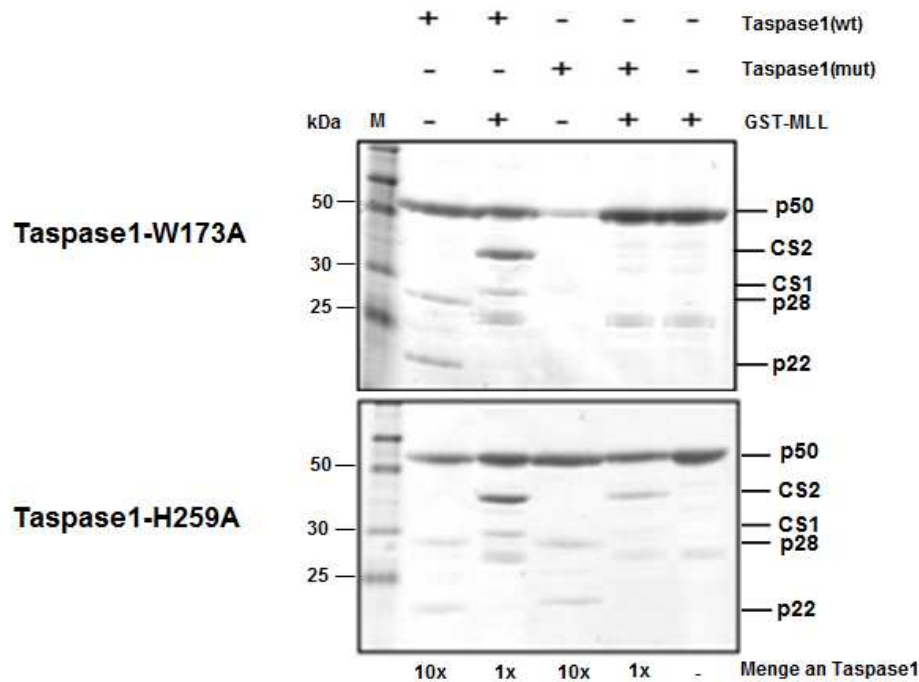
Wie auf der Abb. 3.16 zu beobachten ist, ist die Mutation der Taspase1-Histidin-281 und – Phenylalanin-332 - die für ein  $\pi$ -Stacking vorhergesagt wurden - autokatalytisch intakt. Sie können ebenfalls ihr Substratprotein hydrolysieren. Allerdings scheint hier die Hydrolyse an CS1 gegenüber CS2 bevorzugt zu werden, da die Bande bei 32 kDa in beiden Assays dicker waren als die Bande bei 38 kDa (siehe Abb. 3.16).



**Abb. 3.16 Darstellung der Aufreinigungen der Taspase1-H281A und -F332A und dessen Proteolyse-Assays**

Dargestellt sind zwei 15%-ige SDS-PAGE, auf dem die einzelnen Aufreinigungsschritte und die Proteolyse-Assays der jeweiligen Mutante aufgetragen sind. In den E2 und E3 sind die typischen Banden von der aktiven Taspase1 am Besten zu sehen. Beide Mutanten spalten ihr Substrat, wobei CS1 gegenüber CS2 bevorzugt wird. Rechts ist das Substrat allein zur Kontrolle aufgetragen.

Auf Abb. 3.17 sind die Ergebnisse der beiden  $\pi$ -Stacking-Mutanten Taspase1-H259A und -W173A zu sehen. Während die H259A-Mutante auch weiterhin autokatalytisch und proteolytisch aktiv war, zeigte die W173A-Mutante keine autoproteolytische Aktivierung und war zur Substrathydrolyse nicht mehr befähigt (siehe Abb. 3.17).



**Abb. 3.17** Proteolyse-Assays der Mutanten Taspase1 - W173A und - H259A

Auf den beiden 15%-igen SDS-PAGE sind der Marker (M), Taspase1(wt) und Taspase1 in Inkubation mit dem GST-MLL als Kontrolle, die Taspase1-Mutanten ohne und in Inkubation mit dem GST-MLL und GST-MLL alleine als Kontrolle aufgetragen. Es ist zu sehen, dass die Mutante Taspase1-W173A weder autokatalytisch noch proteolytisch aktiv ist, während die Mutante Taspase1-H259A im Vergleich zu Taspase1(wt) gerinfügiger, aber doch aktiv ist.

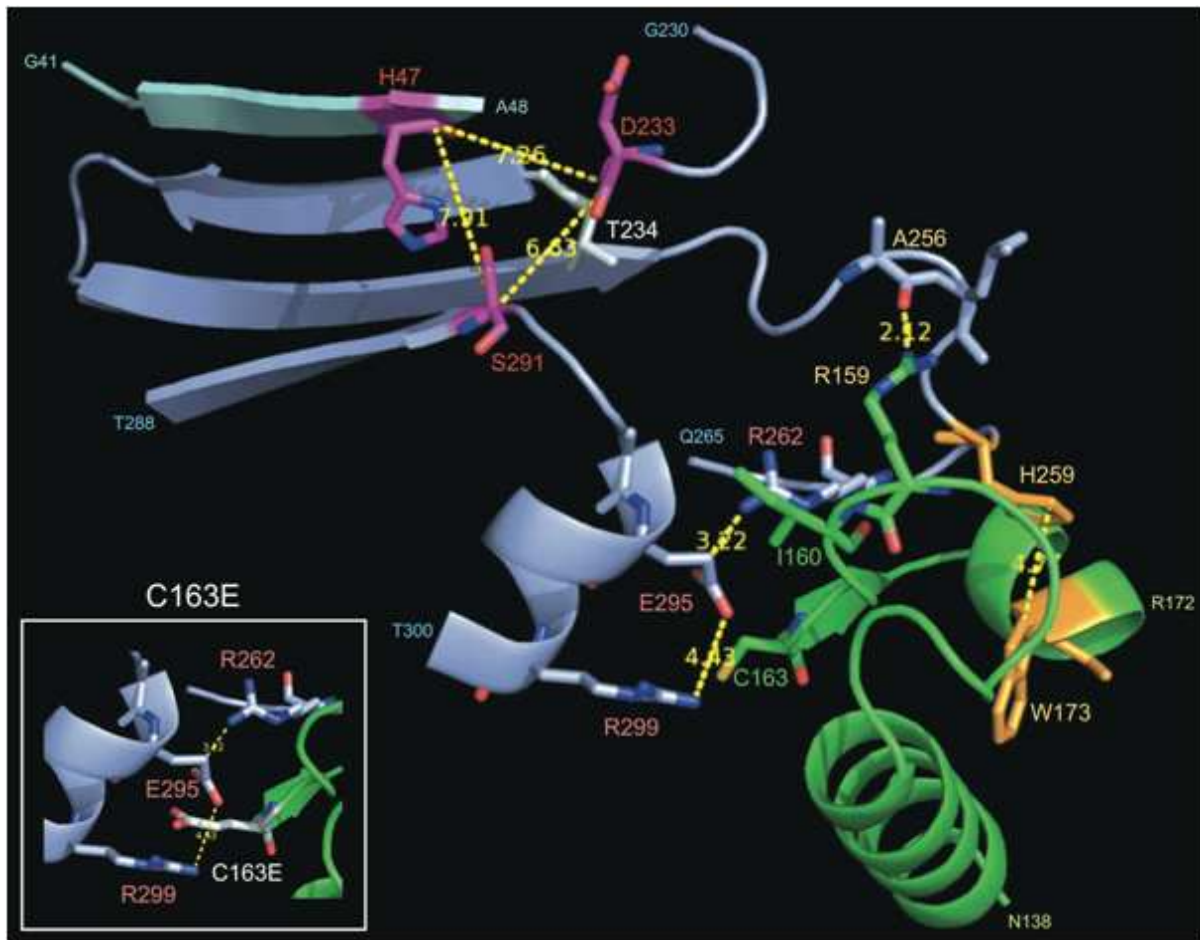
## 3.5 Die Funktionsweise der Taspase1

### 3.5.1 Postulierter Taspase1-Aktivierungsmechanismus

Die Mutations-Ergebnisse zeigten, dass die drei Aminosäuren Serin-291, Arginin-262 und Tryptophan-173 für den Aktivierungsmechanismus wichtig sein müssen, da die Alanin-Varianten von Taspase1 vollständig inaktiv waren (Auto- und Substratproteolyse). Aufgrund dieser Ergebnisse war es wichtig die Region unterhalb des katalytischen Zentrums genauer zu untersuchen. Die Positionen dieser drei Aminosäuren und die Ladungsverteilung in diesem Bereich ließen einen spezifischen Aktivierungsmechanismus vermuten. Im Folgenden wird dieser postulierte Mechanismus beschrieben: Zwei Taspase1-Monomere binden aneinander, wobei dabei die zapfenförmigen Domänen jeweils unterhalb des katalytischen Zentrums des anderen Monomers binden. Exemplarisch ist einer dieser zapfenförmigen Domänen in grün in

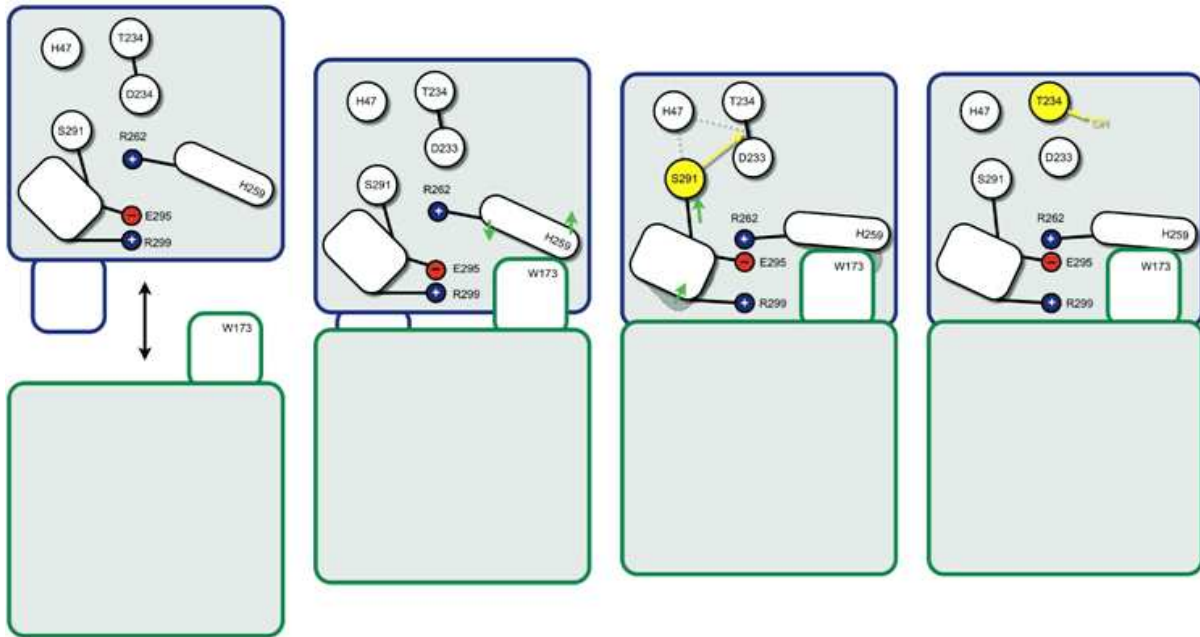
Abb. 3.18 dargestellt. Der Zapfen ist in der Lage Wechselwirkungen zu bestimmten Aminosäuren des gegenüberliegenden Monomers auszubilden ( $\pi$ -Stacking: Tryptophan-173 mit Histidin-259 mit einem Abstand von ca. 4,8 Å; H-Brückenbindung: Arginin-159 mit dem Peptid-Rückgrad zwischen Alanin-256/Leucin-257 mit einem Abstand von ca. 2,1 Å). Dabei ist anscheinend die  $\pi$ -Stacking-Wechselwirkung zwischen Tryptophan-173 und Histidin-259 wichtiger, da die Mutation R159A keinen Einfluss auf die Dimerisierungsfähigkeit oder Autoproteolyse von Taspase1 hatte.

Das Andocken der zapfenförmigen Domäne führt nun zu einer geringen Abwärts-Bewegung von Arginin-262 in Richtung Glutaminsäure-295. Die Glutaminsäure-295, die zuvor in Richtung Arginin-299 gerichtet war, wird nun in Richtung Arginin-262 orientiert. Da Glutaminsäure-295 nur drei Aminosäuren von Serin-291 entfernt liegt, macht diese geringfügige Bewegung eine Neupositionierung des Serins-291 möglich, die dann den autokatalytischen Schritt (Spaltung der Peptidebindung zwischen Aspartat-233 und Threonin-234) katalysieren kann. Diese nukleophile Hydrolyse führt zur Bildung der alpha- und beta-Untereinheiten von Taspase1 und ermöglicht so die Katalyse von Substratproteinen mit entsprechenden Erkennungssequenzen durch das nun vorhandene, N-ständige Threonin, bzw. seiner freien Hydroxylgruppe (siehe Abb. 3.19).



**Abb. 3.18 Postulierter Aktivierungsmechanismus von Taspase1**

Dargestellt sind die Aminosäuren G41-A48, T288-G230 und Q265-T200 des ersten Taspase1-Monomers (blau) und die Aminosäuren N138-W173 des zweiten Monomers (grün). Alle wichtigen Aminosäuren sind in Form von „Sticks“ dargestellt. Nach der Dimerisierung dockt die zapfenförmige Domäne des ersten Monomers über direkte Wechselwirkungen (Tryptophan(W)-173-Histidin(H)-259 (orange) und Arginin(R)-159-Alanin(A)-256) an das zweite Monomer. Dies führt zu einer leichten Konformationsänderung von Arginin(R)-262, die ihr ermöglicht direkte Kontakte zu Glutaminsäure(E)-295 einzugehen. Aktive Verschiebung der Glutaminsäure(E)-295 führt zu einer Bewegung des Serin(S)-291, welches dann die katalytische Triade (pink) für den autoproteolytischen Schritt ausbildet (Spaltung von Aspartat(D)-233/Threonin(T)-234 (weiß)). Alle Distanzen wurden mit der Funktion „Measurement“ des Pymols gemessen und sind in Angstrom angegeben. Für die katalytische Triade wurden die Abstände von Serin(S)-291 und Histidin(H)-47 zu der Peptidbindung von T234/233 gemessen. Der Kasten links zeigt die Folgen einer C163E-Mutation. Nach der Dimerisierung der Taspase1-Monomere, scheint die innere Bewegung des Glutaminsäure(E)-295 gesperrt zu werden. Die Anwesenheit von C163E verhindert die innere Bewegung der Glutaminsäure in Richtung Arginin(R)-262. Ohne diese spezifische Bewegung ist Serin(S)-291 nicht in der Lage, die Peptidbindung zwischen Aspartat(D)-233 und Threonin(T)-234 zu hydrolysieren. Somit scheint Cystein(C)-163 das gebundene Monomer in *trans* zu deaktivieren.



**Abb. 3.19 Schematische Darstellung der Taspase1-Aktivierungsmechanismus**

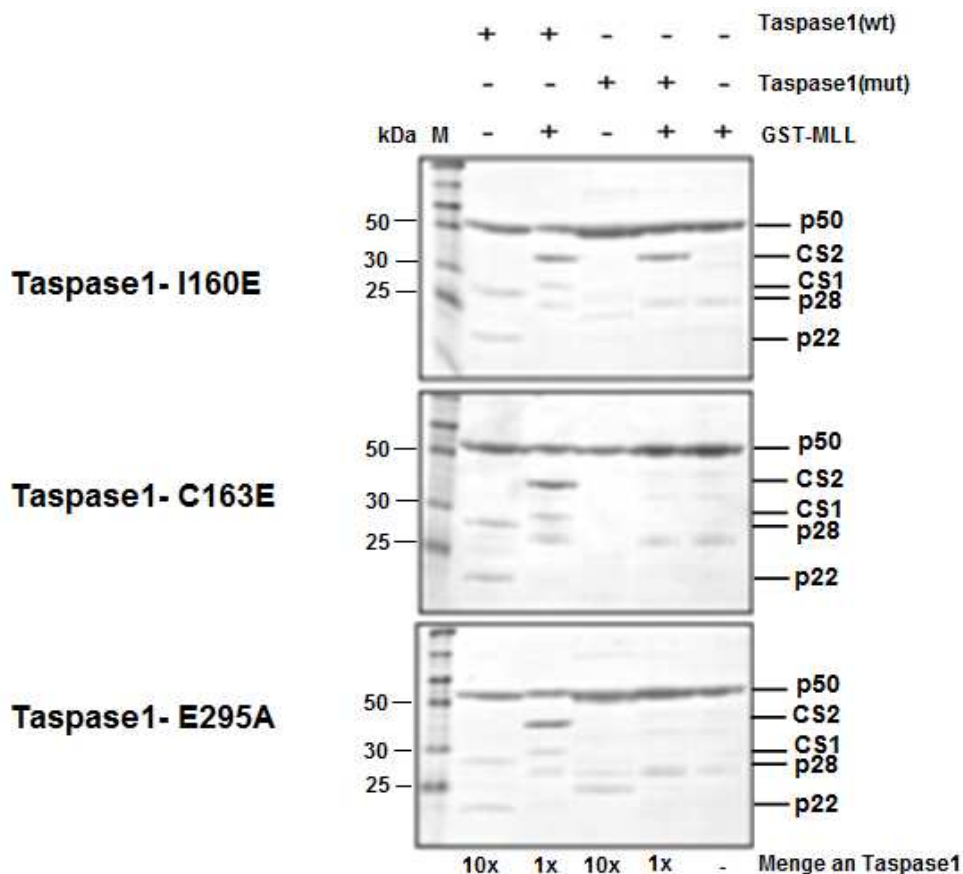
Das Schema zeigt den vollständigen Aktivierungsmechanismus der Taspase1. Die Dimerisierung verursacht geringfügige Veränderungen in der Struktur, die schließlich Serin-291 ermöglichen die Peptidbindung zwischen Aspartat-233 und Threonin-234 zu hydrolysieren. Dies führt zu einer aktiven Taspase1. Der gleiche Mechanismus gilt ebenfalls für die Aktivierung des gegenüberliegenden Taspase1-Monomers (grün umrandet).

Um diesen Aktivierungsmechanismus zu validieren, wurden die Aminosäuren Isoleucin-160, Cystein-163, Glutaminsäure-295 und Arginin-299 gezielt für weitere Mutationen ausgewählt. Isoleucin-160, Cystein-163 und Arginin-299 wurden jeweils in Glutaminsäure (E) mutiert, um eine zusätzliche negative Ladung in diese Region einzubringen, um dadurch zu beweisen, dass hier die Ladungen der Seitenketten - durch Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte - für den Mechanismus verantwortlich sind:

- I160E konkurriert mit Glutaminsäure-295 um die Wechselwirkung mit der positiv geladenen Aminosäure Arginin-262. Damit soll die Bewegung des Arginins-262 in Richtung Glutaminsäure-295 verhindert werden (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.19).
- C163E führt nach Bindung zweier Momomere zu einem negativen Ladungsüberschuss im Bereich der Glutaminsäure-295. Dadurch kann sich dieser nicht frei in Richtung des Arginins-262 bewegen, während die Orientierung hin zu Arginin-299 verstärkt wird (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.19).

- E295A entfernt die negative Ladung. Dadurch sollte die postulierte, Ladungsgetriebene Bewegung - nach Bindung zweier Monomere - in Richtung Arginin-262 nicht mehr erfolgen (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.19).

Die mutierten Plasmide wurden ebenfalls in dem Expressionsstamm BL21\*DE3 transformiert, die Proteinexpression induziert und entsprechende Proteine durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und schließlich in Taspase1-Proteolyse-Puffer umgepuffert. Für die Analyse der Autokatalyse- bzw. Proteolyse-Fähigkeit der Mutanten wurden diese auf einem SDS-PAGE aufgetragen. Wie in Abb. C zu sehen ist, sind alle Mutanten bis auf Taspase1-I160E völlig inaktiv. Allein Taspase1-I160E zeigt eine 50%-ige Beeinträchtigung seiner Autokatalyse- bzw. Proteolyse-Fähigkeit (siehe Abb. 3.20).



**Abb. 3.20 *In vitro* Hydrolyse-Assay der Taspase1-Varianten**

Auf den beiden 15%-igen SDS-PAGE sind der Marker (M), Taspase1(wt) (in 10-fach hoher Konzentration, 10x) und Taspase1 in Inkubation mit dem GST-MLL als Kontrolle, die Taspase1-Varianten ohne (10x) und in Inkubation mit dem GST-MLL (1x) und GST-MLL alleine als Kontrolle aufgetragen. Die Mutanten C163E, und E295A sind autokatalytisch (Banden bei 28 bzw.

22 kDa fehlen) und proteolytisch inaktiv (Banden bei 38 bzw. 32 kDa fehlen). Allein die Mutante I160E zeigt eine 50%-ige Beeinträchtigung seiner autokatalytischen und proteolytischen Aktivität.

### 3.5.2 Etablierung eines Testsystems zur Analyse der Dimerisierungsfähigkeit

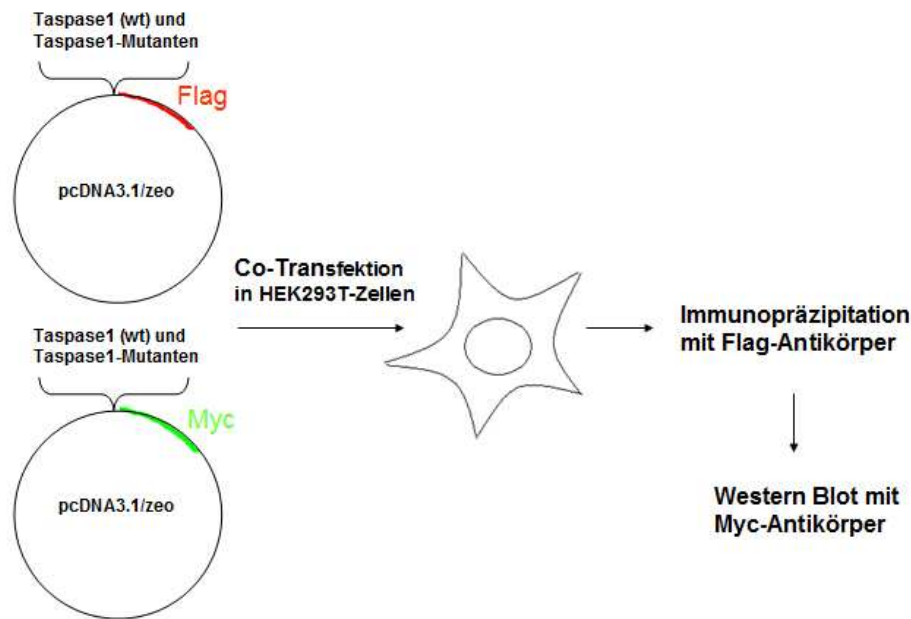
Neben den *in vitro* Untersuchungen zur Substrathydrolyse, muss noch überprüft werden, ob einzelne Mutanten überhaupt noch in der Lage sind, Homodimere Taspase1 Strukturen auszubilden. Um den Einfluss aller bisher vorgestellten Mutationen auf die Dimerisierung zu analysieren, wurden ihre Fähigkeiten, Homo- bzw. Heterodimere auszubilden durch Co-Immunoprecipitations-Experimente in HEK293T Zellen untersucht. Die Dimerisierung zwischen den Taspase1-Varianten wurde unter Verwendung eines Säuger-Expressionsvektors getestet (pcDNA 3.1/Zeo; Invitrogen, Darmstadt). Taspase1 und alle davon abgeleiteten Varianten wurden in diesem Vektor einkloniert; zuvor wurde dieser Standard-Vektor mit einem C-terminalen Flag- bzw. einem Myc-Tag (Hopp et al., 1988; Evan et al., 1985) versehen. Daraus gingen die folgenden 12 Plasmide für die Experimente hervor:

pcDNA3.1/zeo-Taspase1(wt)-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-W173A-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-R262A-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-I160E-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-C163E-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-E295A-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-T233D-Myc bzw. -Flag  
 pcDNA3.1/zeo-Taspase1-S291A-Myc bzw. -Flag

Diese Plasmide wurden wie folgt beschrieben in HEK293T-Zellen co-transfiziert (siehe Abb. 3.21):

1. Positiv-Kontrolle: pcDNA3.1/zeo-Taspase1(wt)-Myc und -Flag
2. pcDNA3.1/zeo-Taspase1(mut)-Myc und -Flag wurden co-transfiziert, um zu testen, ob die jeweiligen Mutanten zur Homodimerisierung fähig sind.
3. pcDNA3.1/zeo-Taspase1(wt)-Myc und pcDNA3.1/zeo-Taspase1(mut)-Flag wurden co-transfiziert, um zu testen, ob die jeweiligen Mutanten zur Heterodimerisierung mit dem Wildtyp-Taspase1 fähig sind.
4. Negativ-Kontrolle: pcDNA3.1/zeo -Myc und pcDNA3.1/zeo-Flag (mock)





**Abb. 3.21 Vorgang bei der Untersuchung der Homo-/Heterodimerisierung aller Taspase1-Mutanten**

Alle Flag- bzw. Myc-getagten Taspase1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Nach der Immunopräzipitation mit anti-Flag-Tag Antikörper, wurden alle Präzipitate mit einem anti-Myc-Tag Antikörper mittels Western Blot-Analyse detektiert.

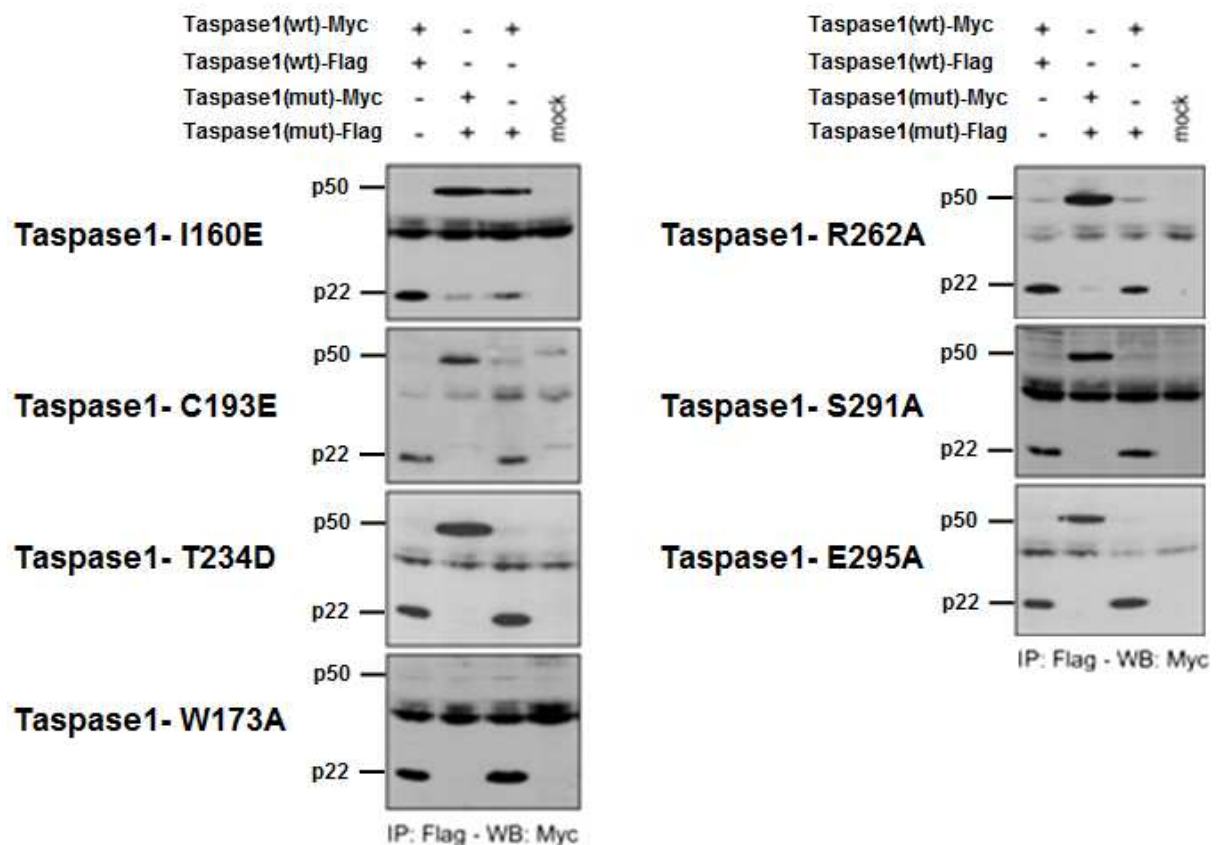
Immunopräzipitations-Experimente wurden anhand des anti-Flag-Tag Antikörper (Klone M2, Sigma, München) durchgeführt, während die Detektion von homo- oder heterodimerisierten Taspase1 Molekülen in Western-Blot-Experimenten unter Verwendung eines anti-Myc-Tag Antikörper (Klon 9 E10, Abcam, Cambridge, UK) durchgeführt wurde.

Wie in Abb. 3.22 zu sehen ist, wird bei allen Mutanten in der Positiv-Kontrolle (pcDNA3.1/zeo-Taspase1(wt)-Myc und -Flag) eine Bande bei 22 kDa detektiert. Das bedeutet zum Einen, dass die Dimerisierung stattgefunden hat, denn sonst wäre der Myc-Tag nicht zu detektieren gewesen. Zum Anderen bedeutet dies, dass das jeweilige Wildtyp-Monomer zur Autokatalyse fähig ist, da der C-terminale Myc-Tag mit der p22 Untereinheit der Taspase1 fusioniert ist.

In der Co-IP von pcDNA3.1/zeo-Taspase1(mut)-Myc und -Flag wird bei allen Mutanten eine Bande bei 50 kDa detektiert. Das bedeutet, dass in der Tat eine Homodimerisierung der mutierten Taspase1-Monomere stattgefunden hat, aber dass dieses Dimer nicht mehr zur

Autokatalyse befähigt ist (p50). Bei der Mutante Taspase1-I160E ist allerdings auch die p22 Bande zu sehen, da diese Mutante zu etwa 50% zur Autokatalyse fähig ist (siehe Abb. 3.22). In der Co-IP von pcDNA3.1/zeo-Taspase1(wt)-Myc und pcDNA3.1/zeo-Taspase1(mut)-Flag wird bei allen Mutanten eine Bande bei 22 kDa detektiert. Das bedeutet, dass die Heterodimerisierung des mutierten Taspase1-Monomers mit dem Wildtyp-Taspase1-Monomer stattgefunden hat und dass das Wildtyp-Monomer weiterhin zur Autokatalyse fähig ist. Bei der I160E-Mutante wird auch eine Bande bei 50 kDa detektiert, was darauf hinweist, dass diese fähig ist die Aktivität des Wildtyp-Monomers zu etwa 50% in *trans* zu blockieren (siehe Abb. 3.22).

In der Negativ-Kontrolle (pcDNA3.1/zeo-Myc und pcDNA3.1/zeo-Flag) ist jeweils der experimentelle Hintergrund für jedes der einzelnen Experimente sichtbar (siehe Abb. 3.22).



**Abb. 3.22 Co-Immunopräzipitations-Experimente von Flag- bzw. Myc-getagtem Taspase1-Varianten**

Aufgetragen wurden Co-Immunopräzipitations-Proben aus der Transfektion von 1) Taspase1-Myc und Taspase1-Flag als Positiv-Kontrolle, 2) mutierter Taspase1-Myc und mutierter Taspase1-Flag, 3) Wildtyp-Taspase1-Myc und mutierter Taspase1-Flag und 4) mock-Kontrolle. Das Fragment p22 wurde immer dann detektiert, wenn Dimerisierung und Autoproteolyse erfolgt waren. Das

Fragment p50 wurde immer dann detektiert, wenn Dimerisierung erfolgt, Autoproteolyse jedoch gehemmt worden war.

Dieses vorgeschlagene Modell zur intrinsischen Aktivierungs-Mechanismus von Taspase1 wird durch drei der untersuchten Mutationen bestätigt:

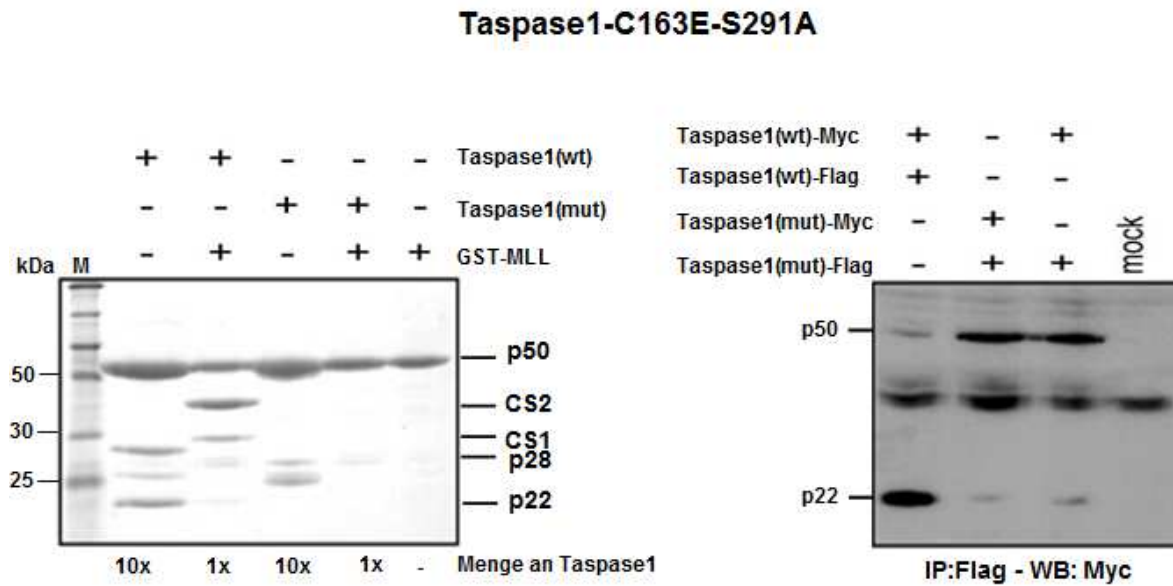
1. Die Mutation R262A verhindert die Bewegung von Glutaminsäure-295 in Richtung Arginin-262, da nun die attraktierende positive Ladung fehlt. So wird jegliche Aktivität von Taspase1 verhindert, obwohl die Homo- bzw. Heterodimerisierung nicht beeinträchtigt war (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.22).
2. Im Falle der E295A-Mutation wird die wichtige negative Ladung entfernt. Dies verhindert die Orientierung von Glutaminsäure-295 nach der Dimerisierung in Richtung Arginin-262. Auch diese Mutation verhindert jegliche Aktivität der Taspase1, obwohl auch hier keine Beeinträchtigung der Homo- bzw. der Heterodimerisierung sichtbar war (siehe Abb. 3.18, Abb. 3.22).
3. Die Mutation C163E in der zapfenförmigen Domäne schafft eine Situation, in der die Beweglichkeit von Glutaminsäure-295 sowohl räumlich als auch durch die zusätzliche negative Ladung beeinträchtigt wird. Diese Mutante war ebenfalls zur Homo- und Heterodimerisierung befähigt (siehe Abb. 3.22), allerdings war die autoproteolytische Aktivierung und damit auch die Substrat-Hydrolyse blockiert.

Aufgrund dieser Daten wurde gefolgert, dass Taspase1 sequenziell aktiviert wird:

1. Eine Dimerisierung verursacht eine geringfügige, strukturelle Veränderung.
2. Die induzierte Bewegung des Arginin-262 führt zu einer Delokalisierung von Glutaminsäure-295.
3. Diese strukturelle Veränderung verursacht wiederum eine Neupositionierung des Serin-291.
4. Serin-291 triggert die Autoproteolyse der Peptidbindung zwischen Aspartat-233 und Threonin-234.
5. Dies setzt das Threonin-234 innerhalb des katalytischen Zentrums frei.
6. Bindung des entsprechenden Substrates verdrängt das Chlorid-Ion und ermöglicht den nukleophilen Angriff des Threonin-243 auf das Substrat.

### 3.6 Etablierung einer *trans*-dominant-negativen Taspase1-Variante (tdnTASP1)

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde eine Doppelmutante Taspase1-C163E-S291A hergestellt. Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, verhindert die Taspase1-S291A-Mutante den intrinsischen Autoproteolyse-Mechanismus. Daher kann diese Mutante durch die Dimerisierung mit einem anderen Monomer nicht aktiviert werden (siehe Abb. 3.22). Die zusätzliche Mutation C163E innerhalb der zapfenförmigen Domäne verhindert die bereits erwähnte Bewegung von Glutaminsäure-295 in Folge einer Dimerisierung und blockiert somit die Repositionierung des Serins-291 eines gebundenen Taspase1-Monomers. Wie in Abb. 3.23 zu sehen ist, ist die Doppelmutante zur Substrathydrolyse nicht fähig (siehe Abb. 3.23, links). Daher sollte die Bindung dieser Doppelmutante an einem Wildtyp-Taspase1-Monomer zu einem enzymatisch inaktiven Heterodimer führen und die Substrathydrolyse sollte blockiert sein. Um diese Hypothese zu testen, wurden Wildtyp-Taspase1-Myc und Taspase1-C163E-S291A-Flag in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Anschließend wurden Co-Immunopräzipitations-Experimente und der Protein-Nachweis durch Western Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden Homodimere sowohl von Taspase1 als auch von tdnTASP1 erwartet, aber auch Heterodimere. Wie auf Abb. 3.23 (rechts) zu sehen ist, wurde beim Nachweis der Homodimerisierung (Spalte 2) eine Bande bei 50 kDa und eine Bande bei 22 kDa detektiert, wobei die Bande bei 50 kDa mengenmäßig deutlich überwiegt. Das heißt, dass die meisten tdnTASP1-Monomere zur Homodimerisierung fähig, aber unfähig zur Autokatalyse waren. Die Tatsache, dass das p22-Fragment erscheint bedeutet, dass eine - wenn auch geringfügige -Autokatalyse noch stattfinden konnte. Beim Nachweis der Heterodimerisierung (Spalte 3) wurde ebenfalls eine Bande bei 50 kDa und eine Bande bei 22 kDa detektiert. Und auch hier überwiegt die Menge an p50. Das bedeutet in diesem Fall, dass die meisten Taspase1-Monomere und tdnTASP1-Monomere zur Heterodimerisierung fähig waren, und dass die Aktivität des Taspase1-Wildtyps größtenteils durch die Heterodimerisierung mit der tdnTASP1-Mutante blockiert wurde. „Größtenteils“ deshalb, da noch kleine Mengen an p22 detektiert werden konnten (siehe Abb. 3.23).



**Abb. 3.23 Proteolyse-Assay und Co-Immunopräzipitation der *trans*-dominant-negativen Taspase1-Variante**

Links: Proteolyse-Assay der *trans*-dominant-negativen Taspase1 (tdnTASP1). Die Doppelmutante Taspase1-C163E-S291A ist zur Autokatalyse (Spalte 4, p22 und p28 fehlen) und Substratproteolyse (Spalte 5, p38 und p32 fehlen) nicht fähig. Rechts: Co-Immunopräzipitations-Experiment zeigt, dass tdnTASP1 Homodimere (Spalte 2) und Heterodimer (Spalte 3) formen kann. In Spalte 3 kann man sehen, dass p50 und geringfügige Mengen p22 detektiert wurden. Dies ist ein Beweis dafür, dass die tdnTASP1-Mutante die Autokatalyse der Wildtyp-Taspase1 größtenteils verhindern kann (Vergleiche Aktivität in der Positiv-Kontrolle in der ersten Spalte).

Diese Ergebnisse waren den Ergebnissen der I160A-Mutante sehr ähnlich (siehe Abb. 3.22). Allerdings zeigte diese Mutante in dem Proteolyse-Assay noch autokatalytische Aktivität, während dies bei der Doppelmutante ausblieb (siehe Abb. 3.23). Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei der C163E-S291A-Mutante in der Tat um eine *trans*-dominant-negative Taspase1-Variante handelt. Diese Mutante wird als tdnTASP1 bezeichnet.

## 4 Diskussion

Taspase1 ist bekannt als eine hoch konservierte Threonin-Aspartase, die für die Prozessierung des MLL-Proteins an konservierten Schnittstellen (QXD / G) verantwortlich ist (Hsieh et al., 2003). MLL kodiert für ein 500 kDa schweres Protein, das Embryogenese, Zellzyklus und Stammzell-Wachstum regelt (Takeda et al., 2008). Proteolyse von MLL durch Taspase1 führt zur Bildung eines stabilen Heterodimers, der mit zahlreichen Komplexpartnern einen Multiproteinkomplex bildet. Dieser Komplex ist im Zellkern lokalisiert, wo es an Lysin-4 von Histon3 als Methyltransferase (HMT) wirkt. Auf diese Weise regelt Taspase1 den Zellzyklus und die Genexpression und ist daher essenziell für die Zellproliferation.

Chromosomale Translokationen des MLL-Gens mit dem AF4-Gen auf dem Chromosom 4 führen zu den onkogenen Fusionsproteinen AF4-MLL und MLL-AF4. AF4-MLL enthält die im MLL-C-Terminus enthaltenen Schnittstellen CS1 und CS2 und wird von Taspase1 prozessiert und damit aktiviert. Fehlregulationen des AF4-MLL Fusionsproteins führen zur onkogenen Transformation der Zelle mit schlechter Prognose. Außerdem ist Taspase1 in vielen Krebs-Zelllinien überexprimiert und Taspase1-defiziente Zellen sind resistent gegen onkogene Transformation (Takeda et al., 2008). Weitere Taspase1-Substrate sind MLL4, MYO1F, NXF5, TFIIA und USF2 (Hsieh et al., 2003b; Bursen et al., 2004; Zhou et al., 2006; Bier et al., 2010).

Taspase1 wird zunächst als Proenzym translatiert. Das Proenzym ist ein Homodimer, bestehend aus zwei Ketten, die jeweils 50 kDa schwer sind. Diese Ketten schneiden sich autokatalytisch zwischen dem Aspartat-233 und Threonin-234 und bilden dadurch zwei Untereinheiten alpha (28 kDa) und beta (22 kDa). Diese Untereinheiten heterodimerisieren miteinander und bilden ein Hetero-Tetramer, die der aktiven Quartärstruktur der Taspase1 entspricht.

Taspase1 ist die einzige Protease in Säugetieren, die dazu fähig ist, MLL und AF4-MLL proteolytisch zu aktivieren. Eine spezifische Inhibierung der Taspase1 könnte ein Lösungsansatz zur Therapie der t(4;11)-Leukämie darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb

die Funktionsweise der Taspase1 untersucht, um diese Informationen künftig in neue Strategien zur Inhibierung dieses Enzyms umzusetzen.

Um Taspase1 inhibieren zu können, kommen theoretisch zwei Angriffsflächen in Frage:

1. Das katalytische Zentrum der Taspase1, welches sowohl Ort der Autokatalyse, als auch der Substrathydrolyse ist. Das *Screening* von *small-molecules* (in früheren Arbeiten im Rahmen dieses Projektes) zur Inhibierung der Bindetasche mittels Pharmakophormodellen blieb jedoch erfolglos. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit, das katalytische Zentrum nochmals untersucht und essenzielle Aminosäuren identifiziert werden.

2. Das Dimerisierungs-Interface: Da Taspase1 nur als Dimer bekannt ist, könnte die Dimerisierung ebenfalls durch *small-molecules* verhindert werden. Zu diesem Zweck sollte dieser Bereich ebenfalls untersucht und wichtige Aminosäuren identifiziert werden.

#### **4.1 Modellierung der Kristallstruktur**

Die im Jahr 2005 veröffentlichte Kristallstruktur der aktiven Taspase1 und des Proenzym wurde als Grundlage für die Identifizierung kritischer Aminosäurereste verwendet (Khan et al., 2005). Allerdings waren die Strukturen nicht vollständig aufgelöst. Daher wurden die unaufgelösten Bereiche in der Kristallstruktur des Taspase1-Proenzym im Rahmen dieses Projektes (in Kooperation mit Tim Geppert) mittels bioinformatischer Tools modelliert und anhand eines Ramachandran Plots validiert. Das Proenzym wurde deshalb für die Modellierung verwendet da dies aus technischen Gründen für die aktive Taspase1 nicht möglich war.

#### **4.2 Tyrosin-61 spielt eine Rolle bei der korrekten Bindung des Substrates**

Bei der Kristallisation der aktiven Taspase1 wurde in jeder Bindetasche jeweils ein Chlorid-Ion entdeckt, welches von den Peptidbindungen der Aminosäuren Glycin-49, Asparagin-100 und Threonin-234 koordiniert wird. In der Veröffentlichung von Khan et al., 2005 wurde das Chlorid-Ion als ein reversibler, mutmaßlich kompetitiver Inhibitor an einer physiologischen Chlorid-Konzentration (IC50-Wert ca. 25 mM NaCl) beschrieben.

Unter der Voraussetzung, dass das Chlorid-Ion tatsächlich einen Inhibitor darstellt, war es das 1. Ziel dieses Chlorid-Ion entweder in der Bindetasche zu immobilisieren oder den Austritt zu erleichtern. Tyrosin-61 wurde in früheren Arbeiten bezüglich der Taspase1 (erstmalig in der Diplomarbeit von Bettina Hofmann erschienen) als ein möglicher Interaktionspartner des Chlorid-Ions vorhergesagt. Da lediglich Tyrosin-61 mit dem Chlorid-Ion über seine OH-Gruppe interagiert, wurde diese Aminosäure zu Alanin, Prolin und Phenylalanin mutiert. Durch die beiden Mutationen Y61A und Y61P sollte die Koordination des Chlorid-Ions derart gestört werden, dass sich das inhibitorische Chlorid-Ion möglicherweise ganz ohne Substratbindung aus dem katalytischen Zentrum verdrängen lässt. In diesem Fall wurde eine höhere Substrat-Prozessierung erwartet. Die Mutation Y61F sollte das Gegenteil bewirken, da die Aminosäure Phenylalanin größer ist als der Tyrosin-Rest an dieser Position. Dadurch sollte sich das Chlorid-Ion weniger leicht aus dem katalytischen Zentrum entfernen lassen, bzw. die Rückkehr des Chlorid-Ions erschwert werden, falls dieses durch Substratbindung aus der Bindetasche verdrängt würde. In diesem Fall würde eine verbesserte Substrat-Hydrolyse erwartet werden.

Alle drei Mutanten waren im *in vitro* Taspase1-Assay, nach wie vor in der Lage - wenn auch mit veränderter Aktivität - die Autoproteolyse durchzuführen und ihr Substrat zu hydrolysieren. Die Unterschiede der Mutanten bezüglich ihrer Aktivität wurden erst in einer Verdünnungsreihe klar. Während die Mutanten Y61A und Y61P bei leichter Verdünnung kaum noch aktiv waren, war die Y61F-Mutante im Vergleich zur Wildtyp-Taspase1 sogar bei einer stärkeren Verdünnung noch in der Lage ihr Substrat zu schneiden. Damit konnte durch gezielte Mutagenese zum ersten Mal eine gesteigerte *in vitro* Enzymaktivität für Taspase1 gezeigt werden.

### **4.3 Intrinsische Serin-Protease-Variante katalysiert die Autokatalyse der Taspase1**

Im katalytischen Zentrum wurde eine Anordnung von drei Aminosäuren Histidin-47, Aspartat-233 und Serin-291 entdeckt, die typischerweise in Serin-Proteasen vorkommen. Der Einsatz von Serin-Protease-Inhibitoren zeigte allerdings keine Wirkung (Hsieh et al., 20003), weshalb man daraus geschlossen hat, dass es sich bei Taspase1 nicht um eine Serin-Protease



handeln kann. Daher wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Autokatalyse (nicht die Substrat-Hydrolyse!) der Taspase1 nach einem Serin-Protease-Mechanismus ablaufen könnte. Das bedeutet, dass ein Proton des Serins (Nukleophil) auf das Histidin (Base) übertragen wird, was Serin nun dazu befähigt die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen dem Aspartat-233 und Threonin-234 zu vollziehen. Das protonierte Histidin wird durch das Aspartat (Neutralisator) stabilisiert.

Um diese Hypothese zu beweisen, wurden Histidin-47 und Serin-291 in Alanin mutiert. Die Mutation von Aspartat-233 in Alanin wurde bereits in einer anderen Veröffentlichung von Khan et al. gezeigt. Diese Mutante war autokatalytisch inaktiv. Während die Mutation von H47A keine Beeinträchtigung der Autokatalyse zeigte, war S291A zur Autokatalyse nicht mehr befähigt. Anscheinend ist Histidin-47 für die Serin-Protease-Aktivität nicht essenziell. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei nicht um eine typische Serin-Protease handelt. Die Tatsache, dass in der Bindetasche der aktiven Taspase1 im Gegensatz zu dem des Proenzym ein Chlorid-Ion entdeckt wurde, lässt vermuten, dass das Chlorid-Ion bei der Autokatalyse eine besondere Rolle spielt. Das Chlorid-Ion könnte die Rolle des Stickstoffs in Histidin übernehmen, indem es eine Interaktion mit dem Wasserstoff der Hydroxygruppe des Serins eingeht und dieses so deprotoniert. Das Serin, welches nun ein Alkoholat darstellt, kann daraufhin den nukleophilen Angriff auf die Amidbindung zwischen Aspartat-233 und Threonin-234 starten. Für die Serin-Protease-Aktivität, die über das Chlorid-Ion verläuft, wird die Rolle des Aspartates-233 zur Orientierung und Neutralisation des Histidins überflüssig. Verläuft die Serine-Protease-Aktivität allerdings über ein Histidin, ist die Existenz des Aspartates in der Triade essenziell. Dafür spricht die Mutation D233A, die ebenfalls als inaktiv beschrieben wurde (Hsieh et al., 2003).

Da sich in der Bindetasche der Taspase1 keine weiteren Glutaminsäuren, Lysine und Histidine befinden, kann davon ausgegangen werden, dass Serin-291, Aspartat-233 und Histidin-47 bzw. alternativ zum Histidin das Chlorid-Ion über eine Protease-Aktivität verfügen. Die Anordnung dieser Aminosäuren im Zusammenhang mit dem Chlorid-Ion ist bisher nicht bekannt und wird in dieser Arbeit zum ersten Mal als mögliche Variante von Serin-Proteasen diskutiert.

Die Ergebnisse brachten eine weitere Entdeckung: Obwohl H47A im Gegensatz zu S291A zur Autokatalyse fähig war, konnte die mutierte Taspase1 ihr Substrat nicht hydrolysieren.

Dies war eine Überraschung, da alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten autokatalytisch aktiven Mutanten auch zur Substrathydrolyse befähigt waren. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Mutation H47A die Faltblatt-Struktur  $\beta 1$  (Khan *et al.*, 2005), in der Histidin-47 enthalten ist (in unmittelbarer Nähe des Tyrosins-61) und die damit verbundene Helix  $\alpha A$  (Khan *et al.*, 2005) auflöst, wodurch die Substratbindung erschwert wird bzw. nicht mehr stattfinden kann. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Histidin-47 zwar keine essentielle Rolle bei der Autokatalyse besitzt, aber eine wichtige Aminosäure für die Bindung und Hydrolyse des Substrates ist. Die Taspase1 Mutante S291A war wie erwartet nicht mehr zur Substrathydrolyse befähigt.

#### **4.4 Taspase1-Autokatalyse verläuft nicht nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus**

Die Möglichkeit, dass ein alternativer Mechanismus zur Autokatalyse von Taspase1 führen könnte, wurde ebenfalls getestet. Kürzlich wurde ein N-O-Acyl-shift-Mechanismus als derjenige Mechanismus beschrieben, der zur Autoproteolyse von anderen Familienangehörigen der Threonin-Aspartasen führt: Glycosylasparaginase weist eine schneidbare Peptidbindung zwischen D151 und T152 auf, welche autokatalytisch hydrolysiert wird (Qian *et al.*, 2003; Wang and Gou, 2010). Die Autoproteolyse nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus wird durch *in vitro* Zugabe von 500 mM Hydroxylamine stark beschleunigt, während 20 mM Glycin diesen Mechanismus blockieren. Inkubation der rekombinanten Taspase1 mit 500 mM Hydroxylamin zeigte keine Veränderungen im Gehalt des Proenzym (p50) oder resultierender Autoproteolyse-Produkte (p28 und p22). Auch wurde an dem Peptid-Backbone des Taspase1-Proenzym in unmittelbarer Nachbarschaft der schneidbaren Peptidbindung keine deformierte *trans*-Konformation festgestellt (Qian *et al.*, 2003). Das spricht klar gegen einen N-O-Acyl-shift-Mechanismus für den autokatalytischen Vorgang der Taspase1.

#### **4.5 Postulierung und Validierung des Taspase1-Aktivierungsmechanismus**

Die Kristallstruktur der Taspase1 hat gezeigt, dass sowohl das Proenzym als auch die aktive Taspase1 als Homodimere vorliegen und mit einer zapfenförmigen Domäne ineinander

greifen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Homodimerisierung als wichtiger Schritt für die enzymatische Aktivität der Taspase1 vorausgesagt. Aufbauend auf diese Idee wurde folgender Mechanismus für Taspase1 postuliert:

Es wurde vermutet, dass das Andocken der zapfenförmigen Domäne - dabei spielt Tryptophan-173 eine wichtige Rolle - eine geringe Abwärts-Bewegung des Arginins-262 in Richtung Glutaminsäure-295 verursacht. Die Glutaminsäure-295, die zuvor in Richtung Arginin-299 gerichtet war, wird nun durch die positive Ladung des Arginin-262 angezogen. Da Glutaminsäure-295 durch Peptidbindungen direkt an Serin-291 gebunden ist, macht diese geringfügige Bewegung eine Neupositionierung des Serins-291 möglich, welches zu dem autokatalytischen Schritt und damit zu einer Spaltung zwischen den Aminosäuren Aspartat-233 und Threonin-234 führt. Dieser Schnitt aktiviert das jeweilige Monomer, welches wiederum das Binden des Substrates und seine Hydrolyse zur Folge hat.

Um diesen postulierten Mechanismus der Taspase1 zu validieren, wurden die Aminosäuren Tryptophan-173, Arginin-262, Glutaminsäure-295 und Serin-291 in Alanin mutiert. Die Mutation S291A wurde bereits im Zusammenhang mit der katalytischen Triade vorgestellt (diese Mutante war inaktiv). Es konnte gezeigt werden, dass die Mutanten W173A, R262A und E295A zur Autokatalyse und damit auch zur Substrat-Proteolyse nicht fähig sind. Diese Ergebnisse waren ein Beweis dafür, dass die Aminosäuren Tryptophan-173, Arginin-262, Glutaminsäure-295 und das bereits erwähnte Serin-291 eine kritische Rolle bei der enzymatischen Aktivierung der Taspase1 spielen.

#### **4.6 Homodimerisierung zweier Taspase1-Proenzyme stellt ein Schlüsselereignis dar**

Diese Mutationsanalysen konnten zwar zeigen, welche Aminosäuren kritisch für die Funktionsweise der Taspase1 sind, jedoch nicht, ob sie eine Rolle bei dessen Homodimerisierung oder bei der enzymatischen Aktivierung spielen. Um dies zu testen, wurden die Mutanten, versehen mit Myc- bzw. Flag-Tag, in einem Säugetier-Vektor inkloniert und in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Anhand der Tags konnte sichtbar gemacht werden, ob die Mutanten noch zur Homodimerisierung fähig waren. Waren die Mutanten zur Homodimerisierung fähig, dann hat die Mutation keinen Einfluss auf die Dimerisierung gehabt, sondern war in der enzymatischen Aktivierung der Taspase1 involviert. Bleibt die

Homodimerisierung aus, handelt es sich um die Mutation eine Aminosäure, die eine Rolle bei der Homodimerisierung der Taspase1 spielt.

Die Nachweise zur Homodimerisierung der Mutanten zeigten, dass lediglich die Aminosäure Tryptophan-173 die Fähigkeit zur Homodimerisierung verloren hatte. Damit konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäure eine Rolle bei der Homodimerisierung der Taspase1 spielt. Alle anderen Mutanten waren in ihrer Fähigkeit zur Homodimerisierung nicht beeinträchtigt. Dies bedeutete, dass den Aminosäuren Arginin-262, Glutaminsäure-295 und Serin-291 (auch in einem anderen Zusammenhang gezeigt) eine Rolle bei der enzymatischen Aktivierung der Taspase1 zukommt.

#### **4.7 Herstellung einer *trans*-dominant-negativen Taspase1-Variante**

Parallel zu den Nachweisen zur Homodimerisierung der Mutanten wurde auch ihre Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit dem Wildtyp-Taspase1 untersucht. Hierfür wurden die jeweiligen Mutanten und Wildtyp-Taspase1 in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Ziel dieses Versuches war mit dem erforderlichen Wissen der Taspase1, eine *trans*-dominant-negative Taspase1-Variante (tnd-TASP1) zu identifizieren, die in der Lage wäre, mit dem Wildtyp-Taspase1 zu heterodimerisieren und dessen Aktivität zu unterbinden. Die bisher vorgestellten Mutanten waren zwar zur Heterodimerisierung fähig, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der Taspase1.

Zu diesem Zweck wurden die Aminosäuren Isoleucin-160, Cystein-163 gezielt für eine Mutation ausgesucht, da ihre Aminosäurereste sich in unmittelbarer Nähe zur Arginin-262 bzw. Glutaminsäure-295 befanden. Diese Aminosäuren wurden bewusst in Glutaminsäure mutiert, um bei der Heterodimerisierung durch Anziehung bzw. Repulsion in den Aktivierungsmechanismus der Wildtyp-Taspase1 zu interferieren. Die Ergebnisse dieser Mutationen zeigten, dass I160E im *in vitro* Proteolyse-Assay zu etwa 50% noch zur Autokatalyse und Substrat-Proteolyse fähig war. Daher war diese Mutante für das vorgesehene Ziel nicht zu verwenden, obwohl sie zur Homodimerisierung fähig war und beim Nachweis zur Heterodimerisierung Wildtyp-Taspase1 teilweise inhibieren konnte. Vermutlich kann die Glutaminsäure statt Isoleucin-160 zwei verschiedene Konformationen in der Region annehmen und nur eine Konformation kann störend in dem Autoaktivierungsprozess eingreifen. Die Mutante C163E jedoch war im *in vitro* Proteolyse-Assay völlig inaktiv. Es

konnte gezeigt werden, dass diese Mutante zwar zur Homo- bzw. Heterodimerisierung fähig war, aber Wildtyp-Taspase1 nicht vollständig inhibieren konnte. Daher wurde diese Mutante für eine weitere Mutation ausgewählt.

Es konnte eine Doppelmutante, bestehend aus C163E (Dimerisierungsmutante) und S291A (Autokatalyse-Mutante) erfolgreich hergestellt werden. Co-Immunopräzipitations- und *in vitro*-Experimente zeigten, dass weder tdn-TASP1-Homodimere noch tdn-TASP1::Taspase1-Heterodimere signifikante autoproteolytische Aktivität oder Hydrolyse des entsprechenden Substrat-Proteins aufweisen. Dennoch war die tdn-Mutante (Homodimerisierungs-Test) *in vivo* geringfügig zur Autokatalyse fähig. Auch in Kombination mit dem Wildtyp-Taspase1 (Heterodimerisierungs-Test), konnte sie diesen noch geringfügig aktivieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass das Cystein-163 über Peptidbindungen mit Aspartat-233, Threonin-234 und Serin-291 verbunden ist. Eine Doppelmutation, in diesem Falle C163E und S291A kann Veränderungen in der Peptidkette nach sich ziehen bzw. die starre Struktur in diesem Bereich auflockern. Es ist möglich, dass in seltenen Fällen, je nach dem wie viel Bewegungsraum für diese Peptidkette vorhanden ist, die Autokatalyse durch das Threonin-234 eingeleitet wird.

Die tdn-TASP1-Mutante validiert nicht nur das postulierte Aktivierungsmodell von Taspase1, es könnte sogar von Wert sein für weitere Experimente. *In silico* screening von Substanzen, die potentiell in die Region eingreifen, an der die zapfenförmige Domäne nach der Dimerisierung andockt, sollte eine schnelle Identifizierung von kleinen Molekülen, die Taspase1 allosterisch blockieren, ermöglichen. Solche Experimente werden zurzeit durchgeführt. Diese Moleküle geben wichtige Antworten auf einige Fragen in Bezug auf kontroverse Diskussionen über den onkogenen Mechanismus in t(4;11)-Leukämie.

Insgesamt liefern die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit viele Informationen über die funktionale Aktivierung der Taspase1. Die Entdeckung der katalytischen Triade, bestehend aus Ser/His/Asp in der Bindetasche des Taspase1-Proenzym spricht dafür, dass die Autoprozessierung dieses Enzyms nach einem Serin-Protease-Mechanismus und NICHT nach einem N-O-Acyl-shift-Mechanismus verläuft. Dabei kann das Chlorid-Ion beim Fehlen des Histidins in der katalytischen Triade als Protonen-, „Überträger“ fungieren.

Weiterhin konnte eine Dimerisierungsmutante (W173A) zeigen, dass die Dimerisierung der Taspase1 ein wichtiges Schlüsselereignis für ihre enzymatische Aktivität darstellt. Die

tdnTASP1-Variante konnte den mittels Mutationsanalyse postulierten Mechanismus für die Aktivierung der Taspase1 validieren.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle (Firma)</b>
$\lambda$ -DNA (für DNA-Marker)	MBI Fermentas
$\beta$ -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 Brilliant Blue	Sigma
DEPC	Roth
dNTPs	Peqlab
DTT	Roth
EDTA	Roth
Entwickler/Roentogen liquid	Tetenal
Essigsäure	Riedel De Haen
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fixierer/ Roentogen Superfix	Tetenal
Glycerin 86 %	Roth
Glycin	Roth
HEPES	Roth

Imidazol	Sigma
Isopropanol	Roth
IPTG	Saxon
Kaliumchlorid	Roth
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Merck
MG123	Calbiochem
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	NEB New England Biolabs
Natriumchlorid	Roth
NaF	Riedel De Haen
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
NaVO <sub>4</sub>	Sigma
Nickelagarose	Sigma
PBS	Invitrogen
PMSF	Böhringer Mannheim GmbH
Saccharose	Roth
SDS	Biomol
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
Tris	Roth
Triton-X100	Sigma
Trockenmilch (non-fat)	USA (TOPS)
Tween 20	Sigma
Yeast Extract	Difco

**Enzyme**

**Bezugsquelle (Firma)**

alkalische Phosphatase	New England Biolabs
DNA-Ligase	Roche
DpnI	Fa. Stratagene
Lysozym	Sigma
Pfu-Ultra <sup>TM</sup> (HF) DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonucleasen (und Puffer)	NEB New England Biolabs
RNase	Sigma
T4-DNA-Ligase (und Puffer)	NEB New England Biolabs



T4-DNA-QuickLigase (und Puffer)	NEB New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase (und Puffer)	NEB New England Biolabs

**Nährmedien/Zusatzstoffe****Bezugsquelle (Firma)**

β-Mercaptoethanol (100 mM)	Invitrogen
DMEM	PAA
Foetal Bovine Serum Gold (FBS)	PAA
L-Glutamin 200 mM	PAA
PBS	PAA
PEI (Polyethylenimin)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA
Trypan Blue Stain	Sigma

**Geräte****Hersteller**

Abi Prism 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Accu-Jet	Braun
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Owl Separation Systems
Brutschränke	Heraeus
Elisa-Reader MR5000	Dynatech
Geltrockner	Fröbel
Gene Quant RNA/DNA-Calculator	Pharmacia
Mikroskop	Nikon
Netzgerät/PS500XT DC Power Supply	Hoefer Scientific Instruments
PCR-Geräte	PE Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab
Rotationsschüttler	Infors
Rotator	Stuart
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

Vivaspin500	Vivaspin
Waage LC 4200 S	Sartorius
Wasserbad	Julabo
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge J2-HS	Beckmann
Zentrifuge J6-HC	Beckmann

**Sonstiges Material****Bezugsquelle (Firma)**

3MM Chromatographiepapier	Whatman
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Cellstar Gewebekulturschalen (□15 cm)	Greiner bio-one
500 cm <sup>2</sup> Square Cell Culture Dish (Zellplatte)	Corning Incorporated
Chromatographiesäulchen	BioRad
ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
Mikrozentrifugengefäße/ Caps	Eppendorf
Qiagen Gel Extraction Kit	Quiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Quiagen
Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit	Fa. Stratagene
Röntgenfilme Fujifilm	Fujifilm
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas
PCR-Gefäße	Greiner bio-one
Polypropylene Säulen (5 ml)	Quiagen
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs
Protease Cocktail Set	Calbiochem
Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow	Sigma
PVDF Membran	GE Healthcare
Pure Yield Plasmid Purification System	Promega
Sequenziergefäße	PE Applied Biosystems
Sterile Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner bio-one
Sterile Pipettenspitzen (1000, 200, 20 µl)	Greiner bio-one
Vivaspin 10.000 MWCO PES Säulchen	Sartorius

### 5.1.2 Allgemeine Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
10x Pfu-Ultra™(HF)-Reaktionspuffer		Fa. Stratagene
Anoden-Puffer I pH 10,4	300 mM	Tris
	20 %	Methanol
Anodenpuffer II pH 10,4	25 mM	Tris
	20 %	Methanol
CaCl <sub>2</sub> -Transformationspuffer	1 M	Tris
	1 M	MgCl <sub>2</sub>
	1 M	CaCl <sub>2</sub>
DNA-Ladepuffer	50 %	Saccharose
	100 mM	EDTA
	0,1 %	Brom-Phenol-Blau
	0,1 %	Xylen-Cyanol-FF
E-Gel-Puffer (pH 7.9)	40 mM	Tris
	2mM	EDTA
	0.5 mM	NaAc
Elutionspuffer (pH 8,0 mit NaOH)	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
Entfärbelösung	100 ml	Essigsäure
	100 ml	Methanol
	ad 1000 ml	Wasser
Färbelösung	0,8 g	Brillantblau R-250

	100 ml	Isopropanol
	40 m	Essigsäure
	ad 500 ml	Wasser
Lämmli-puffer (2x)	100 mM	Tris/HCl pH 6,8
	200 mM	DTT
	4%	SDS
	20%	Glycerin
	0,2%	Bromphenolblau
lowTE	10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	0,1 mM	EDTA
Lysis-puffer (pH 8,0 mit NaOH)	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	10 mg/ml	Lysozym
Lysis-puffer pH 7,5	150 mM	NaCl
	20 mM	HEPES
	1%	TritonX-100
	0,4 mM	EDTA
frisch zugegeben:	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	10 mM	NaF
	1 mM	PMSF
		Protease Inhibitor cocktail Set V, EDTA free
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
10 % ige SDS-Lösung	10 g	SDS auf 100 ml H <sub>2</sub> O



T7-Primer	5'-TTAATACGACTCACTATAGG-3'
pET-T7term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
Taspase-NdeI*3	5'-GGAATTCCATATGACCATGGAGAAGG-3'
Taspase-XhoI*5	5'-CCGCTCGAGGTTCACTGGGCTCTCCA-3'

---

**Mutageneseprimer    Sequenz**


---

C163E•3	5'-TCTCCA <u>ACT</u> AAAA <u>ACT</u> CGGGAGGAATTCTGCCAGCC-3'
C163E•5	5'-GGCTGGCAGAATTCCTCCCGAGTTTTTAGTTGGAGA-3'
E295A•3	5'-TACCTCAGGATGTGGAG <u>CGC</u> ATCTTGTGCGCACC-3'
E295A•5	5'-GGTGCGCACAAGATG <u>CGCT</u> CCACATCCTGAGGTA-3'
F332A•3	5'-ATCTTCACTGGCAAGGG <u>CAG</u> GTGAACTGATAAAC-3'
F332A•5	5'-GTTTATCAGTTCACCT <u>GCC</u> TTGCCAGTGAAGAT-3'
H47A•3	5'-GGCTTTGTGTTGGTGG <u>CT</u> GCAGGTGCAGGT-3'
H47A•5	5'-ACCTGCACCTGCAG <u>CC</u> CACCAACACAAAGCC-3'
H259A•3	5'-GCCCAACTCTCCCCGAG <u>CT</u> TTCAAGGCCAAGCCTC-3'
H259A•5	5'-GAGGCTTGGCCTTGAAAG <u>CT</u> CCGGGGAGAGTTGGGC-3'
H281A•3	5'-GTGGAGTAGGGGTTAG <u>CAG</u> CTCCAGTATTTTCAG-3'
H281A•5	5'-CTGAAAATACTGGAGCT <u>GCT</u> AACCCCTACTCCAC-3'
I160E•3	5'-CTAAAAAGCAGGGAGG <u>CT</u> CTCTGCCAGCCGAGAGCT-3'
I160E•5	5'-AGCTCTCGGCTGGCAGAG <u>AGC</u> CTCCCTGCTTTTTAG-3'
R159A•3	5'-AAAGCAGGGAGGAAT <u>TGC</u> GCCAGCCGAGAGCTTGC-3'
R159A•5	5'-CGAAGCTCTCGGCTGGC <u>GCA</u> ATTCCTCCCTGCTTT-3'
R262A•3	5'-GAGCAGCCTGCCCA <u>ACT</u> <u>TGC</u> CCCCGGATGTTTCAAGG-3'
R262A•5	5'-CCTTGAAACATCCGGGG <u>GCA</u> GTTGGGCAGGCTGCTC-3'
R299E•3	5'-CTCTAGCCAGTATGGT <u>TCC</u> CACAAGATGCTCTCCAC-3'
R299E•5	5'-GTGGAGAGCATCTTGTG <u>GAG</u> ACCATACTGGCTAGAG-3'
R304A•3	5'-AGCATGTGAACATTC <u>TGC</u> AGCCAGTATGGTGCGCAC-3'
R304A•5	5'-GTGCGCACCATACTGGCT <u>GCA</u> GAAATGTTACATGCT-3'
S291A•3	5'-GCTCTCCACATCCTG <u>CGG</u> TACTCACAGCTGTGG-3'
S291A•5	5'-CCACAGCTGTGAGTACC <u>G</u> CAGGATGTGGAGAGC-3'
T234D•3	5'-CAGGCACTTTGGAC <u>GAC</u> GTAGGCGCTGTGG-3'
T234D•5	5'-CCACAGCGCCTAC <u>GTC</u> GTCCAAAGTGCCTG-3'
W173A•3	5'-TTCCATGATCTACTG <u>CCG</u> CTCTGTAGGCTCCTTCTC-3'
W173A•5	5'-GAGAAGGAGCCTACAGAG <u>CGG</u> CAGTAGATCATGGAA-3'

Y61A•3	5'-TCCAAAGCCAAGGAGGCTAAACATGTATGCAAACG-3'
Y61A•5	5'-CGTTTGCATACATGTTTAGCCTCCTTGGCTTTGGA-3'
Y61F•3	5'-TCCAAAGCCAAGGAGTTTAAACATGTATGCAAACG-3'
Y61F•5	5'-CGTTTGCATACATGTTTAAACTCCTTGGCTTTGGA-3'
Y61P•3	5'-TCCAAAGCCAAGGAGCCTAAACATGTATGCAAACG-3'
Y61P•5	5'-CGTTTGCATACATGTTTAGGCTCCTTGGCTTTGGA-3'

#### 5.1.4 Verwendete Organismen

##### Bakterienstämme Genotyp

BL21*DE3	deficient in Ion and ompT proteases; $\lambda$ DE3 (lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5), F <sup>-</sup> , dcm, ompT, hsdS(r <sup>-</sup> B, m <sup>-</sup> B), galRNaseE (rne131) mutant
Top10F+	F' (tet <sup>r</sup> ), mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\Phi$ 80 delta lac $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74deoR, recA1, araD139, $\Delta$ (ara, leu) 7697, galU, galK, $\lambda$ <sup>-</sup> , rpSL (str <sup>r</sup> ) endA1, nupG
W3110	F <sup>-</sup> , lacIq, lacP L8, ampC::[ $\lambda$ ] cI+; ATCC no. 55151

##### Medien für E.coli

##### Zusammensetzung

YT-Medium (für <i>E.coli</i> )	1%	Trypton
	0,5%	Hefeextrakt
	0,5%	Natriumchlorid
YT <sup>Amp</sup> -Medium (für <i>E.coli</i> )		YT-Medium
	100 $\mu$ g/ml	Ampicillin
YT-Agar (für <i>E.coli</i> )		YT-Medium
	1,2%	Agar

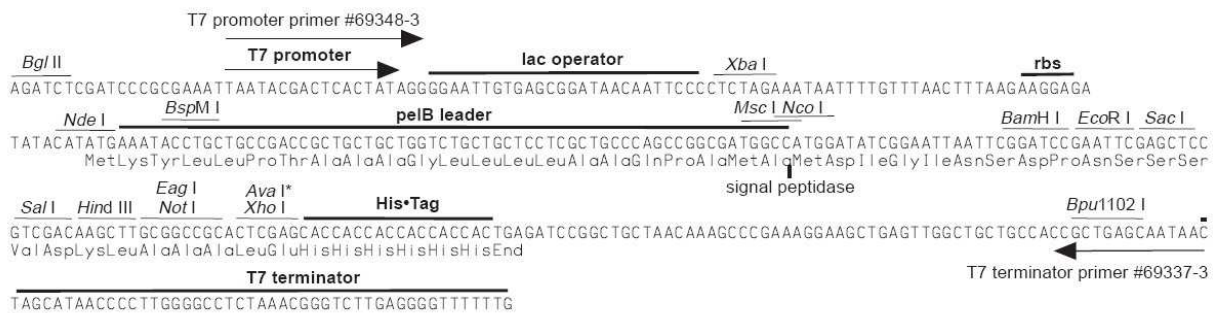
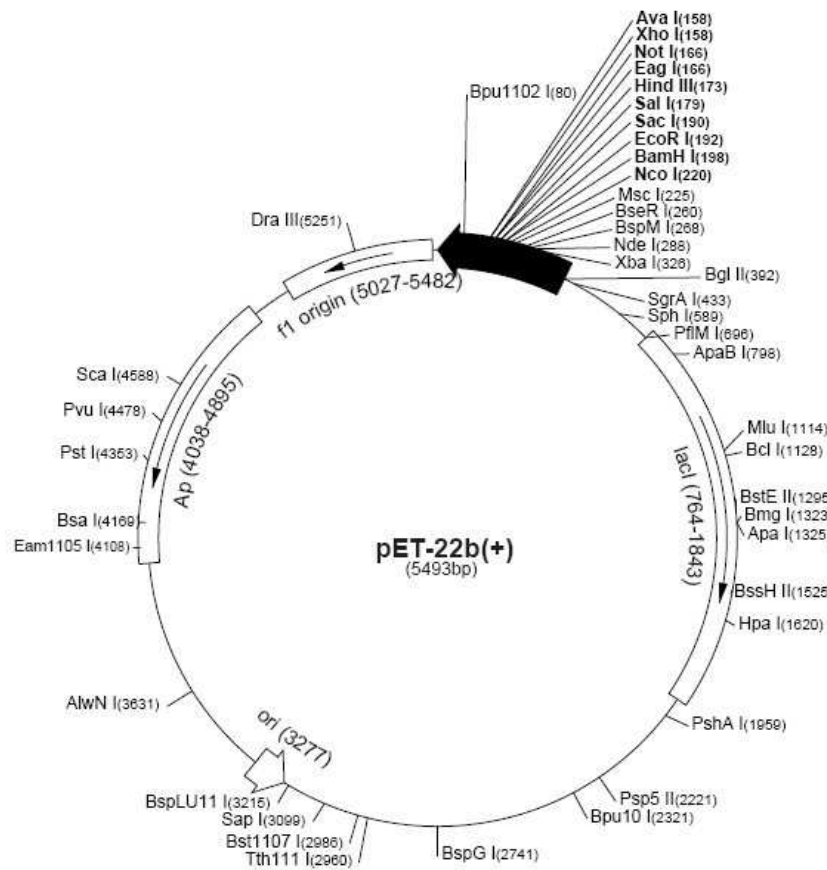
##### Zell-Linie Zelltyp Referenz

HEK-293T	humane Nierenkarzinom-Zelllinie; abgeleitet von 293 Zellen, in die über den Adenovirus Typ 5 ein temperatursensitives Gen des SV40-T-Antigens inseriert wurde Medium: DMEM	Graham, 1977)
----------	---	---------------

Die Säugerzellen (HEK-293T) wurden bei 5% CO<sub>2</sub>, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Zu dem Medium (DMEM) wurden 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin sowie 2 mM L-Glutamin zugegeben.

### 5.1.5 Vektoren und Plasmide

pET22b+ (Novagen) Bakterieller Expressionsvektor

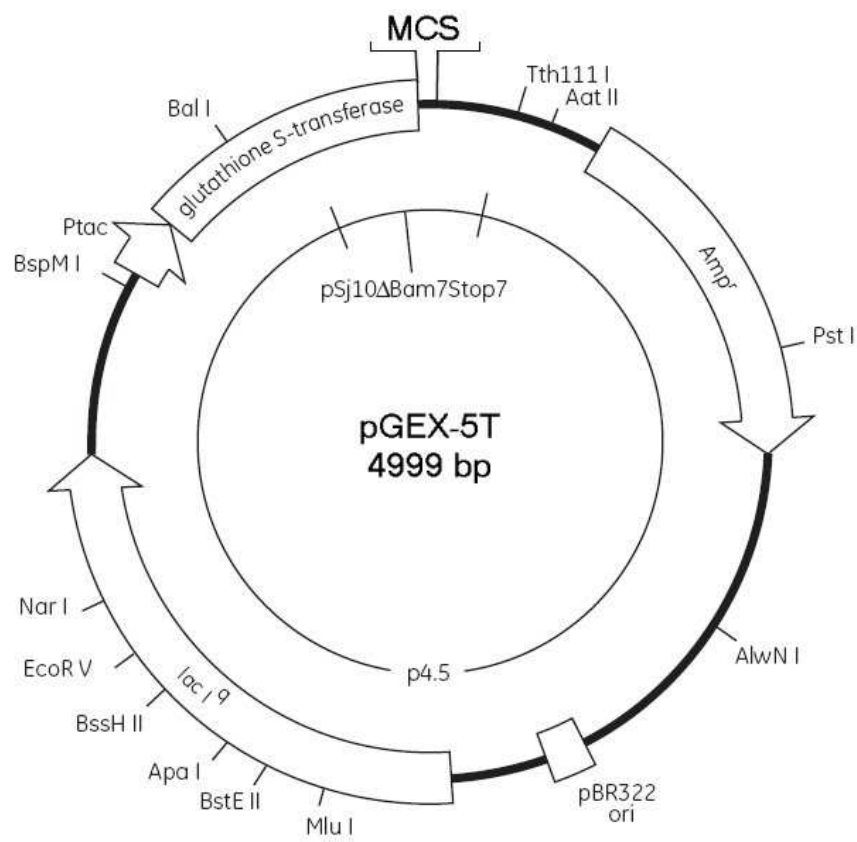


pET-22b(+) cloning/expression region

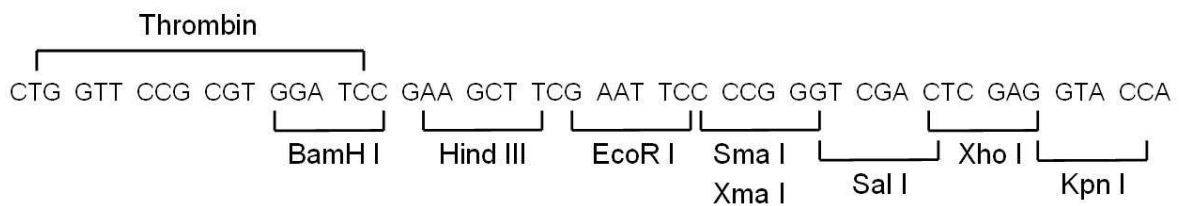


**pET22b+-Taspase** Bakterieller Expressionsvektor für ein 6xHis-Tag-Fusionsprotein mit Taspase1. PCR-Fragment aus einer Reaktion von Taspase-NdeI\*3 und Taspase-XhoI\*5 mit cDNA aus SEM-Zellen. Mit NdeI und XhoI geschnitten und in pET22b+ kloniert.

**pGEX5T** Bakterieller Expressionsvektor für die Herstellung N-terminal 6xHis-GST-markierter Fusionsproteine. (Berthold, 1992)

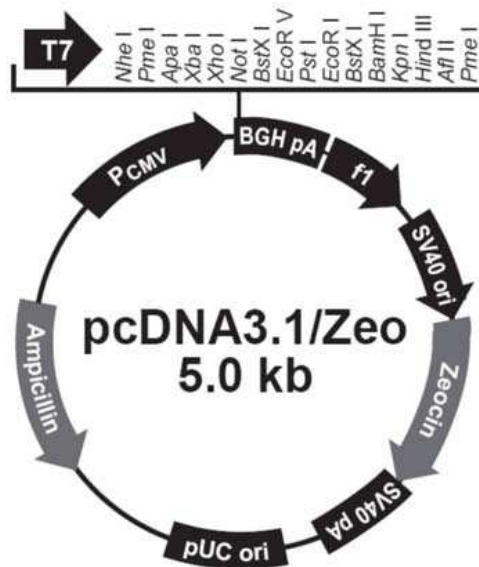


MCS:



## 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-EcoRI\*3 neu und 2CL-XhoI\*5 mit pUHD3-4-MLL. Mit EcoR I und Xho I geschnitten und in pGEX5T kloniert.



Der pcDNA3.1/Zeo(-) ist gleichermaßen mit einem CMV-Promotor ausgestattet und für die transiente bzw. stabile Expression in Säugerzellen geeignet.

### 5.1.6 Verwendete Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Name	Organismus	Verdünnung	Beschreibung/Hersteller
anti-Flag	Maus	1:1000	Monoklonaler Antikörper gegen das Flag-Peptid (DYKDDDDK), (Sigma)
anti-myc	Maus	1:500	Monoklonaler Antikörper gegen das Myc-Peptid (EQKLISEEDL)

#### Sekundäre Antikörper:

anti-Mouse 1:10000 anti Maus Ig (GE Healthcare)

## 5.2 Standardmethoden

### 5.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die folgenden Standard-Methoden sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, den Protokollsammlungen: *Molecular Cloning* von Sambrook 2. Auflage, 1989, entnommen 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 CaCl<sub>2</sub>- kompetenten *E.coli* Bakterien
- Transformation von *E.coli* mit CaCl<sub>2</sub>
- Protein-Induktionskinetik in *E.coli*

### 5.2.2 Primergerichtete Doppelstrangmutagenese

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

### 5.2.3 Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism BigDye<sup>TM</sup> 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.

## **5.3 Proteintechniken**

### **5.3.1 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 Stunden bei 37°C induziert. Bakterien wurden mit 4.000 rpm, bei 4°C für 10 Minuten pelletiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Inkubation der Bakterienpellets mit 5 ml Lysispuffer. Durch Zentrifugation mit 14.000 rpm, bei 4°C für 20 Minuten 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.

### **5.3.2 Umpuffern nativ aufgereinigter Proteinen**

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

### **5.3.3 Ermittlung der Aktivität von Taspase1**

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 Minuten bei 37°C inkubiert. Die übrigen Bestandteile des Assays waren: 10 µl 2x Taspase-Cleavage-Puffer, 2 µl 100 mM DTT und 5 µl H<sub>2</sub>O. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schnittprodukte wenn nichts anderes erwähnt mit Hilfe eines 12% oder 15% SDS-PAGE analysiert.

## 5.4 Zelltransfektion

Die Transfektion der 293T Zellen wurde mit Hilfe des PEI/Polyethylenimin durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf Zellkulturschalen ausgebracht: ca.  $5 \times 10^6$  Zellen auf eine Zellkulturschale ( $\varnothing$  15 cm, 25 ml Medium). 1-2 Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel.

Der Ansatz für das Transfektionsreagenz ist im Folgenden dargestellt:

Lösung A (PEI:PBS, 1:5)

Zellkulturschale: 450  $\mu$ l PBS + 90  $\mu$ l 10 mM PEI-Lösung

Lösung B

Zellkulturschale: 450  $\mu$ l PBS + 25  $\mu$ g DNA

Für die Transfektion wurde Lösung B tröpfchenweise in Lösung A pipettiert, während Lösung A dabei mit konstantem Vortexen behandelt wurde. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur bevor das Transfektionsreagenz gleichmäßig über die Zellen verteilt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

## 5.5 Proteinbiochemische Methoden

### 5.5.1 SDS-PAGE

Es wurden Gele mit einer homogenen Acrylamidkonzentration (Minigele) gegossen. Für die Herstellung aller Gele wurde eine Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 30 % T, 2,6 % C) verwendet, die neben dem Acrylamid den Quervernetzer Methylenbisacrylamid enthielt. Für die Gele wurde eine Stromstärke von 40 mA pro Gel angelegt.

**Zusammensetzung eines SDS-Gels:**

Trenngel (15%):

Wasser	0,65 ml
Trenngelpuffer	2,25 ml
AA/BAA	3 ml
10 % SDS	60 $\mu$ l
APOD (20 %)	30 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

Sammelgel (4 %):

Wasser	1,45 ml
Sammelgelpuffer	0,25 ml
AA/BAA	0,26 ml
10 % SDS	20 $\mu$ l
APOD (20 %)	10 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l

**5.5.2 Färbemethoden**

Coomassie Blau-Färbung (Standard):

Direkt im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurden die Gele für 10 Minuten in der Färbelösung geschüttelt. Daraufhin wurde die Färbelösung entfernt und die Gele in Entfärbelösung unter Schütteln inkubiert. Die Entfärbelösung wurde so lange auf den Gelen belassen bis das gewünschte Ergebnis erreicht war. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt ungefähr bei 0,1  $\mu$ g Protein pro Bande.

**5.5.3 Western Blot**

Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte überwiegend in 3 % BSA mit 0,1 % Tween20 in TBS. Falls sich dies als nicht geeignet erwies, wurde auf eine Verdünnung in 5 % Milchpulver mit 0,1 % Tween20 in TBS umgestellt. Die entsprechenden Lösungen wurden ebenso zum Blockieren und zum Verdünnen des Zweitantikörpers eingesetzt.

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Hybond-P PVDF-Membran der Firma GE Healthcare erfolgte mit Hilfe der *Semidry*-Technik bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 1-1,5 Stunden. Hierbei wurde entweder Anoden-Puffer I / II und Kathoden-Puffer verwendet.

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die PVDF-Membran mit der zugehörigen Blockierlösung für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Hybridisierung über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am folgenden Tag wurde 3 Mal für 5 Minuten mit 0,1 % Tween20 in TBS gewaschen, anschließend mit dem entsprechendem Zweitantikörper (Verdünnung 1:10000) 1 Stunde bei Raumtemperatur hybridisiert und wiederholt 3 Mal für 5 Minuten mit 0,1 % Tween20 in TBS gewaschen. Abschließend wurde der Blot unter Verwendung des *ECL Western Blotting Analysis System* der Firma GE Healthcare entwickelt. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte je nach Bedarf über einen Zeitraum von 2 Minuten bis 2 Stunden.

#### **5.5.4 Immunopräzipitationen**

Ungefähr  $1,5 \times 10^8$  transient transfizierte 293T-Zellen wurden in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation des Lysats bei 4°C mit 14.000 rpm, wurde der Überstand in einem neuen Cap mit 50 µl Protein G Agarose Beads 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Auf diese Weise sollten unspezifische Bindungen an die Protein G Agarose Beads minimiert werden. Die Beads wurden anschließend durch kurze Zentrifugation separiert und der Überstand auf ein Chromatographiesäulchen gegeben. Anschließend wurde die Probe mit 5-10 µl des unverdünnten Antikörpers versetzt, erst 1 Stunde bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 4°C rotiert. Am folgenden Tag wurden weiterhin 60 µl Protein G Agarose hinzu pipettiert bevor erneut 3-4 Stunden bei 4°C inkubiert wurde. Nach 5 Waschschrinen mit je 500 µl TBSPuffer erfolgte die Elution durch Inkubation mit 100 µl zuvor auf 80°C erwärmter 2x-Lämmli-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur sowie abschließender Zentrifugation.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Häufigkeits-Verteilung der MLL-Fusionspartnergene.....	9
Abb. 2.2 Schematische Darstellung und Karyotyp einer t(4;11)-Translokation.....	10
Abb. 2.3 Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des MLL-Proteins .....	12
Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Entstehung des MLL-Multiproteinkomplexes.....	16
Abb. 2.5 Schematische Darstellung des AF4-Proteins .....	19
Abb. 2.6 Darstellung des AF4-Multiproteinkomplexes .....	20
Abb. 2.7 Schematische Darstellung des AF4-MLL Fusionsproteins.....	22
Abb. 2.8 Schematische Darstellung des MLL-AF4 Fusionsproteins.....	24
Abb. 2.9 Autokatalytische Aktivierung von Taspase1 .....	27
Abb. 2.10 Pathomolekularer Mechanismus des AF4-MLL Fusionsproteins.....	32
Abb. 3.1 Kontrolle der nativen Aufreinigungen von Taspase1 .....	39
Abb. 3.2 Schematische Darstellung des artifiziellen Substratproteins GST- MLL .....	39
Abb. 3.3 Kontrolle der nativen Aufreinigungen des Substratproteins GST-MLL.....	40
Abb. 3.4 Taspase1-Proteolyse-Assay .....	41
Abb. 3.5 <i>In silico</i> Modellierung der Taspase1-Proenzym.....	42
Abb. 3.6 Ramachandran Plot validiert die modellierte Taspase1 .....	43
Abb. 3.7 Intrinsischer Inhibitor-Mechanismus der Taspase1.....	45
Abb. 3.8 Proteolyse-Assay der Mutanten Y61A, Y61F und Y61P.....	46
Abb. 3.9 Vergleich der Triaden von Taspase1-Proenzym, Trypsin und Thrombin.....	47
Abb. 3.10 Proteolyse-Assays der Taspase1-H47A und Taspase1-S291A Mutante.....	48
Abb. 3.11 Taspase1-Inkubation mit Hydroxylamin und Glycin .....	50
Abb. 3.12 Darstellung der „Zapfen-Domäne“ .....	51
Abb. 3.13 Darstellung des Interfaces von Taspase1 .....	52



---

Abb. 3.14 Darstellung der postulierten $\pi$ -Stackings innerhalb der Dimerisierungsebene .....	53
Abb. 3.15 Analyse der Autokatalyse- und Proteolyse-Aktivität auf dem SDS-PAGE.....	54
Abb. 3.16 Darstellung der Aufreinigungen der Taspase1-H281A und -F332A und dessen Proteolyse-Assays .....	55
Abb. 3.17 Proteolyse-Assays der Mutanten Taspase1 - W173A und - H259A.....	56
Abb. 3.18 Postulierter Aktivierungsmechanismus von Taspase1 .....	58
Abb. 3.19 Schematische Darstellung der Taspase1-Aktivierungsmechanismus .....	59
Abb. 3.20 <i>In vitro</i> Hydrolyse-Assay der Taspase1-Varianten .....	60
Abb. 3.21 Vorgang bei der Untersuchung der Homo-/Heterodimerisierung aller Taspase1- Mutanten.....	62
Abb. 3.22 Co-Immunopräzipitations-Experimente von Flag- bzw. Myc-getagtem Taspase1- Varianten .....	63
Abb. 3.23 Proteolyse-Assay und Co-Immunopräzipitation der <i>trans</i> -dominant-negativen Taspase1-Variante .....	66

## 7 Abkürzungsverzeichnis

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>Cleavage site</i> 1
CS2	<i>Cleavage site</i> 2
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (kann Adenosin, Thymidin, Guanosin 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
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -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'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

### **Aminosäuren**

---

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

## 8 Literaturverzeichnis

**Bartel DP (2004).** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116, 281-297.

**Benedikt A, Baltruschat S, Scholz, B, Bursen A, Arrey TN, Meyer B, et al. (2011).** The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia* 2011

**Berthold H, Frorath B, Scanarini M, Abney C, Ernst B and Northemann W (1992).** Plasmid pGEX-5T an alternative System for Expression and Purification of recombinant Proteins. *Biotechnical letters* 14, (4) 245-250.

**Bertrand FE, Spengeman JD, Shah N, and LeBien TW (2003).** B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* 17, 2454-2459.

**Bier, C., Knauer, S.K., Klaphor, A., Schweitzer, A., Reikik, A., Kraemer, O.H., Marschalek, R., and Stauber, R.H. (2010).** Cell-based analysis of structure-function activity of Threonine Aspartase 1. *J. Biol. Chem.* 286, 3007-3017.

**Bitoun E, Oliver PL, Davies KE (2007).** The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* 16: 92--106.

**Bompard-Gilles, C., Villeret, V., Davies, G.J., Fanuel, L., Joris, B., Frere, J.M. and Van Beeumen, J. (2000).** A new variant of the Ntn hydrolase fold revealed by the crystal structure of L-aminopeptidase D-ala-esterase/amidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Structure* 8: 153–162.

**Braisted AC, Oslob JD, Delano WL, Hyde J, McDowell RS, Waal N, Yu C, Arkin MR and Raimundo BC (2003).** Discovery of a potent small molecule IL-2 inhibitor through fragment assembly. *J Am* 125(13):3714-5

**Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C.E., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. (1995).** A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416–419.

**Buolamwini JK, Addo J, Kamath S, Patil S, Mason D, Ores M. (2005).** Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 5(1):57-68.

**Bursen A, Moritz S, Gaussmann A, Moritz S, Dingermann T, Marschalek R (2004).** Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* 23: 6237--6249. Bursen A, Schwabe K, Ruster B, Henschler R, Ruthardt

**Bursen A & Schwabe K, Ruster B, Henschler R, Ruthardt M, Dingermann T and Marschalek**

R (2010). The AF4-MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL• AF4. *Blood* 115#17: 3570-3579

**Butler**, L. H., Slany, R., Cui, X., Cleary, M. L., and Mason, D. Y. (1997). The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* 89, 3361-3370.

**Caslini** C, Yang Z, El-Osta M, Milne TA, Slany RK, Hess JL (2007). Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res* 67: 7275--7283.

**Chakrabarti** P, Janin J (2002). Dissecting protein-protein recognition sites. *Proteins* 15; 47(3):334-43.

**Chen** CS, Hilden JM, Frestedt J, Domer PH, Moore R, Korsmeyer SJ *et al* (1993a). 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: 1080--1085.

**Chen** CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA, Hammond GD and Kersey JH (1993b). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 81, 2386-2393.

**Cleary** ML (1991). Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 66, 619-622.

**Daser** A, Rabbitts TH (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol* 15, 175-188.

**Dhalluin** C, Carlson J E, Zeng L, He C, Aggarwal AK and Zhou MM (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.

**Djabali** M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* 2: 113--118.

**Dogan Ekici** Ö, Paetzel M and Dalbey RE (2008). Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science* 17:2023--2037

**Dou** Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J *et al* (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121: 873--885.

**Dou** Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL *et al* (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* 13: 713--719.

**Ernst** P, Wang J, Huang M, Goodman RH, and Korsmeyer SJ (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* 21, 2249-2258.

- Ernst**, P., Mabon, M., Davidson, A. J., Zon, L. I., and Korsmeyer, S. J. (2004). An MLL-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* 14, 2063-2069.
- Estable** MC, NaghaviMH, Kato H, Xiao H, Qin J, Vahlne A and Roeder RG (2002). MCEF, the Newest Member of the AF4 Family of Transcription Factors Involved in Leukemia, Is a Positive Transcription Elongation Factor-b-Associated Protein. *J Biomed Science* 9: 234-245
- Eswar**, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, Chapter 5, Unit 5.6.
- Evan**, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616.
- Fair** K, Anderson M, Bulanova E, Mi H, Tropschug M, and Diaz MO (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* 21, 3589-3597.
- Faundez**, V., and Hartzell, H.C. (2004). Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci. STKE* 233, re8.
- Felix** CA, Hosler MR, Slater DJ, Megonigal MD, Lovett BD, Williams TM, Nowell PC, Spinner NB, Owens NL, Hoxie J, Croce CM, Lange BJ and Rappaport EF (1999). Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Molecular Diagnosis* 4(4): 269-83.
- Gaussmann** A, Wenger T, Eberle I, Bursen A, Bracharz S, Herr I, Dingermann T, and Marschalek R (2007). 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, 3352-3363.
- Goh** AM, Coffill CR, Lane DP (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 223(2):116-26.
- Greenman** C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA and Stratton MR (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446(7132):153-158.
- Gu** Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, and Canaani E (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 71, 701-708.

- 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.
- Hanson**, R. D., Hess, J. L., Yu, B. D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N. M., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., Seto, M., and Korsmeyer, S. J. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14372-14377.
- Herzkowitz**, I., Functional inactivation of genes by dominant negative mutations (1987). *Nature* 329:219-222
- Hess** JL, Yu BD, Li B, Hanson R and Korsmeyer SJ (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* 90(5): 1799-806.
- Hoffbrand**, AV, Pettit JE, Moss PAH, and Hoelzer D (2003). "Grundkurs Hämatologie."
- 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.
- Hopp**, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L., and Conlon, P.J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nat. Biotech.* 6, 1204-1210.
- Hsieh**, J.J., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (2003a). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 23, 186-194.
- Hsieh**, J.J., Cheng, E.H., and Korsmeyer, S.J. (2003b). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* 115, 293-303.
- Huber**, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., and Steigemann, W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 89: 73–101.
- Hughes** CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC *et al* (2004). Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* 13: 587--597.
- Huntsman** DG, Chin SF, Muleris M, Batley SJ, Collins VP, Wiedemann LM, Aparicio S, Caldas C (1999). MLL2, the second human homolog of the *Drosophila* trithorax gene, maps to 19q13.1 and is amplified in solid tumor cell lines. *Oncogene* 18(56):7975-84.
- Isaacs** AM, Oliver PL, Jones EL, Jeans A, Potter A, Hovik BH *et al* (2003). A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* 23: 1631--1637.
- Isnard** P, Coré N, Naquet P, Djabali M (2000). Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* 96: 705--710.

- Johansson B**, Moorman AV, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S and Secker-Walker LM (1998). Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 12(5): 779-87.
- Judge DP**, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC (2004). Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 114(2):172-81.
- Khan, J.A.**, Dunn, B.M., and Tong, L. (2005). Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL. *Structure* 13, 1443-1452.
- Kobayashi, N.**, Boyer, T.G. and Berk, A.J.: A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 6465-73.
- Kowarz E**, Burmeister T, Lo Nigro L, Jansen MW, Delabesse E, Klingebiel T, Dingermann T, Meyer, C and Marschalek R (2007). Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia* 21, 1232-1238.
- Krivtsov AV**, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, Xia X, Jesneck J, Bracken AP, Silverman LB, *et al.* (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355-368.
- Laskowski, R.A.**, MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* 26, 283-291.
- Lee JT**, Chen DY, Yang Z, Ramos AD, Hsieh JD, Bogoy M (2009). Design, syntheses, and evaluation of Taspase1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5086-5090
- 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 AT** (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.
- Liu H**, Cheng EH and Hsieh JJ. (1999). MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol. Ther.* 8(13):1204-1211
- Liu, H.**, Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2007). Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCCdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev* 21, 2385-2398.
- Ma C**, Staudt LM (1996). LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* 87: 734--745.



- Matthews**, B.W., Sigler, P.B., Henderson, R., and Blow, D.M. (1967). Threedimensional structure of tosyl-a-chymotrypsin. *Nature* 214: 652–656.
- Marschalek** R, Nilson I, Lochner K, Greim R., Siegler G, Greil J, Beck JD and Fey, GH (1997). The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* 27, 417-428.
- Meyer** C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsauro G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molckentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T and Marschalek R (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23(8):1490-1499
- Meyer** C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, den Boer ML, *et al.* (2006). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 20, 777-784.
- Meyer** C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, Pieters R, *et al.* (2005). Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 449-454.
- Metzler**, M., Forster, A., Pannell, R., Arends, M. J., Daser, A., Lobato, M. N., and Rabbitts, T. H. (2006). A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using invertebrate technology. *Oncogene* 25, 3093-3103.
- Milne**, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.
- 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., *et al.* (2005). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 749-754.
- Mononen** I, Fisher KJ, Kaartinen V and Aronson NN Jr. (1993). Aspartylglycosaminuria: protein chemistry and molecular biology of the most common lysosomal storage disorder of glycoprotein degradation. *FASEB J.* 7, 1247–1256.
- Nakamura** T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, and Canaani E (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.
- Nilson** I, Reichel M, Ennas MG, Greim R, Knorr C, Siegler G, Greil J, Fey GH and Marschalek R (1997). 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, 157- 169.

- Nilson I, Lochner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH and Marschalek R (1996).** Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* 93, 966-972.
- Oinonen, C., Tikkanen, R., Rouvinen, J., and Peltonen, L. (1995).** Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1102–1108.
- Oinonen, C., and Rouvinen, J. (2000).** Structural comparison of Ntnhydrolases. *Protein Sci.* 9, 2329–2337.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C.M. and Mazo, A. (2001).** Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 294, 1331-4.
- Pless, B., Oehm, C., Knauer, S., Stauber, R.H., Dingermann, T., Marschalek, R (2011).** The heterodimerization domains of MLL - FYRN and FYRC - are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* 2011 Jan 14 [Epub ahead of print].
- Polgar L. (2005).** The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci.* 62(19-20):2161-72.
- Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, Erfurth FE, Eaton K, Lu J, Grimes HL, et al. (2009).** Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 113: 3314-3322.
- Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y, Leshkowitz D, Croce CM and Canaani E (1995).** Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 12160-12164.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Gutierrez-Fernandez, A., Velasco, G., and Lopez-Otin, C. (2005).** A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 331–334.
- Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, Raimondi SC, Shuster JJ, Head DR, Crist WM, Land VJ, Pullen DJ and Steuber CP (1991).** Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 77(3): 440-7.
- Qian, X., Guan, C., and Guo, H.C. (2003).** A dual role for an aspartic acid in glycosylasparaginase autoproteolysis. *Structure* 11, 997-1003.
- Rabbitts TH (1991).** Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641-644.
- Reaman GH, Sposto R, Sensel MG, Lange BJ, Feusner JH, Heerema NA, Leonard M, Holmes EJ, Sather HN, Pendergrass TW, Johnstone HS, O'Brien RT, Steinherz PG, Zeltzer PM, Gaynon PS, Trigg ME and Uckun FM (1999).** Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology* 17(2): 445-55.

- Reichel M**, Gillert E, Breitenlohner I, Repp R, Greil J, Beck JD, Fey GH and Marschalek R (1999). Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res* 59, 3357-3362.
- Reichel M**, Gillert E, Angermuller S, Hensel JP, Heidel F, Lode M, Leis T, Biondi A, Haas OA, Strehl S, *et al.* (2001). Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* 20, 2900-2907.
- Rowley JD** (1992). The der(11) chromosome contains the critical breakpoint junction in the 4;11, 9;11, and 11;19 translocations in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 264-266.
- Rubnitz JE**, Behm FG and Downing JR (1996). 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 10(1): 74-82.
- So CW**, Lin M, Ayton PM, Chen EH and Cleary ML (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 4(2): 99-110.
- Stroud**, R.M., Kay, L.M., and Dickerson, R.E. (1974). The structure of bovine trypsin: Electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2-7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 83: 185-208.
- 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.
- Taki T**, Kano H, Taniwaki M, Sako M, Yanagisawa M, Hayashi Y (1999). AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14535--14540.
- Tenen DG**, Hromas R, Licht JD, and Zhang DE (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489-519.
- 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., and *et al.* (1993). Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 329, 909-914.
- Thomas M**, Gessner A, Vornlocher HP, Hadwiger P, Greil J and Heidenreich O (2005). Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* 106, 3559-3566.
- Tkachuk DC**, Kohler S and Cleary ML (1992). Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71, 691-700.
- Tschiersch B**, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G and Reuter G (1994). 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: 3822-3831.

- Tyagi, S., Chabes, A. L., Wysocka, J., and Herr, W. (2007).** E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* 27, 107-119.
- Wang, Y., and Guo, H.C. (2010).** Crystallographic snapshot of glycosylasparaginase precursor poised for autoprocessing. *J. Mol. Biol.* 403, 120-130.
- Werner M. (1999).** Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik.
- Wlodawer, A. (1995).** Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. *Structure* 3, 417-420.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., and Allis, C. D. (2005).** WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-872.
- Xia ZB, Popovic R, Chen J, Theisler C, Stuart T, Santillan DA, Erfurth F, Diaz MO and Zeleznik-Le NJ (2005).** The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14028-14033.
- Xu, Q., Buckley, D., Guan, C., and Guo, H.-C. (1999).** Structural insights into the mechanism of intramolecular proteolysis. *Cell* 98, 651-661.
- Yano T, Nakamura T, Blechman J, Sorio C, Dang CV, Geiger B and Canaani E (1997).** Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7286-7291.
- Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML and Ohki M (2002).** Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100, 3710-3718.
- Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I et al (2004).** Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 24: 5639--5649.
- Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E., and Korsmeyer, S. J. (1998).** MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10632-10636.
- Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995).** Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.
- Zhou, H., Spicuglia, S., Hsieh, J.J., Mitsiou, D.J., Høiby, T., Veenstra, G.J., Korsmeyer, S.J., Stunnenberg, H.G. (2006)** Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2728-2735.
- Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R III, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley J D et al. (1991).** Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10735-1

## 9 Danksagung

Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung des spannenden Themas, gute Betreuung, hilfreiche Ideen und schnelle Durchsicht der Arbeit.

Prof. Dr. Theodor Dingermann für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung.

Tim Geppert für die Modellierung der Taspase1.

Dr. Bettina Hofmann für Anregungen und freundliche Unterstützung.

Meinen gesamten Laborkollegen: Dr. Birgit Pless, Dr. Irina Eberle, Dr. Jens Rabenstein, Silvia Bracharz, Jenny Merkens, Freia Pfeil, Caro Prella, Bastian Scholz, Jenny Hsieh, Katharina Karl, Dr. Nadine Spilger, Christian Engelbrecht, Dr. Anne Benedikt, Dr. Eric Kowarz, Dr. Claus Meyer, Dr. Ilse Zündorf und Dr. Heidi Bursen danke ich für die schöne Zeit.

Insbesondere danke ich meiner Familie, Tobias Courtial und Sevil Bähr für die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit.

Hiermit erkläre ich Samaneh Sabiani, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Frankfurt am Main, den \_\_\_\_\_