



Funktionelle Analyse der onkologisch relevanten Protease Threonin-Aspartase 1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
in Mainz

vorgelegt von Désirée Wunsch
geboren am 19.07.1984 in Wiesbaden

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Erstaunen ist der Beginn der Naturwissenschaft.

- Aristoteles -

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....1

2. Einleitung7

 2.1 Krebs und Tumorgenese..... 7

 2.2 Proteasen..... 9

 2.3 Krebs und Proteasen 11

 2.4 Threonin Aspartase1 - Taspase1..... 13

 2.5 Physiologische Relevanz der Taspase1 15

 2.5.1 Taspase1 Zielproteine: MLL 15

 2.5.2 Taspase1 Zielproteine: TFIIA 17

 2.5.3 Weitere potentielle Taspase1-Zielproteine 19

 2.5.4 Taspase1 und Zellzyklus-Kontrolle 20

 2.5.5 Subzelluläre Taspase1-Lokalisation 21

 2.6 Taspase1 und Krebsentstehung 23

 2.6.1 Bedeutung für die Leukämieentstehung 23

 2.6.2 Beitrag zur Tumorgenese 25

 2.7 Ein zellbasiertes Testsystem für die Taspase1 27

 2.8 Drosophila Taspase1 28

 2.9 Post-translationale Modifikationen 30

 2.9.1 Acetylierung und Deacetylierung 32

 2.9.2 Acetylierung und Deacetylierung von Nicht-Histon-Proteinen 35

 2.10 Zielsetzung der Arbeit..... 37

3. Ergebnisse 38

 3.1 Strategien zur Inhibition der onkogenen Taspase1-Aktivität..... 38

 Chemico-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of Threonin-Aspartase-1 ... 38

 3.2 Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von Taspase1 55

 3.2.1 Fly versus Man: Evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of Drosophila's Taspase1 55

 3.2.2 Evolutionary divergence of Threonine Aspartase1 leads to species-specific substrate recognition 66

3.3 Untersuchungen der post-translationalen Acetylierung von Taspase1.....	74
3.3.1 Dynamische Acetylierung/ Deacetylierung von Taspase1.....	74
3.3.2 Spezifische Interaktion von Taspase1 und HDAC1.....	77
3.3.3 Charakterisierung möglicher Taspase1-Acetylierungsstellen.....	79
3.3.4 Funktionelle Auswirkungen der Taspase1-Acetylierung.....	81
4. Diskussion und Ausblick.....	87
5. Material und Methoden.....	99
5.1 Material.....	99
5.2 Methoden.....	111
6. Referenzen.....	123
7. Anhang.....	128
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	128
7.2 Plasmid-Karten.....	132
7.3 Eidesstattliche Erklärung.....	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Modell zur Tumorgenese.....	8
Abbildung 2.2: Struktur der Taspase1 aus kristallografischer Analyse.	14
Abbildung 2.3: Die Struktur des MLL-Proteins mit funktionellen Domänen und relevanten Interaktionspartnern.	15
Abbildung 2.4: Der zellbasierte BioTasp-Assay zur Bestimmung der Taspase1-Aktivität.....	28
Abbildung 2.5: Schematische Domänenorganisation von HDAC1 und HDAC2	35
Abbildung 3.1: Inhibitionsstrategien zur Hemmung der onkogenen Aktivität von Taspase1..	38
Abbildung 3.2: Modell eines Importin- α /Nucleophosmin1-basierten Mechanismus zur Feinregulation des Taspase1-Degradoms von Invertebraten zu Vertebraten.....	56
Abbildung 3.3: Die Acetylierung und Deacetylierung von Taspase1 über HATs/ HDACs	75
Abbildung 3.4: Identifizierung der Interaktionsdomäne von Taspase1 und HDAC1.	78
Abbildung 3.5: Massenspektrometrische Analyse potentieller Taspase1-Acetylierungsstellen.	80
Abbildung 3.6: Einfluss der Taspase1-Acetylierung auf die Prozessierung der MLL-Spaltstellen.....	82
Abbildung 3.7: Einfluss des Taspase1-Acetylierungsstatus auf die USF2-Prozessierung.....	83
Abbildung 3.8: Differentielle Aktivität der TaspaseK258-Acetylierungsmutanten bezüglich MLL- und USF2-Spaltung.....	85
Abbildung 4.1: Vergleich der Regulation von humaner und <i>Drosophila</i> Taspase1	90
Abbildung 4.2: Modell der Acetylierungs-/Deacetylierungs-gesteuerten Regulation der Taspase1-Aktivität.....	96
Abbildung 5.1: Prinzip der SOE-PCR (nach (Heckman und Pease 2007)).....	112
Abbildung 5.2: Funktionsschema eines Fluoreszenzmikroskops	119
Abbildung 7.1: Schematische Darstellung eines pc3-Plasmids.	132
Abbildung 7.2: Schematische Darstellung eines pc3-GFP-Plasmids.....	132
Abbildung 7.3: Schematische Darstellung eines pc3-Biosensor-Plasmids.	133

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Einteilung der Protease-Familien nach katalytischem Mechanismus mit typischen humanen Vertretern	10
Tabelle 2.2: Auswahl potentieller und experimentell verifizierter Taspase1-Zielproteine.....	20
Tabelle 2.3: Auswahl kovalenter Protein-Modifikationen und deren Funktionen.....	30
Tabelle 2.4: Übersicht der Klassifizierung und Eigenschaften der humanen HDAC.....	33
Tabelle 2.5: Auswahl acetylierter Nicht-Histon-Proteine und biologische Auswirkungen der Modifikation	36

1. Zusammenfassung

Krebs stellt eine der häufigsten Todesursachen in Europa dar. Grundlage für eine langfristige Verbesserung des Behandlungserfolgs von Tumorerkrankungen ist ein molekulares Verständnis der Mechanismen, welche zur Krankheitsentstehung und Progression beitragen (Habtemichael *et al.*, *Gene*, 2010; Stauber *et al.*, *Histology and Histopathology*, 2010). In diesem Zusammenhang spielen Proteasen nicht nur eine wichtige Rolle in (patho)biologischen Prozessen, sondern stellen auch bei vielerlei Erkrankungen bereits anerkannte Zielstrukturen derzeitiger Behandlungsstrategien dar. Die bislang jedoch sehr unterschiedliche klinische Wirksamkeit von Protease-Inhibitoren wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass die molekularen Regelkreise, welche die Protease-Aktivität kontrollieren sowie die Gesamtheit der von Proteasen prozessierten Proteine, das „Protease-Degradom“, oftmals noch unverstanden sind.

Die Protease Threonin Aspartase 1 (Taspase1) spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von *Mixed Lineage Leukemia* (MLL)-Fusionsproteinen und somit bei der Entstehung aggressiver Leukämien. Darüber hinaus spielt die Taspase1-induzierte Spaltung des MLL-Proteins eine wichtige, Spezies-übergreifende physiologische Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Aktuelle Arbeiten unterstreichen zudem die onkologische Relevanz von Taspase1 auch für solide Tumore (Bier *et al.*, *PLoS One*, 2012). Neben MLL-Proteinen wurden bereits einige weitere *bona fide* Threonin Aspartase 1-Zielproteine identifiziert sowie weitere Substrate in unterschiedlichen Spezies vorhergesagt. Die Kenntnisse über die molekularen Mechanismen und Signalnetzwerke, welche für die (patho)biologischen Funktionen von Taspase1 verantwortlich sind, stellen sich allerdings noch immer als bruchstückhaft dar.

Um diese bestehenden Wissenslücken zu schließen, sollten im Rahmen der Arbeit neue Strategien zur Inhibition von Taspase1 erarbeitet und bewertet werden. Zusätzlich sollten neue Einsichten in evolutionären Funktionsmechanismen sowie eine weitergehende Feinregulation von Taspase1 erlangt werden.

Zum einen erlaubte die Etablierung und Anwendung eines zellbasierten Taspase1-Testsystem, chemische Verbindungen auf deren inhibitorische Aktivität zu testen (Wünsch *et al.*, *Blood Cancer*, 2012). Überraschenderweise belegten solch zelluläre Analysen in Kombination mit *in silico*-Modellierungen eindeutig, dass ein in der Literatur postulierter Inhibitor in lebenden Tumorzellen keine spezifische Wirksamkeit gegenüber Taspase1 zeigte (Wünsch *et al.*, *Blood Cancer*, 2012). Als mögliche Alternative wurden darüber hinaus Ansätze zur genetischen Inhibition evaluiert. Obwohl publizierte Studien Taspase1 als $\alpha\beta\beta$ -Heterodimer beschreiben, konnte durch Überexpression katalytisch inaktiver Mutanten kein *trans*-dominant negativer Effekt und damit auch keine Inhibition des wildtypischen Enzyms beobachtet werden (Bier *et al.*, *PLoS One*, 2012). Weiterführende zellbiologische und

biochemische Analysen belegten erstmalig, dass Taspase1 in lebenden Zellen in der Tat hauptsächlich als Monomer und nicht als Dimer vorliegt (Bier *et al.*, *Faseb J*, 2012). Überraschenderweise führte dagegen eine genetisch erzwungene Dimerisierung zur Inhibition der Protease (Bier *et al.*, *Faseb J*, 2012). Diese Ergebnisse implizieren, dass eine durch chemische Substanzen induzierte Dimerisierung als potentielle Inhibitionsstrategie verfolgt werden könnte.

Die Identifizierung evolutionär konservierter bzw. divergenter Funktionsmechanismen lieferte bereits in der Vergangenheit wichtige Hinweise zur Inhibition verschiedenster krebserrelevanter Proteine. Da in *Drosophila melanogaster* die Existenz und funktionelle Konservierung eines Taspase1-Homologs postuliert wurde, wurde in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit die evolutionäre Entwicklung der *Drosophila* Taspase1 (dTaspase1) untersucht.

Obwohl Taspase1 als eine evolutionär stark konservierte Protease gilt, konnten wichtige Unterschiede zwischen beiden Orthologen festgestellt werden (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015; Wünsch *et al.*, *BiolChem*, 2015). Neben einem konservierten autokatalytischen Aktivierungsmechanismus, welcher vom essentiellen Nukleophil Threonin¹⁹⁵ abhängt, besitzt dTaspase1 verglichen mit dem humanen Enzym eine flexiblere Substraterkennungssequenz, was zu einer Vergrößerung des *Drosophila*-spezifischen Degradoms führt (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015). Diese Ergebnisse zeigen des Weiteren, dass zur Definition und Vorhersage des Degradoms nicht nur proteomische (Docter *et al.*, *Nature Proto*, 2014), sondern auch zellbiologische und bioinformatische Untersuchungen geeignet und notwendig sind.

Interessanterweise ist die differentielle Regulation der dTaspase1-Aktivität zudem auf eine veränderte intrazelluläre Lokalisation zurückzuführen. Das Fehlen von in Vertebraten hochkonservierten aktiven Kernimport- und nukleolären Lokalisationssignalen erklärt, weshalb dTaspase1 weniger effizient nukleäre Substrate prozessiert (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015). Somit scheint die für die humane Taspase1 beschriebene Regulation von Lokalisation und Aktivität über eine Importin- α /NPM1-Achse erst im Laufe der Entwicklung der Vertebraten entstanden zu sein. Es konnte also ein bislang unbekanntes evolutionäres Prinzip identifiziert werden, über welches eine Protease einen Transport- bzw. Lokalisations-basierten Mechanismus zur Feinregulation ihrer Aktivität „von der Fliege zum Menschen“ nutzt (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015).

Eine weitere Möglichkeit zur dynamischen Funktionsmodulation bieten post-translationale Modifikationen (PTMs) der Proteinsequenz, zu welcher nicht nur die proteolytische Prozessierung, sondern insbesondere auch Phosphorylierung und Acetylierung einzelner Aminosäuren zählen. So kann die Aktivität der Protease selbst gesteuert werden, allerdings wurden jedoch bislang kaum PTMs für Proteasen im Gegensatz zu beispielsweise Kinasen beschrieben.

Interessanterweise konnte für die humane Taspase1 über den Einsatz unabhängiger Methoden einschließlich massenspektrometrischer Analysen eine Acetylierung durch verschiedene Histon-Acetyltransferasen (HATs) nachgewiesen werden. Diese Modifikation erfolgt reversibel, wobei vor allem die Histon-Deacetylase HDAC1 durch Interaktion mit Taspase1 die Deacetylierung der Protease katalysiert. Funktionelle Analysen deuten auf eine bislang unbeschriebene post-translationale Feinregulation der proteolytischen Aktivität hin. Während Taspase1 in ihrer aktiven Konformation acetyliert vorliegt, kommt es nach Deacetylierung zu einer Reduktion ihrer enzymatischen Aktivität. Somit scheint die Modulation der Taspase1-Aktivität nicht allein über intra-proteolytische Autoaktivierung, Transport- und Interaktionsmechanismen, sondern zudem durch post-translationale Modifikationen gesteuert zu werden. Dies erweitert nicht nur unser generelles Verständnis der Funktionsweise dieser Protease, sondern eröffnet eine neue therapeutisch zugängliche Regulationsebene, möglicherweise sogar über die Verwendung bereits klinisch eingesetzter HDAC-Modulatoren.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit entscheidende neue Einblicke in die (patho)biologische Funktion und Feinregulation der Taspase1 gewonnen werden. Diese Ergebnisse stellen nicht nur einen wichtigen Schritt in Richtung eines verbesserten Verständnis der „Taspase1-Biologie“, sondern auch zur erfolgreichen Inhibition und Bewertung der krebsrelevanten Funktion dieser Protease dar (Übersichtsartikel: Wunsch *et al.*, eingereicht).

Summary

Cancer represents the second leading cause of death in Europe. Key for the long-term improvement of clinical success is an understanding of the molecular mechanisms contributing to disease development and progression (Habtemichael *et al.*, *Gene*, 2010; Stauber *et al.*, *Histology and Histopathology*, 2010). In this context, proteases not only play an important role in (patho)biological processes, but are already clinically approved targets of current treatments. However, clinical failure of some protease inhibitors is attributed to limited knowledge of protease-modulated signalling pathways as well as of the so called “protease’s degradome”, i.e. the entity of all substrates.

The protease threonine aspartase 1 (Taspase1) plays an essential role for the activation of *Mixed Lineage Leukemia* (MLL) fusionproteins and thus for the development of aggressive leukemias. Also, Taspase1-induced cleavage of the MLL protein plays an important physiological role in developmental and differentiation processes. In addition, recent insights strongly promote the oncological relevance of Taspase1 also for solid tumors (Bier *et al.*, *PLoS One*, 2012). Besides MLL proteins a variety of Taspase1 *bona fide* target proteins have been identified and are predicted in different species. However, our knowledge about the molecular mechanisms being responsible for the (patho)biological functions of Taspase1, is still incomplete. Also, no effective Taspase1 inhibitor is available to date.

In order to fill this existing knowledge gap, new Taspase1 interference strategies were developed and evaluated in the context of this thesis. Additionally, new insights into evolutionary and potential fine-regulation mechanisms of Taspase1 should be gained.

The establishment and application of a cell-based Taspase1 assay enabled to test the inhibitory effect of chemical compounds on Taspase1’s activity (Wünsch *et al.*, *Blood Cancer*, 2012). Surprisingly, cellular assay results as well as *in silico* modelling clearly demonstrated that previously postulated Taspase1 inhibitors were inactive in living tumor cells (Wünsch *et al.*, *Blood Cancer*, 2012). As an alternative strategy, genetic inhibition of the protease was investigated. Although previous studies proposed that Taspase1 is active as an $\alpha\beta\beta$ -heterodimer, overexpression of catalytic inactive mutants did not result in a *trans* dominant negative effect and thus, failed to inhibit the wildtype Taspase1 enzyme (Bier *et al.*, *PLoS One*, 2012). Further biological and biochemical analyses proved for the first time that active Taspase1 exists predominantly as a monomer in living cells (Bier *et al.*, *Faseb J*, 2012). Surprisingly, genetically enforced dimerization lead to inhibition of the protease (Bier *et al.*, *Faseb J*, 2012) suggesting to exploit the concept of chemical dimerizers as a potential inhibition strategy.

In the past, the identification of evolutionary conserved or diverging functional mechanisms already provided important insights leading to the inhibition of different oncological relevant proteins. Since the existence and functional conservation of a Taspase1 homolog was postulated in *Drosophila melanogaster*, the function and evolutionary development of *Drosophila* Taspase1 (dTaspase1) was further examined.

Although Taspase1 has been characterized as an evolutionary highly conserved protease, important differences could be demonstrated here for both orthologs (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015; Wünsch *et al.*, *BiolChem*, 2015). Besides a conserved autocatalytic activation mechanism depending on the essential nucleophile threonine195, dTaspase1 exhibits a more flexible substrate recognition sequence compared to human Taspase1 which leads to an enlarged degradome in *Drosophila* (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015). Furthermore, the results demonstrated that for the definition and prediction of a degradome not only proteomic (Docter *et al.*, *Nature Proto*, 2014), but also biological as well as bioinformatic analyses are suitable and also necessary.

Interestingly, the species-specific regulation of dTaspase1's activity could be also attributed to differences in its intracellular localization. The lack of active nuclear and nucleolar targeting signals in dTaspase1, which are highly conserved in vertebrates, provides an explanation for the rather inefficient cleavage of nuclear substrates (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015). Thus, the regulation of localization and activity via the importin- α /NPM1-axis described for human Taspase1 has evolved during vertebrate development. Collectively, this thesis describes a hitherto unknown evolutionary principle how a protease exploits a transport-based mechanism to fine-tune its degradome and proteolytic activity "from fly to man" (Wünsch *et al.*, *Faseb J*, 2015).

Besides localization, post-translational modifications (PTMs) represent another mechanism allowing a dynamic regulation of protein functions. Important PTMs include phosphorylation and acetylation, which in contrast to kinases have not yet been identified for proteases.

Interestingly, independent methods, including mass spectrometry analyses, demonstrated that Taspase1 is indeed acetylated by different histone acetyl transferases (HATs). This modification of lysine residues occurs reversible and deacetylation of Taspase1 is mediated by the binding of the histone deacetylase HDAC1. Functional analyses further indicate a post-translational fine-regulation of Taspase1's proteolytic activity which has not been described for a protease so far. Whereas Taspase1 is acetylated in its active conformation, deacetylation results in decreased enzymatic activity. Thus, Taspase1's activity could not only be regulated by intra-proteolytic self-activation, transport and interaction mechanisms, but also by post-translational modifications. These results enlarge our general understanding

of Taspase1's function, but additionally suggest to further investigate clinically approved HDAC inhibitors to rationally regulate Taspase1's activity.

In summary, essential new insights into the (patho)biological functions and regulation of Taspase1 could be gained during this thesis. These results do not only represent an important step towards an improved understanding of "Taspase1 biology", but also for an effective inhibition and evaluation of its oncological relevance (review article: Wunsch *et al.*, submitted).

2. Einleitung

2.1 Krebs und Tumorgenese

In der heutigen Gesellschaft der Industrienationen ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache, so dass die Erforschung der Hintergründe und die Möglichkeiten zur Bekämpfung der Erkrankung immer mehr an Bedeutung gewinnen. Nur bei entsprechender Kenntnis der genauen Eigenschaften maligner Zellen sowie der molekularen Hintergründe der Entartung ist es möglich neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Unter Krebs versteht man in der Medizin einen bösartigen (malignen) Tumor, also eine unkontrolliert wachsende Neubildung von Körperzellen. Die Bezeichnung „Krebs“ geht vermutlich auf Hippokrates zurück, den die Auswüchse von Brustgeschwüren an die Beine des Krustentieres (griechisch: *karkinoma*) erinnerten.

Statistisch gesehen erkrankt jeder dritte Europäer an Krebs, wobei in 75% der Fälle Patienten über 60 Jahren betroffen sind, so dass man Krebs als eine Alterserkrankung der Zellen bezeichnen kann. In Deutschland erkrankten im Jahr 2014 etwa 500.000 Menschen an Krebs, wobei gehäuft Krebserkrankungen der Lunge, Brustdrüse, Prostata und Dickdarm auftraten. Bei Kindern unter 15 Jahren kommt es häufig zu Tumoren des Gehirns und Rückenmarks, Leukämien und zum Lymphknotenbefall. Die derzeitige Heilungsrate bei allen Krebserkrankungen beträgt durchschnittlich 30 bis 40%. Als geheilt wird in der Onkologie ein Patient bezeichnet, der mindestens fünf Jahre lang ohne Rückfall (Rezidiv) überlebt.

Die Krebsentstehung ist ein komplexer Prozess, der bislang nicht vollständig verstanden ist. Bekannt ist, dass einige Umstände die Entartung von Körperzellen begünstigen können. Zu den kanzerogenen Faktoren gehören beispielsweise das Rauchen, andere chemische oder physikalische Noxen wie UV- oder ionisierende Strahlung sowie familiäre Disposition (Ames et al. 1995). Weiterhin können einige Viren Krebs auslösen, wofür die Gebärmutterhalskrebs-auslösenden humanen Papillomaviren ein bekanntes Beispiel darstellen. Deren Entdecker Nobelpreisträger Harald zur Hausen schätzt, dass gut 20% aller Krebserkrankungen auf virale oder bakterielle Infektionen zurückzuführen sind (zur Hausen 2009).

Nach dem „Mehrstufenmodell“ der Tumorgenese ist die Tumorentstehung nicht auf ein einzelnes Ereignis zurückzuführen, sondern wird vermutlich durch eine Anhäufung von Mutationen in einer Zelle ausgelöst. Dadurch wird eine normale Körperzelle in eine bösartige Tumorzelle transformiert. Die für eine Entartung entscheidenden Mutationen finden vor allem in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen statt (Hanahan und Weinberg 2000). Unter

Protoonkogenen versteht man solche Gene, die für Zellwachstum und Differenzierung wichtige Proteine codieren. Durch eine dominante Mutation, die zu einem Funktionsgewinn (*gain-of-function*) führt, können sie in Onkogene umgewandelt werden, welche wiederum Tumorwachstum fördern können. Zu den von Protoonkogenen codierten Proteinen zählen Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren.

Im Gegensatz zu Protoonkogenen codieren Tumorsuppressorgene für Proteine, deren Funktionsverlust durch eine *loss-of-function* Mutation zur Entartung von Zellen führen kann. Zu dieser Genklasse gehören Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose wie p16, p27 oder p53, die in ihrer natürlichen Funktion die Wahrscheinlichkeit für eine Tumorentstehung zu senken vermögen.

Neben den erwähnten Onkogen- und Tumorsuppressor-Proteinen existieren eine Vielzahl verschiedener Proteine, die in Tumorzellen dereguliert sind und dadurch zur Manifestation des onkogenen Phänotyps beitragen. Als nur ein Beispiel ist das „*inhibitor of apoptosis protein*“ (IAP) Survivin zu nennen, welches in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt und durch die Beeinflussung verschiedener Signalwege das Überleben dieser Zellen verbessert (Habtemichael et al. 2010; Unruhe et al. 2015). Die entarteten Zellen eines bösartigen Tumors weisen demnach eine Reihe von charakteristischen Veränderungen in ihrer Physiologie auf, die in einem Modell nach Hanahan und Weinberg (2000) zusammengefasst wurden (siehe Abb. 2.1).

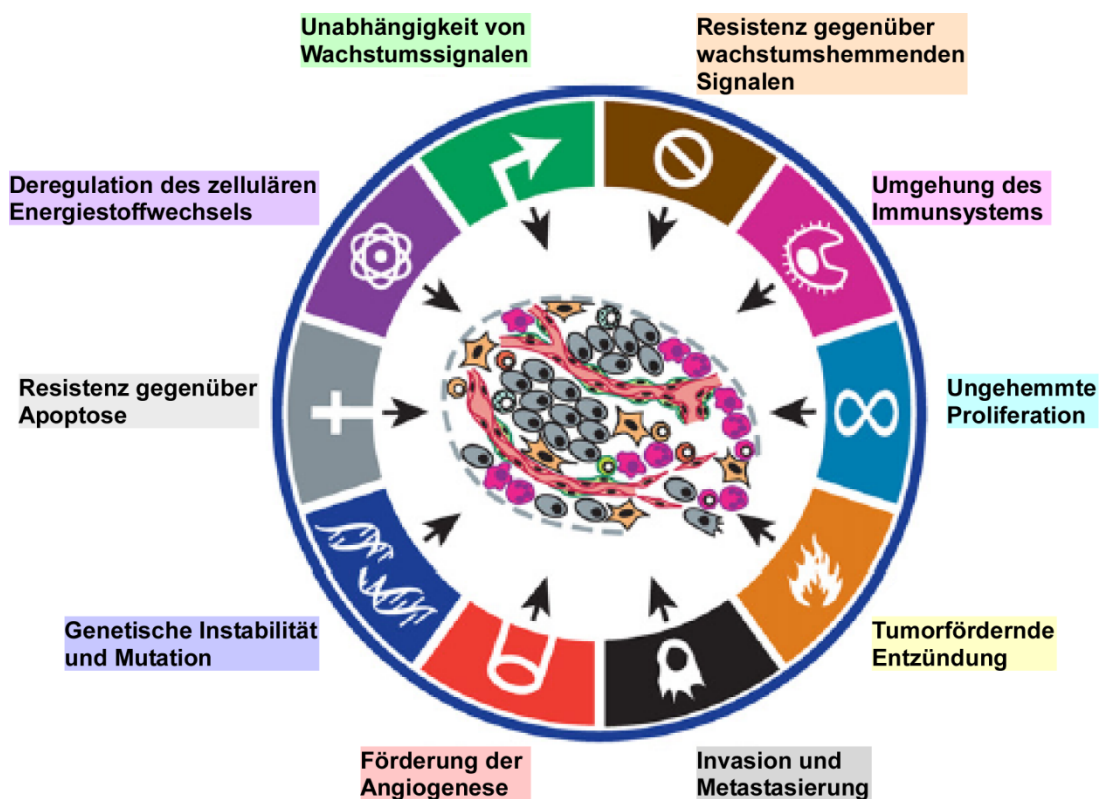


Abbildung 2.1: Modell zur Tumorgenese (verändert nach (Hanahan und Weinberg 2011).

Details siehe Text.

Zu den wichtigsten dieser Eigenschaften zählen die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen und die zum Teil dadurch bedingte unbegrenzte Teilungsfähigkeit. Weiterhin sind Tumorzellen zur Umgehung der Apoptose und der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogeneese) befähigt. Durch die Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren induziert der Tumor die Ausbildung eines Kapillarnetzes und sorgt damit für eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des soliden Tumors. Eine weitere charakteristische Eigenschaft ist das Einwachsen der entarteten Zellen in tumorumgebendes Gewebe und die Bildung von Tochtergeschwulsten (Metastasierung). Durch dieses invasive Wachstum des Tumors kommt es zum Durchbruch in Blut- und Lymphgefäße, und der Tumor entlässt entartete Zellen in die Gefäße. Die im Körper zirkulierenden Zellen können sich in unterschiedlichen Geweben festsetzen und Metastasen bilden. Häufig sind davon stark durchblutete Organe, wie Lunge, Gehirn und Leber, betroffen. Dieses Modell wurde vor kurzer Zeit erweitert und dadurch die Bedeutung von tumorfördernder Entzündung, der Umgehung des Immunsystems sowie der Deregulation des Energiestoffwechsels zum Ausdruck gebracht. Des Weiteren trägt genetische Instabilität und Mutation zum erheblichen Teil zur Tumorentstehung bei und vervollständigt somit das heute gültige Gesamtbild der Tumorgenese.

2.2 Proteasen

Alle essentiellen Prozesse und Abläufe in Zellen sind maßgeblich von einer koordinierten Bildung und Entsorgung der notwendigen Proteine abhängig. Während die komplexe Steuerung von Protein-Expression auf DNA- und RNA- Ebene intensiv erforschte Gebiete der Proteomik darstellen, wurde der Abbau von Proteinen (Proteolyse) anfangs hauptsächlich als unspezifischer Prozess beschrieben (Lopez-Otin und Overall 2002). Die für die Proteolyse zuständigen Enzyme, die Proteasen, katalysieren die Spaltung von Proteinen durch Hydrolyse der Peptidbindungen. In den letzten Jahrzehnten wurde die Bedeutung dieses Vorganges immer klarer und es entstand ein neuer Zweig der Proteinforschung („Degradomik“), der sich ausschließlich mit der Struktur und Funktion von Proteasen beschäftigt (Lopez-Otin et al. 2002). Demnach stellen Proteasen in allen Lebewesen hoch spezialisierte Enzyme dar, die durch ihre Substratspezifität maßgeblich an der Regulation biologischer Prozesse beteiligt sind (Lopez-Otin und Matrisian 2007). Die irreversible und spezifische Spaltung von Proteinen reguliert dabei sowohl Aktivität, als auch das zelluläre Schicksal vieler Proteine durch Beeinflussung von Lokalisation und Aktivierung bzw. Inaktivierung weiterer Enzyme, Cytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren (Lopez-Otin et

al. 2002). Dadurch werden wichtige zelluläre Prozesse maßgeblich beeinflusst, wie DNA-Replikation, Zellzyklus, Proliferation, Zell-Differenzierung und -Migration, Hämostase, Wundheilung, Immunantwort, Angiogenese und Apoptose (Barrett 2001; Sternlicht und Werb 2001; Lopez-Otin et al. 2002).

Die unterschiedlichen Proteasen können nach ihrem katalytischen Mechanismus und dem Aminosäurerest, der als Nukleophil für die Spaltung der Peptidbindung verantwortlich ist, klassifiziert werden. Es lassen sich sechs verschiedenen Protease-Familien unterscheiden: Aspartat-, Glutamat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metalloproteasen (siehe Tabelle 2.1) (Doucet und Overall 2008). Die Vertreter der Glutamat-Proteasen kommen bislang nur in Pilzen vor (Sims et al. 2004). Die genannten Familien werden nach einer Vielzahl weiterer Kriterien unterteilt, wobei es auch übergreifende Protease-Familien gibt (vgl. MEROPS Protein Datenbank). Die proteolytische Spaltung erfolgt durch einen nukleophilen Angriff am Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe und wird durch die jeweilige Aminosäure (Cystein, Serin, Threonin) oder durch im aktiven Zentrum komplexierte Wassermoleküle vermittelt (Lah et al. 2006). Einzelne Proteasen können des Weiteren anhand ihrer Spaltungspräferenz innerhalb des Substrates als Exo- oder Endopeptidase charakterisiert werden (Barrett 2001). Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung stellt die Gruppierung nach strukturellen Ähnlichkeiten und somit vermutlich evolutionären Beziehungen der Proteasen untereinander dar. Fast täglich kommen weitere, zum Teil wenig charakterisierte Proteasen hinzu, so dass zum aktuellen Zeitpunkt etwa 700 Proteasen das menschliche Proteasom/Degradom bilden (MEROPS Protein Datenbank, (Barrett 2004).

Tabelle 2.1: Einteilung der Protease-Familien nach katalytischem Mechanismus mit typischen humanen Vertretern (verändert nach (Barrett 2001))

Protease-Familie	Beispiel	Typische Inhibitoren
Aspartat	Pepsin, Cathepsin D und E	Pepstatin
Cystein	Caspasen, Papain, Calpain, Cathepsin K	Iodoacetat
Metallo	MMPs, Kollagenase, ADAMTs	1,10-phenanthrolin
Serin	Trypsin, Kallikrein, Chymotrypsin, Plasmin, Thrombin	Serpine, Aprotinin
Threonin	Proteasom, Glycosylasparaginase	Lactacystin, Bortezomib

MMP: Matrix-Metallo-Proteinase; ADAMT: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motiv

Aufgrund der Irreversibilität der proteolytischen Spaltung ist eine strenge Regulation ihrer Aktivität erforderlich, was *in vivo* auf unterschiedlichen Ebenen erreicht werden kann. Zunächst steht die Expression der Proteasen unter strenger Kontrolle und erfolgt zum Teil nur unter definierten Bedingungen. Eine entscheidende Regulationsebene der Protease-

Aktivität ist die Balance zwischen der inaktiven Enzym-Proform (Zymogen) und dem aktiven Enzym. Proteasen werden meist als inaktives Zymogen exprimiert, welches durch Spaltung in seine aktive Konformation umgewandelt wird. Der jeweilige Aktivierungsmechanismus kann wiederum auf unterschiedliche Art und Weise feingesteuert werden (Doucet et al. 2008). Des Weiteren begrenzt die Kompartimentierung und Lokalisation der Protease ihr Wirkungsspektrum auf die ihr zugänglichen Substrate, welche wiederum durch ihre dreidimensionale Struktur die Enzym-Zugänglichkeit bestimmen. Entscheidend für die Regulation sind außerdem subzelluläre Konzentrationen der Proteasen sowie komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Proteasen innerhalb des Protease Netzwerkes (Doucet et al. 2008). Neben der erheblichen Anzahl humaner Proteasen wurden auch einige endogene Protease-Inhibitoren beschrieben, welche die Enzymaktivität zusätzlich regulieren (Lah et al. 2006) MEROPS Protein Datenbank).

Interessanterweise stammen die meisten Erkenntnisse, die wir heute über die Molekularstruktur, Enzymkinetik und Spezifität des aktiven Zentrums von Proteasen erlangt haben, aus *in vitro* Experimenten (Doucet et al. 2008). Diese artifiziellen Systeme sind jedoch kaum in der Lage die komplexe *in vivo* Situation, in der Proteasen ihre Funktion erfüllen, nachzubilden. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Charakterisierung des Protease-Degradoms, des Substrat-Degradoms und der Erstellung von Expressionsprofilen verschiedener Gewebe im lebenden System.

2.3 Krebs und Proteasen

Neben der Regulation der bereits erwähnten zellulären Prozesse spielt die proteolytische Prozessierung eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumoren. Dabei wurde die Aktivität von Proteasen schon früh mit der Tumor-assoziierten Proteolyse extrazellulärer Matrix-Proteine und der damit verbundenen Gewebeinvasion und Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht (Fisher 1946). Neuere Studien zeigen, dass die Aktivität verschiedener Proteasen in allen Stadien der Tumorentstehung und -progression eine wichtige Rolle spielen (Egeblad und Werb 2002; Borgono und Diamandis 2004; Mohamed und Sloane 2006). So findet man einen Einfluss proteolytischer Aktivität auf viele der nach Hanahan und Weinberg beschriebenen Charakteristika der Tumorgenese (vgl. Abschnitt 2.1), wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung, Angiogenese, Apoptose und Umgehung der Immunantwort (Lah et al. 2006; Lopez-Otin et al. 2007).

Untersuchungen weisen auf eine Redundanz bezüglich der prozessierten Substrate und der Protease-Aktivität hin, so dass von einer koordinierten Organisation der Proteasen ausgegangen werden kann. Es entsteht das Bild eines multidirektionalen Protease-Netzwerkes (Mason und Joyce 2011). Die Komplexität dieses Netzwerkes wird umso klarer,

da Proteasen sowohl anti-tumorale, als auch Tumor-fördernde Eigenschaften besitzen können (Lopez-Otin et al. 2007). Frühe Studien wiesen zunächst ausschließlich auf onkogene Eigenschaften von Proteasen hin. So konnten bereits in den 1970er Jahren einzelne vom Tumor sekretierte Proteasen identifiziert werden, darunter Metalloproteinasen. Cathepsin B war die erste lysosomale Protease, die mit Brustkrebs in Verbindung gebracht wurde (Poole et al. 1978). Die erhöhte Expression und Aktivität verschiedener Proteasen konnte später in weiteren Tumorentitäten gezeigt werden (Mason et al. 2011). Die Erkenntnis, dass die Progression maligner Erkrankungen häufig mit einer Deregulation der normalen Proteolyse assoziiert ist, führte zur Entwicklung von anti-Tumor-Strategien, bei denen Proteasen als Angriffspunkte dienen. Proteasen stellen attraktive Ziele für die Krebstherapie dar, da eine spezifische Hemmung der enzymatischen Aktivität durch Blockierung des aktiven Zentrums erreicht werden kann. Mit Hilfe von Hochdurchsatz-Analysen potentieller Protease-Inhibitoren wurde bereits eine hohe Anzahl sogenannter „*small molecule*“ Inhibitoren identifiziert (Lah et al. 2006). Erste klinische Studien von Metalloprotease-Inhibitoren waren jedoch enttäuschend, da sie nur geringe, keinerlei oder sogar nachteilige Effekte auf die Tumorprogression zeigten (Lah et al. 2006; Lopez-Otin et al. 2007; Mason et al. 2011). Der proteasomale Inhibitor Bortezomib hingegen wird erfolgreich bei der Behandlung des Multiplen Myeloms und Mantelzell-Lymphoms eingesetzt (Curran und McKeage 2009).

Die Ergebnisse der Studien bezüglich der Wirkungsweise von Protease-Inhibitoren lieferten andererseits auch Hinweise darauf, dass Proteasen ebenso anti-tumorale Eigenschaften aufweisen können. Es existieren einige Beispiele für *loss-of-function* Mutationen von Proteasen in verschiedenen Tumorentitäten, wodurch sie sich als Tumorsuppressor im klassischen Sinne qualifizieren (Lopez-Otin et al. 2007). Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle in der Apoptose-Regulation waren die zur Cystein-Protease-Familie gehörigen Caspasen besonders interessant. Weitere Proteasen, für die anti-tumorale Eigenschaften beschrieben wurden, sind Ubiquitinasen, extrazelluläre Proteasen wie Matrix-Metalloproteasen, ADAMTs, Cathepsine und Kallikreine (Lopez-Otin et al. 2007).

Zusammenfassend ergibt sich ein komplexes Bild der Bedeutung verschiedener Proteasen bei der Entstehung und Progression von Tumoren. Trotz initialer Rückschläge ist die Entwicklung pharmakologischer Inhibitoren der Protease-Funktionen ein breites Feld der Krebsforschung geworden, und die genaue Charakterisierung der deregulierten Proteasen und deren Zusammenwirken („Tumor-Degradom“) liefern einen entscheidenden Anteil zum Verständnis der Tumorbiologie.

2.4 Threonin Aspartase1 - Taspase1

Eine im Jahr 2003 charakterisierte Protease, welche aufgrund ihrer (patho-)physiologischen Funktionen eine eigene Klasse unter den proteolytischen Enzymen bildet, ist die Threonin Aspartase1, auch Taspase1 (Hsieh et al. 2003a), MEROPS-Datenbank T02.004). Der Chromosomenabschnitt 20p12.1 codiert das 420 Aminosäuren umfassende Protein, welches eine Asparaginase_2 Homologie-Domäne enthält und somit in die Familie der Typ2-Asparaginasen eingeordnet werden kann. Ein typischer Vertreter dieser Gruppe ist zum einen die L-Asparaginase, die bei der Umwandlung von L-Asparagin in L-Aspartat die Hydrolyse der Amidbindung katalysiert. Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist die Glycosyl-Asparaginase, eine lysosomale Amidase, die für die Hydrolyse der N-Acetylglykosamin-Asparagin-Bindung während der Degradation von Glycoproteinen verantwortlich ist. Taspase1 wurde als die für die Spaltung des MLL-Proteins (*Mixed Lineage Leukemia*) verantwortliche Protease identifiziert und stellt somit innerhalb ihrer Protease-Familie den einzigen bislang bekannten Vertreter mit Endopeptidase-Aktivität (*trans*-Aktivität) dar (Hsieh et al. 2003a).

Das Volllänge Taspase1 Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa und wird nach Expression als inaktives Proenzym in zwei ungleiche Untereinheiten gespalten, die α -Untereinheit (28 kDa) und β -Untereinheit (22 kDa). Wie für Typ2-Asparaginasen charakteristisch erfolgt die intramolekulare Spaltung autokatalytisch (*cis*-Aktivität), im Falle von Taspase1 namensgebend zwischen Aspartat233 und Threonin234. Das an der β -Untereinheit entstehende N-terminale Nukleophil (Thr234) ist dabei essentiell für die Protease-Aktivität des reifen Enzyms (Hsieh et al. 2003a). Die Mutation von verschiedenen für die Substratbindung als wichtig eingestuften Aminosäuren ergab für nahezu alle Mutanten eine negative Beeinflussung der Taspase1-Aktivität (Khan et al. 2005). Besonders stark ist der Einfluss der Mutation des Thr234 in Valin (TV-Mutante), welche sowohl die autokatalytische Spaltung, als auch die Substratspaltung vollständig inhibiert.

Kristallografische Analysen der Taspase1 weisen auf einige strukturelle Gemeinsamkeiten mit Typ 2-Asparaginasen hin, jedoch ergeben sich auch Besonderheiten, die die Einzigartigkeit der Protease unterstreichen (Khan et al. 2005). Als übergeordnete Struktur zeigte sich das Proenzym als Dimer aus zwei Monomeren, während das aktive Enzym in Form eines $\alpha\beta$ -Dimers oder des charakteristischen $\alpha\beta\alpha$ -Heterotetramers nachgewiesen wurde (Khan et al. 2005). Die Struktur der aktiven Taspase1 enthält 14 β -Faltblätter sowie 7 α -Helices, wobei das aktive Zentrum um Thr234 am N-Terminus des β 5-Faltblattes lokalisiert ist. Vergleichende Analysen der Struktur von Proenzym und aktiven Protease zeigen signifikante Konformationsänderungen vor allem im Bereich des aktiven Zentrums, was letztendlich zur Autoaktivierung des Enzyms führt (siehe Abb. 2.2). Es wurden weitere,

2.5 Physiologische Relevanz der Taspase1

2.5.1 Taspase1 Zielproteine: MLL

Initial wurde die Taspase1 als Protease charakterisiert, welche für die Spaltung des *mixed lineage leukemia* (MLL) Proteins verantwortlich ist (Hsieh et al. 2003a). Bei MLL handelt es sich um ein 3969 Aminosäuren umfassendes Protein, welches als Homolog des für *Drosophila* charakteristischen Trithorax (Trx) Proteins entscheidend an der geordneten Regulation der *HOX*-Gen-Expression beteiligt ist (Hsieh et al. 2003a). MLL ist aus einer Reihe konservierter Protein-Domänen mit charakteristischen Funktionen aufgebaut (siehe Abb. 2.3). Neben N-terminalen DNA-Binde-Motiven („AT-hooks“) (Zeleznik-Le et al. 1994) sind das eine transkriptionelle Repressionsdomäne (TRD) bestehend aus den funktionalen Untereinheiten RD1 (DNA-Methyl-Transferase-Homologie-Domäne mit CxxC Zink-Finger Motiv) und RD2 (Rekrutierung von HDAC1 und 2) (Xia et al. 2003), vier PHD-Finger (Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen) (Fair et al. 2001), eine Transaktivierungs-Domäne (CBP-Interaktion) (Ernst et al. 2001) sowie eine C-terminale SET-Domäne mit H3K4-Methyltransferase-Aktivität (Milne et al. 2002; Nakamura et al. 2002).

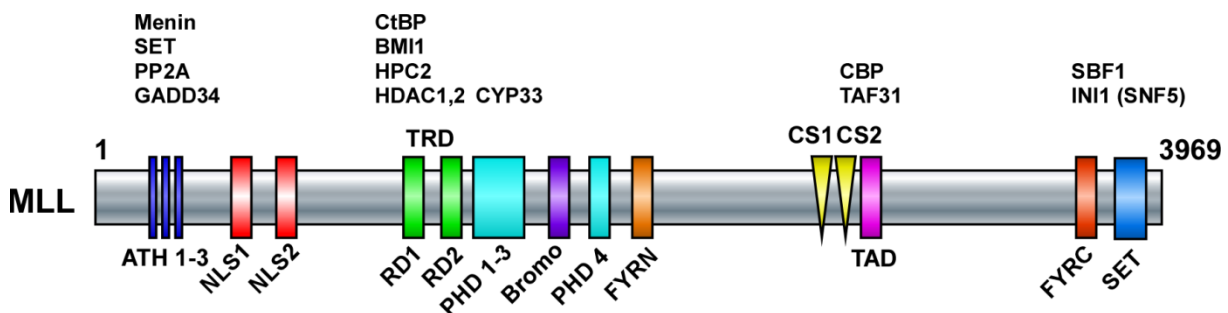


Abbildung 2.3: Die Struktur des MLL-Proteins mit funktionellen Domänen und relevanten Interaktionspartnern.

ATH- AT-hook; NLS- nukleäres Lokalisationssignal; TRD- transkriptionelle Repressionsdomäne (DNA-Methyl-Transferase-Homologie-Domäne); PHD- plant homeodomain finger Motiv; Bromo-Bromodomäne; FYRN- „FY-reiche“ Domäne N-terminal; CS1,2- Taspase1 Cleavage site 1,2; TAD- Transaktivierungsdomäne; FYRC- „FY-reiche“ Domäne C-terminal; SET- Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax Domäne (nach (Krivtsov und Armstrong 2007; Liedtke 2009).

Die funktionelle Bedeutung von MLL für die Kontrolle der Genaktivität wird maßgeblich durch seine zahlreichen Interaktionspartner bestimmt. So kann MLL zum einen direkt über die AT-hook-Domäne an DNA-Bereiche binden, die Interaktion wird jedoch auch über DNA-Bindeproteine, wie dem Tumorsuppressor-Protein Menin, vermittelt (Krivtsov et al. 2007). Die transkriptionelle Repressionsdomäne rekrutiert verschiedene Arten von Repressor-

Proteinen, wie HPC2, BMI1 und CtPB sowie die Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 (Liedtke 2009). Einen aktivierenden Effekt auf die Expression der Zielgene übt MLL unter anderem durch die Interaktion der Transaktivierungsdomäne mit der Histonacetyltransferase CBP (CREB-binding Protein) aus. Die Funktion als Chromatin-modifizierendes Protein ist dabei nicht nur durch die H3K4-methylierende SET-Domäne gegeben, sondern wird zusätzlich durch die Interaktion mit dem Chromatin-Remodeling Faktor (INI1/SNF5) und Komponenten anderer H3K4-Histon-methyltransferasen (WDR5, RbBP5 und Ash2L) erreicht (Liu et al. 2009).

Verschiedene Maus-Modelle zeigen, dass MLL eine essentielle Rolle bei der *HOX*-Gen-Kontrolle während der Entwicklung innehat (Krivtsov et al. 2007). Eine homozygote MLL-Deletion ist embryonal letal, während heterozygot MLL-defiziente Mäuse ausgeprägte Wachstums-Defekte aufweisen. Embryonale Fibroblasten aus MLL-*knockout*-Mäusen weisen eine spezifische Herunterregulation bestimmter *HOX*-Gencluster (*5'HOX-A und HOX-C*) auf (Hanson et al. 1999). Neben der Regulation der *HOX*-Gene ist MLL zudem maßgeblich an der Kontrolle weiterer Zielgene beteiligt, so dass man von einer globalen Rolle des MLL-Komplexes für die Regulation der Transkription sprechen kann (Krivtsov et al. 2007).

Grundlegend für seine Funktion als Transkriptions-Regulator ist die Spaltung des Volllänge-MLL-Proteins in ein N320 und ein C180 Fragment, welche durch Heterodimerisierung den Gesamt-Komplex stabilisieren und so für die richtige subnukleäre Lokalisation sorgen (Hsieh et al. 2003b; Liu et al. 2009). Dabei wurde Taspase1 als spezifische, für die MLL-Spaltung verantwortliche Protease identifiziert (Hsieh et al. 2003a). Die Spaltung von MLL erfolgt dabei an zwei charakteristischen Sequenzbereichen, die als *cleavage site 1* (CS1; D/GADD) und *cleavage site 2* (CS2; D/GVDD) bezeichnet werden. Beide Sequenzbereiche sind innerhalb der MLL-homologen Proteine evolutionär hoch konserviert, was auf die Bedeutsamkeit dieser Motive für die Prozessierung von MLL hinweist (Hsieh et al. 2003a; Krivtsov et al. 2007). Interessanterweise wird die proteolytische MLL-Prozessierung nach derzeitigem Kenntnisstand durch keinen Vertreter bekannter Protease-Inhibitor-Klassen gehemmt: weder Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (Phosphoamidon, EDTA), der Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen (TLCK, TPCK, Aprotinin, APMSF), noch Cystein-Protease-Hemmstoffe (Iodoacetamid, N-Ethylmaleimide, Leupeptin, E-64, BAF) haben einen Einfluss auf die Taspase1-Aktivität (Hsieh et al. 2003a). Des Weiteren zeigen weder Proteasom-, noch pan-Caspase-Inhibitoren eine hemmende Wirkung, was auf eine einzigartige Protease-Aktivität von Taspase1 hindeutet.

Die Prozessierung der einzelnen MLL-Schnittstellen durch Taspase1 scheint unterschiedlich wirkungsvoll zu sein, wobei die Spaltung von CS2 effizienter erfolgt (Hsieh et al. 2003a). Die Schnittstellen innerhalb des MLL-Proteins sind dabei so lokalisiert, dass eine Spaltung und die anschließende Bildung eines heterodimeren Komplexes vier funktionelle MLL-Domänen

(PHD4, FYRN, FYRC und SET) in räumliche Nähe zueinander bringen. Dies soll die Funktionalität und biochemischen Eigenschaften des MLL-Komplexes ermöglichen (Hsieh et al. 2003a; Liu et al. 2009). So wurde gezeigt, dass das ungeschnittene Volllänge-MLL-Protein eine verminderte Histon-Methyl-Transferase-Aktivität besitzt (Takeda et al. 2006). Seine volle enzymatische Aktivität erlangt der MLL-Komplex erst nach Spaltung durch Taspase1. Der aktive Komplex interagiert dabei direkt mit E2F-Transkriptionsfaktoren, welche wiederum entscheidend an der Expressionskontrolle der Cycline beteiligt sind (vgl. Abschnitt 2.5.4). Außerdem dient der aktivierte MLL-Komplex als Plattform für die Ausbildung von Multi-Protein-Komplexen aus bis zu 30 weiteren Proteinen, die an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt sind (Nakamura et al. 2002).

Die Charakterisierung der Taspase1-Funktion *in vivo* unterstützt die anfängliche Hypothese, dass ihre proteolytische Aktivität in Bezug auf MLL einmalig ist. Mit der Generation von Taspase1-*knockout*-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Taspase1 die einzige für die MLL-Spaltung verantwortliche Protease darstellt (Takeda et al. 2006). Mäuse mit einer Taspase1- Haploinsuffizienz zeigen keine offensichtlichen Anomalien, während homozygote, Taspase1-defiziente Mäuse eine erhöhte postnatale Sterblichkeit aufweisen, was vermutlich auf eine gestörte Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist (Takeda et al. 2006). Des Weiteren zeigen sich bei diesen Tieren schwerwiegende Skelett-Anomalien, wie beispielsweise die Ausbildung zusätzlicher Rippenpaare und unvollständige Segmentierung im Bereich des Sternums. Zusätzlich ist auch eine verminderte Körpergröße der Taspase1-/- Mäuse auffällig, was bereits *in utero* feststellbar ist. Zusammenfassend sprechen die Beobachtungen für eine wichtige Funktion von Taspase1 bei der Ausbildung der korrekten Segmentidentität. Um die biologische Relevanz der MLL-Proteolyse näher zu untersuchen, wurden transgene Mäuse generiert, welche homozygot nicht-spaltbare MLL-Allele tragen (Takeda et al. 2006). Die exprimierten MLL- und MLL2-Proteine enthalten dabei eine mutierte Taspase1-Schnittstelle. Es zeigte sich, dass nicht prozessiertes MLL zu signifikanten Defekten in der Zellproliferation führt. Die feststellbaren Anomalien in Taspase1-/- Zellen sind gravierender als in den MLL-defizienten, so dass man davon ausgehen kann, dass Taspase1 weitere Substrate prozessiert und dadurch unter anderem den Zellzyklus koordinieren kann (Takeda et al. 2006).

2.5.2 Taspase1 Zielproteine: TFIIA

TFIIA stellt nach MLL das zweite identifizierte Substrat der Taspase1 dar.

In Eukaryoten wird während der Transkriptions-Initiation von RNA-Polymerase II-Gene der sogenannte Präinitiations-Komplex gebildet, welcher aus basalen Transkriptionsfaktoren und verschiedenen Aktivatoren aufgebaut ist (Weideman et al. 1997; Thomas und Chiang 2006).

Eine Schlüsselrolle hierbei übernimmt der basale Transkriptionsfaktor 2A (TFIIA), der durch die Interaktion mit Promoter-Binde-Proteinen den Komplex an der DNA stabilisiert (Weideman et al. 1997; Hoiby et al. 2007). TFIIA besteht in höheren Eukaryoten aus drei Untereinheiten, α , β und γ , wobei TFIIA $\alpha\beta$ als Vorläufer durch ein einziges Gen codiert und post-translational in zwei Untereinheiten gespalten wird. Während die γ -Untereinheit innerhalb verschiedener Spezies evolutionär konserviert ist, beschränken sich die Spezies-übergreifenden Ähnlichkeiten von TFIIA $\alpha\beta$ auf kleinere Sequenzabschnitte am N- und C-Terminus beider Untereinheiten. Der TFIIA $\alpha\beta$ -Vorläufer wird spezifisch innerhalb des QVDG-Motivs (aa 272-275) gespalten (Zhou et al. 2006). Dieses Erkennungsmotiv ist zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert, liegt aber in einer weniger stark konservierten und eher unstrukturierten Protein-Region. Die Spaltungssequenz stimmte zur Zeit ihrer Identifizierung mit keiner der bekannten Protease-Konsensus-Sequenzen überein, zeigte jedoch eine große Ähnlichkeit mit der Schnittstelle des MLL-Proteins. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass TFIIA *in vitro* und *in vivo* proteolytisch durch Taspase1 gespalten wird (Zhou et al. 2006; Hoiby et al. 2007).

Die Spaltung von TFIIA wurde bereits vor einigen Jahren beschrieben, wobei davon ausgegangen wurde, dass der TFIIA $\alpha\beta$ -Vorläufer transkriptionell inaktiv ist und somit die Spaltung für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors nötig ist (Weideman et al. 1997). RNAi-*knockdown*-Experimente weisen jedoch darauf hin, dass bereits das ungeschnittene TFIIA $\alpha\beta$ für den Großteil der Transkription ausreichend ist (Zhou et al. 2006). Die Taspase1-vermittelte Spaltung des TFIIA $\alpha\beta$ -Proteins wird vielmehr mit einer verminderten Protein-Stabilität durch verstärkten proteasomalen Abbau in Verbindung gebracht (Hoiby et al. 2004). Aktuelle Studien beschreiben zudem die Bedeutung der TFIIA-Prozessierung durch Taspase1 für eine Gewebe-spezifische Regulation der Genexpression (Oyama et al. 2013; Takeda et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die durch Taspase1 katalysierte TFIIA-Spaltung Testis-spezifische, genetische Programme reguliert und somit die Spermatogenese in Säugetieren aktiviert (Oyama et al. 2013). Eine erst kürzlich erschienene Studie in Mäusen zeigt, dass während der Embryonalentwicklung eine koordinierte TFIIA-Prozessierung durch Taspase1 die Morphogenese des Schädels steuert (Takeda et al. 2015). Dabei führte eine Depletion von Taspase1 zu schweren kraniofazialen Defekten, was auf eine transkriptionelle Deregulation der CDK-Inhibitoren p16Ink4a und p19ARF zurückgeführt wird.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass das Verhältnis von gespaltenem zu nicht gespaltenem TFIIA in der Zelle funktionell relevant ist und somit die Taspase1-Prozessierung einen Mechanismus zur Feinregulation der Expression darstellt (Hoiby et al. 2004; Zhou et al. 2006; Hoiby et al. 2007; Oyama et al. 2013; Takeda et al. 2015).

2.5.3 Weitere potentielle Taspase1-Zielproteine

Neben MLL und TFIIA wurden zunächst keine weiteren Zielproteine identifiziert, obwohl nach Experimenten mit *Knockout*-Mäusen die Existenz weiterer Taspase1-Substrate als wahrscheinlich galt (Takeda et al. 2006). Eine erste Herangehensweise war dabei eine Genom-weite *in silico* Vorhersage möglicher Zielproteine mit Hilfe einer *Cleavage site*-Konsensus-Sequenz. Die zur Analyse des Taspase1-Degradoms vorgeschlagene Konsensus-Sequenz ($Q^3 X^2 D^1 / G^1$, X= beliebige aa) erlaubt eine solche Vorhersage nur bedingt, da die hohe Anzahl an potentiellen Substraten (>1400) eine experimentelle Validierung nahezu unmöglich macht. Durch eine verbesserte Charakterisierung der Taspase1-Erkennungssequenz ($Q^3(F,I,L,V)^2 D^1 / G^1 X^2 D^3 D^4$) konnte eine stringente Vorhersage durchgeführt werden (Bier et al. 2011b; Knauer et al. 2011). Die stark eingegrenzte Datenbanksuche ergab eine Liste von 27 potentiellen Taspase1 Zielproteinen mit unterschiedlicher zellulärer Lokalisation und molekularer Funktion. Eine genauere statistische Analyse zeigte eine auffällige Häufung großer Proteine, die aus mehr als 800 Aminosäuren aufgebaut sind. Dies lässt vermuten, dass solche Proteine vornehmlich an der Bildung großer Protein-Komplexe beteiligt sind und somit deren proteolytische Spaltung durch Taspase1 ein Mechanismus zu dessen Feinregulation darstellen könnte (Bier et al. 2011b). Als Beispiel hierfür dienen das bereits verifizierte Taspase1-Zielprotein MLL sowie die für verschiedene Erkrankungen relevanten MLL-Fusionsproteine (vgl. Abschnitt 2.6.1). Aus der Liste der potentiellen Substrate konnte die Spaltung durch Taspase1 für einige Proteine experimentell verifiziert werden (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Auswahl potentieller und experimentell verifizierter Taspase1-Zielproteine
(Bier et al. 2011b)

Gen	Name	Länge (aa)	Sequenz	Funktionen
MLL1	Mixed lineage leukemia	3969	SAEG QVDGADD LSTS PKIS QLDGVDD GTES	Zelltod, Transkription, Entwicklungsprozess, Modifikation der zellulären Komponenten
MLL4	Mixed lineage leukemia 2 protein	2715	PRIE QLDGVDD GTDS	Transkription, Modifikation der zellulären Komponenten
MYO1F	Myosin-1F	1098	SDTY QVDGTDD RSDF	unbekannt
TFIIA	Allgemeiner Transkriptionsfaktor 2A	485	GEII QVDGSGD TSSN	Transkription, Regulation der Transkription, Transkriptionsinitiation
NXF2	Nukleärer RNA Export Faktor 2	626	NKLY QLDGLSD ITEK	Nukleo-zytoplasmatischer Transport, Entwicklungsprozess
NXF5	Nukleärer RNA Export Faktor5	397	NKLY QLDGLSD ITEK	Nukleo-zytoplasmatischer Transport, Entwicklungsprozess
USF2	Upstream stimulatory factor 2	346	VTDG QLDGQGD TAGA	Transkription, Homöostase

Auffallend ist, dass sich neben TFIIA, mit USF2 ein weiterer, zudem onkologisch relevanter Transkriptionsfaktor unter den Zielproteinen befindet (Luo und Sawadogo 1996a; Ismail et al. 1999; Qyang et al. 1999). Das USF2-Protein (*upstream stimulatory factor 2*) dimerisiert mit USF1 und reguliert dadurch über sogenannte E-box-Motive die transkriptionelle Aktivität der entsprechenden Zielgene (Luo und Sawadogo 1996b; Calomme et al. 2002; Allen et al. 2005; Corre und Galibert 2005). Die Spaltung von USF2 könnte hierbei einen feinregulatorischen Mechanismus der Transkriptions-Kontrolle darstellen, ähnlich wie es für TFIIA vorgeschlagen wird (Zhou et al. 2006; Bier et al. 2011b).

2.5.4 Taspase1 und Zellzyklus-Kontrolle

Einen entscheidenden Beitrag zum genaueren Verständnis der biologisch relevanten Funktionen von Taspase1 lieferte die Generierung von Taspase1-*knockout*-Mäusen (Takeda et al. 2006; Chen et al. 2010). Wie bereits erwähnt, war besonders die verminderte Körpergröße dieser Tiere im Vergleich zu wiltypischen Mäusen auffällig. Ein solcher Phänotyp geht meist mit einer Deregulation von Zellzyklus-Signalwegen und/oder

Zellproliferation einher (Takeda et al. 2006). Tatsächlich konnte bei genaueren Analysen gezeigt werden, dass Taspase1-defiziente Zellen eine verminderte Expression von Zellzyklus-regulierenden Cyclinen (Cyclin E, A und B), eine Überexpression von p16Ink4a sowie einen leicht erhöhten Level an p21, p27 und ARF aufweisen (Takeda et al. 2006). Die Regulation dieser Gene wird dabei direkt durch Taspase1-vermittelte MLL-Spaltung gesteuert, da die Aktivität des MLL-Komplexes maßgeblich von der Taspase1-Prozessierung abhängt (vgl. Abschnitt 2.5.1). Aktuell konnte zudem die Bedeutung der TFIIA-Spaltung für die Expressionskontrolle der CDKIs p16Ink4a- und p19ARF während der Schädel-Morphogenese der Maus gezeigt werden (Takeda et al. 2015).

Die erhöhte Expression von p16Ink4a sowie die verminderte Expression von Cyclin E in Taspase1-/- Zellen sprechen für eine Blockierung des Zellzyklus beim Übergang der G1- in die S-Phase. Bei Zellzyklus-Analysen wurde ein erhöhter Anteil an Taspase1-defizienten Zellen in der Ruhephase bestätigt (Takeda et al. 2006).

Zusammenfassend ist Taspase1 in verschiedenen Geweben an der Koordination des geordneten Zellzyklus beteiligt, wobei die genauen Mechanismen noch unverstanden sind.

2.5.5 Subzelluläre Taspase1-Lokalisation

Eine typische Eigenschaft und wichtiger Teil der zellulären Regulationsmaschinerie in Eukaryoten ist die kontrollierte Verteilung von Makromolekülen in subzellulären Kompartimenten. Der Transport zwischen Zellkern und Plasma stellt einen streng regulierten Vorgang dar, an dem Kernporenkomplexe, spezifische Proteinsignale und eine Zahl verschiedener Rezeptormoleküle beteiligt sind. Als gut verstanden unter den verschiedenen Transportwegen gilt der klassische nukleäre Import-Signalweg, der durch die Bindung eines nukleären Lokalisations-Signals (NLS) an das Adapter-Protein Importin- α vermittelt wird (Lange et al. 2007). Nach Erkennung des NLS im *Cargo*-Protein transportiert Importin- α dieses in den Zellkern, wobei zusätzlich eine Komplex-Bildung mit einem weiteren Karyopherin- β Protein, Importin- β , erfolgt. Anschließend wird das „Fracht-Protein“ unter RanGTP-Bindung ins Nukleoplasma entlassen. Der entgegengesetzte nukleäre Export-Prozess von Proteinen erfolgt über die Erkennung eines nukleären Export-Signals (NES) bestehend aus einer kurzen Leucin-reichen Aminosäure-Abfolge durch den Export-Rezeptor CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) (Nguyen et al. 2012). Proteine, die beide Signalsequenzen enthalten, besitzen die Fähigkeit zwischen Zellkern und Zytoplasma zu wandern, wobei meist eines der Signale überwiegt und die vorherrschende Lokalisation des Proteins bestimmt. Ein solches „shuttle“ Protein ist Nucleophosmin 1 (NPM1), welches sich zwischen Zellkern, Nukleolus und Zytoplasma bewegt und somit unterschiedliche Funktionen

in der Ribosomen-Biogenese und Zentrosomen-Ausbildung übernehmen kann (Frehlick et al. 2007).

Die subzelluläre Lokalisation ist auch für die proteolytische Aktivität der Taspase1 von entscheidender Bedeutung, da für die Spaltung ihrer Substrate der Zugang in das jeweilige Kompartiment gewährleistet sein muss. Überexpression von Fusionsproteinen sowie immunohistologische Färbungen charakterisieren Taspase1 als ein nukleäres Protein, welches hauptsächlich an den Nukleoli akkumuliert (Bier et al. 2011a). Über subzelluläre Fraktionierungsstudien konnte zudem ein geringer Anteil im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die spezifische nukleoläre Lokalisation wird dabei über ein NLS oder nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS) vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass Taspase1 ein zweiteiliges NLS im C-Terminus der α -Untereinheit besitzt (aa ¹⁹⁷**KRNK**RKLELAER VDTDFMQL**KRR**²²⁰, essentielle aa unterstrichen) (Bier et al. 2011a). Dieser Bereich des Proteins ist zwischen den Taspase1-Homologen verschiedener Spezies evolutionär hoch konserviert, was seine biologische Relevanz unterstreicht.

Um den funktionellen Ablauf des aktiven Taspase1 Kernimportes näher zu charakterisieren, wurde eine mögliche Interaktion mit dem Import-Adapter-Protein Importin- α untersucht. Es konnte eine direkte Interaktion von Taspase1 und Importin- α nachgewiesen werden, wobei die Interaktion durch eine Mutation des NLS aufgehoben wurde (Bier et al. 2011a). Interessanterweise lokalisieren inaktive Taspase1-Mutanten, wie die TaspaseT234V-Mutante, ebenso im Zellkern und interagieren mit Importin- α , was auf ein funktionelles Taspase1-NLS im Proenzym hindeutet. Somit wäre die autokatalytische Spaltung zur Aktivierung der Protease nicht entscheidend für einen durch das NLS vermittelten Kernimport. Umgekehrt scheint der nukleäre Import von Taspase1 aber essentiell sowohl für ihre *cis*-, als auch die *trans*-Aktivität zu sein, da die Import-defiziente Taspase1-NLS-Mutante beide katalytischen Aktivitäten einbüßt (Bier et al. 2011a).

Die beschriebene NLS-Sequenz des Taspase1-Proteins ist alleine nicht in der Lage die nukleoläre Akkumulation zu vermitteln, so dass diese charakteristische Lokalisation durch Komplexierung mit anderen Proteinen zustande kommen muss. Ein Kandidat hierfür stellt das bereits erwähnte nukleoläre *shuttle*-Protein NPM1 dar, welches sich durch seine Signalsequenzen zwischen verschiedenen Kompartimenten bewegen kann (Frehlick et al. 2007). In der Tat zeigen Untersuchungen eine exakte Kolo-kalisation von Taspase1 und NPM1 an den Nukleoli sowie eine direkte Interaktion beider Proteine (Bier et al. 2011a). Die Interaktion ist dabei stark genug, um die zytoplasmatische Taspase1-Variante (Tasp_{cyt}) durch NPM1-Expression an die Nukleoli zu binden. Umgekehrt führt die Expression der zytoplasmatischen NPM1-Mutante (NPM_{MutA}), welche häufig in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nachweisbar ist, zu einer vermehrt zytoplasmatischen Lokalisation wildtypischer Taspase1.

Die beschriebene Interaktion mit NPM1 könnte somit nicht nur die nukleoläre Lokalisation der Taspase1 bedingen, sondern auch den Zugang zu zytoplasmatischen Substraten gewährleisten. Die *in silico* Vorhersage des Taspase1-Degradoms basierend auf einer verbesserten Konsensus-Sequenz für die Taspase1-Schnittstelle (vgl. Abschnitt 2.5.3) ergab 12 potentielle Ziel-Proteine außerhalb des Nukleus (Bier et al. 2011b). Da innerhalb der Taspase1-Sequenz kein Exportsignal identifiziert werden konnte, jedoch eine geringe Menge Protein im Zytoplasma nachweisbar ist, kann man davon ausgehen, dass Taspase1 über Interaktion mit einem *shuttle*-Protein in dieses Kompartiment gelangt.

Basierend auf diesen Ergebnissen ergibt sich ein Modell, das beschreibt, wie die Interaktion mit Importin- α und NPM1 die proteolytische Funktion von Taspase1 beeinflusst. Dies stellt einen neuen Mechanismus der Regulation von Aktivität und Lokalisation einer Protease dar und liefert erstmals eine Vorstellung davon, wie Taspase1 die Spaltung verschiedener Substrate in unterschiedlichen Kompartimenten bewerkstelligt.

2.6 Taspase1 und Krebsentstehung

2.6.1 Bedeutung für die Leukämieentstehung

Die Protease Taspase1 mit ihren spezifischen Substraten stellt ein interessantes Ziel für die Tumorforschung dar, da eine Taspase1-Überexpression in verschiedenen malignen Erkrankungen nachgewiesen wurde (Takeda et al. 2006; Chen et al. 2010; Bier et al. 2011a; Bier et al. 2012a). Erste Untersuchungen befassten sich hierbei vor allem mit der Bedeutung der Taspase1 bei der Leukämogenese, der Entstehung und Manifestation von malignen Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems. Der Zusammenhang ergibt sich durch die Charakterisierung der Taspase1 als die für die MLL-Prozessierung und -Aktivierung verantwortliche Protease (vgl. Abschnitt 2.5.1), da die Entstehung vieler Leukämieformen eng mit veränderten MLL-Proteinen verknüpft ist (Ayton und Cleary 2001; Armstrong et al. 2002; Liu et al. 2009).

MLL-assoziierte Leukämien machen über 50% der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) im Kleinkindalter sowie bis zu 10% der akuten myeloischen Leukämie (AML) und ALL bei Kindern und Erwachsenen aus (Liu et al. 2009). Genexpressions-Studien weisen auf die Besonderheiten der Kind-Leukämien im Vergleich zu anderen Leukämie-Formen hin und man findet einige MLL-Zielgene, darunter bestimmte HOX-Gene, hochreguliert (Armstrong et al. 2002). Neben dem gehäuften Auftreten von veränderten MLL-Proteinen in den erwähnten Leukämie-Formen findet man diese zudem in der sogenannten biphänotypischen Leukämie. Dies ist eine akute Leukämie, die eine Mischform darstellt (*mixed lineage leukemia*, MLL), da die leukämischen Blasten sowohl myeloische, als auch lymphatische Marker (beispielsweise

CD14 und CD 19) exprimieren (Krivtsov et al. 2007). Die Prognose für Patienten mit einer MLL-assoziierten ALL ist besonders schlecht verglichen mit Patienten, die unter anderen ALL-Formen leiden (Krivtsov et al. 2007). Diese beschriebenen Eigenschaften der MLL-assoziierten Leukämien führten zu einem besonderen Interesse an der Erforschung dieses Krankheitsbildes und der MLL-Biologie.

Bei der Krankheitsentstehung und -manifestation spielen insbesondere MLL-Fusionsproteine eine zentrale Rolle, die durch Translokationen zwischen dem MLL-codierenden Chromosomenabschnitt 11q23 und anderen Genabschnitten entstehen (Krivtsov et al. 2007; Liu et al. 2009). Bislang wurden über 100 verschiedene MLL-Fusionsproteine beschrieben, an deren Bildung über 60 *Translokationspartner-Gene* beteiligt sind (Liu et al. 2009). Bei den fünf häufigsten Translokations-Partnern, die zusammen in 80% der MLL-assoziierten Leukämien zu finden sind, handelt es sich um die nukleären Proteine AF4, AF9, ENL, AF10 sowie das zytoplasmatische Protein AF6 (Krivtsov et al. 2007). Des Weiteren findet man unter den Fusionspartnern Septine (Sept2, Sept5, Sept6) und die Histon-Acetyltransferasen CBP und p300, welche auch zu den natürlichen Interaktionspartnern des wildtypischen MLL-Proteins zählen (Krivtsov et al. 2007). Einige der MLL-Fusionsproteine weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf, da sie meist durch eine Chromosomen-Translokation an einer sogenannten *breakpoint cluster*-Region zwischen dem Exon 8 und 13 des *MLL*-Gens entstehen. Dabei werden Fusionsproteine gebildet, die ohne Leserahmenverschiebung die ersten 8 bis 13 Exons des MLL-Proteins sowie eine variable Anzahl Exons des Fusionspartners umfassen. Eine gemeinsame Eigenschaft aller MLL-Fusionsproteine ist die Erhaltung der N-terminalen AT-hook und Zinkfinger-CxxC-Motive, welche essentiell für die Transformations-Fähigkeit der MLL-Fusionen zu sein scheinen (Krivtsov et al. 2007). Des Weiteren kommt es in nahezu allen MLL-Fusionsproteinen zu einem Verlust der C-terminalen SET-Domäne, welche die H3K4-Methylierung vermittelt (Krivtsov et al. 2007; Liu et al. 2009). Trotz Verlust dieser funktionellen Domäne sind die MLL-Fusionsproteine weiterhin in der Lage, die Transkription der *HOX-A*-Cluster-Gene und anderer positiv zu regulieren.

Genetische Studien an Maus-Modellen konnten grundlegende Erkenntnisse über die Bedeutung der MLL-Fusionsproteine liefern. Zum einen sind die Fusionspartner unerlässlich für die Leukämie-Entstehung und können zudem den resultierenden Phänotyp bestimmen. Zum anderen entwickeln selbst Mäuse mit unspezifischen Proteinen als Fusionspartner (z.B. β -Galactosidase) eine maligne Erkrankung (Liu et al. 2009).

Anhand zahlreicher experimenteller Hinweise werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wodurch die bereits erwähnte Aktivierung der Genexpression durch MLL-Fusionen bedingt sein kann. Als erstes ist ein Transaktivierungs-Mechanismus vorstellbar, bei dem es zur Aktivierung von Zielgenen durch vom Fusionspartner eingebrachte

Aktivierungsdomänen kommt (Krivtsov et al. 2007; Liu et al. 2009). So enthalten die zu den häufigsten MLL-Fusionspartnern gehörenden Proteine AF4, AF9 und ENL transkriptionelle Aktivierungsdomänen. Eine weitere Möglichkeit der Transaktivierung wird über eine Chromatin-Modifikation vermittelt. Diese erfolgt entweder direkt durch einen Fusionspartner (CBP/p300) oder durch Rekrutierung eines Histon-modifizierenden Komplexes. Des Weiteren könnte eine verstärkte Dimerisierung des in allen Fusionsproteinen enthaltenen MLL-N-Terminus die onkogenen Eigenschaften bewirken (Krivtsov et al. 2007; Liu et al. 2009). Ein weiterer Effekt ist zudem die Stabilisierung des MLL-N-Terminus durch den jeweiligen Fusionspartner (Liu et al. 2009).

2.6.2 Beitrag zur Tumorgenese

Neben der Bedeutung für die Entstehung und Manifestation verschiedener Leukämieformen weisen einige Untersuchungen darauf hin, dass die Taspase1-Aktivität auch bei der Entstehung solider Tumore eine Rolle spielen könnte.

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle von Taspase1 während der Tumorgenese lieferte die Beobachtung, dass Taspase1-defiziente Zellen *in vitro* eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber Ras-, Myc- und DNp53-induzierter onkogener Transformation aufweisen (Takeda et al. 2006). Zudem findet man Taspase1 in verschiedenen soliden Tumorentitäten überexprimiert (Takeda et al. 2006; Chen et al. 2010; Bier et al. 2011a).

Das Phänomen, dass durch die Ausschaltung spezieller Onkogene Tumorzellwachstum effektiv gehemmt und dadurch die Überlebensprognose für den Patienten verbessert werden kann, bezeichnet man als „*oncogene addiction*“ (Weinstein und Joe 2008). Es beschreibt somit die Abhängigkeit eines Tumors von der deregulierten Expression eines Proto-Onkogens, wie ein solches Gen im Normalzustand genannt wird. Proto-Onkogene codieren meist für Proteine, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren, wie beispielsweise RAS, WNT, MYC, ERK und TRK (Luo et al. 2009). Neuere Untersuchungen führten zudem zur Entwicklung einer weiteren Hypothese, der sogenannten „*non-oncogene addiction*“ Hypothese zu Tumorwachstum und -erhaltung. Dieser Annahme zufolge ist der onkogene Status einer Zelle von der Aktivität vieler verschiedener Gene und Signalwege abhängig, welche für sich gesehen keine (Proto-)Onkogene darstellen (Luo et al. 2009). Ein entscheidendes Charakteristikum hierbei ist, dass diese Gene und Signalwege essentiell für die Unterstützung des onkogenen Phänotyps der Krebszellen sind, jedoch nicht im gleichen Maße für die Viabilität gesunder Zellen benötigt werden. Diese neu charakterisierte Klasse stellt ein weiteres interessantes Ziel für die Krebstherapie dar. Als am besten untersuchte Vertreter dieser Gruppe gelten das 26S-Proteasom, HSF1 und IRF4 (Luo et al. 2009).

Taspase1 wird zudem zur Aufrechterhaltung eines vollständigen Krebs-Phänotyps benötigt (Chen et al. 2010). Zwar stellt Taspase1 kein Onkogen im klassischen Sinne dar, aktiviert jedoch in Zellen typische Krebseigenschaften und kann somit als *non-oncogene addiction* Protease klassifiziert werden. Einige Untersuchungen unterstützen eine mögliche Rolle von Taspase1 bei der Tumorerhaltung. In verschiedenen Tumorzelllinien konnte eine Überexpression des Taspase1-Proteins nachgewiesen werden und ein *knockdown* in diesen Zellen führte zu verminderter Zellproliferation (Chen et al. 2010). Dieser Effekt war unterschiedlich stark ausgeprägt, wobei Zellen mit sehr hohen Taspase1-Mengen stärker beeinträchtigt wurden. Diese Zellpopulationen waren somit auch stärker von einer Taspase1-Überexpression zur Aufrechterhaltung ihres Phänotyps abhängig.

Des Weiteren konnte in Krebszellen eine leicht erhöhte Apoptose-Rate nach Taspase1-*knockdown* beobachtet werden (Chen et al. 2010). Um die Bedeutung von Taspase1 bei der Regulation der Apoptose genauer zu untersuchen, wurde die Sensitivität für Anoikis, also die durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten ausgelöste Apoptose, genauer analysiert. Demnach sensitivierte ein Taspase1-Verlust die Zellen für Anoikis, was auf eine Beteiligung von Taspase1 an der Regulation des programmierten Zelltods in Krebszellen schließen lässt (Chen et al. 2010). Die weitere Analyse von Apoptose-Regulatoren ergab zudem eine verminderte MCL1-Expression nach Taspase1-*knockdown* in Krebszelllinien. Bei MCL1 handelt es sich um ein anti-apoptisches Protein der Bcl-2-Familie, welches über Interaktion mit verschiedenen Partnern das Zellüberleben sichert (Thomas et al. 2010). Eine Taspase1-Defizienz führt über einen verminderten MCL1-Level zu einer gesteigerten Apoptose-Sensitivität in Melanom- und Glioblastom-Zelllinien (Chen et al. 2010). Genauere Analysen legen nahe, dass die verminderte MCL1-Proteinmenge nach Taspase1-*knockdown* nicht durch eine veränderte transkriptionelle Aktivität, sondern vielmehr durch eine verringerte Protein-Stabilität von MCL1 bedingt ist (Chen et al. 2010). Vermittelt wird diese vermutlich durch eine verminderte Expression der Deubiquitinase USP9X, welche unter anderem für die Regulation der MCL1-Halbwertszeit verantwortlich ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass Taspase1 MCL1 auf Proteinebene stabilisiert, wobei die MCL1-Halbwertszeit durch transkriptionelle Kontrolle der USP9X-Expression reguliert wird.

Eine typische Eigenschaft von Krebszellen stellt die Deregulation der Proliferations- und Zellzyklus-Kontrolle dar (Hanahan et al. 2011). Wie in Abschnitt 2.5.4 erläutert ist die Taspase1 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, indem sie unter anderem die Expression verschiedener Cycline moduliert. Eine aktuelle Studie beschreibt die Bedeutung dieser Taspase1-abhängigen Cyclin E Aktivierung für die Entstehung von Brusttumoren (Dong et al. 2014). So gewährleistet Taspase1 die Akkumulation der notwendigen Cycline und reguliert damit die Proliferation von HER2/neu-exprimierenden Brustkrebs-Zellen. Dies wird über die MLL-Prozessierung und die damit verbundene Kontrolle der Cyclin-Expression

gesteuert. Die Ergebnisse wurden in einem etablierten Brustkrebs-Mausmodell (*MMTV-neu*) verifiziert. Somit konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass die Taspase1-abhängige MLL-Spaltung essentiell an der HER2/neu-induzierten Tumorgenese beteiligt ist und im Umkehrschluss Taspase1-defiziente Mäuse vor dieser Brustkrebs-Entstehung geschützt sind.

Zusammenfassend scheint Taspase1 durch ihre proteolytische Aktivität gegenüber verschiedenen Zielproteinen an einer Reihe biologischer Funktionen beteiligt zu sein. Dazu zählen neben Differenzierungsprozessen während der Entwicklung zudem Zell-Proliferation und Apoptose. Die zugrunde liegenden Mechanismen und wie durch eine deregulierte Taspase1-Aktivität die Entstehung maligner Erkrankungen begünstigt werden kann, bedarf weiterer Untersuchungen.

2.7 Ein zellbasiertes Testsystem für die Taspase1

Einige der bisherigen Erkenntnisse zur Funktionsweise von Taspase1 beruhen auf reinen *in vitro* Studien. Diese artifiziellen Systeme sind nur bedingt zur Analyse von Proteasen geeignet, da eine detaillierte Nachbildung der komplexen *in vivo* Situation, in der Proteasen ihre Funktion erfüllen, kaum möglich ist (Doucet et al. 2008). Zur Verifizierung bisheriger biochemischer Daten in lebenden Zellen wurde erstmals ein zellbasierter Assay entwickelt, welcher die Bestimmung der Taspase1-*trans*-Aktivität erlaubt (Bier et al. 2011b; Knauer et al. 2011). Dazu wurde ein spezieller, fluoreszenter Translokations-Biosensor konstruiert, welcher die Taspase1-Schnittstelle CS2 aus dem MLL-Protein enthält (aa²⁷¹³KISQLD/GVDD²⁷²²). Die Schnittstelle wurde dabei in einen Vektor integriert, der zudem für GST, GFP, das SV40-NLS sowie ein nukleäres Exportsignal aus dem HIV-1 Rev-Protein codiert (siehe Abb. 2.4 a). Das resultierende Fusionsprotein (NLS-GST/GFP-CS2-NESRev, BioTasp) ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wandert dabei jedoch ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma aufgrund der beiden gegensätzlich wirkenden Lokalisations-Signale. Bei Ko-Expression der Taspase1 kommt es durch die proteolytische Prozessierung des Biosensors an der CS2 zur Abspaltung des C-terminalen NES und in Folge dessen zur Akkumulation des fluoreszenten Fusionsproteins im Zellkern (Abb 2.4.b). Die Funktionalität und Spezifität des Assays konnte sowohl durch Behandlung der Zellen mit dem Transport-Inhibitor Leptomycin B (LMB), als auch durch die Integration mutierter Schnittstellen in den Biosensor nachgewiesen werden (Bier et al. 2011b). Neben einer mikroskopischen Bestimmung lässt sich die Spaltung des BioTasp-Sensors durch Taspase1 zusätzlich mittels Western Blot analysieren (Abb. 2.4 c).

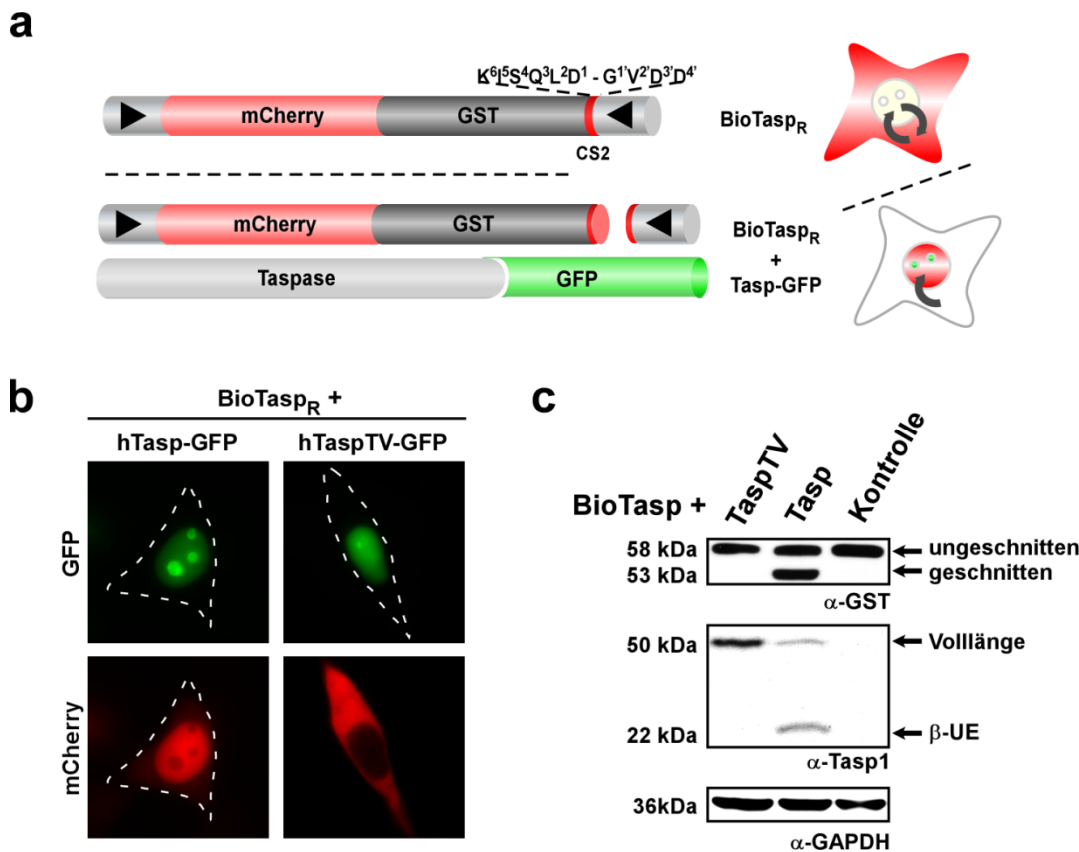


Abbildung 2.4: Der zellbasierte BioTasp-Assay zur Bestimmung der Taspase1-Aktivität *in vivo* (Bier et al. 2011b)

a. Schematischer Aufbau und Funktionsweise des BioTasp-Sensors. **b.** Mikroskopische Bestimmung der Taspase1-Aktivität in HeLa-Zellen. **c.** Western Blot-Analyse der Taspase1-Aktivität in Gesamtzelllysaten von 293T-Zellen. Weitere Erläuterung siehe Text.

Das entwickelte zellbasierte Testsystem zur Analyse der Taspase1-Aktivität leistet einen entscheidenden Beitrag zum genaueren Verständnis der proteolytischen Aktivität und zur Charakterisierung des Taspase1-Degradoms. Es lassen sich erstmals Untersuchungen zur Regulation der Taspase1-Aktivität in eukaryotischen Zellen durchführen, was bei der Verwendung prokaryotisch exprimierten Proteins bislang nicht möglich war. Des Weiteren liefert es ein hilfreiches Werkzeug für eine Hochdurchsatz-Analyse potentieller Taspase1-Inhibitoren.

2.8 *Drosophila* Taspase1

Anhand von Sequenzvergleichen wurden konservierte Taspase1-Orthologe in verschiedenen Insekten- und Vertebraten-Klassen bis hin zur Maus und dem Menschen, jedoch nicht im Nematoden *C. elegans* identifiziert (Hsieh et al. 2003a). Dabei unterscheidet sich das konservierte LDTVGMotiv von den übrigen Vertretern der Typ2-Asparaginasen und scheint somit charakteristisch für die einmalige Spaltungsaktivität von Taspase1 zu sein. Die bislang

beschriebenen Eigenschaften legen nahe, dass sich Taspase1 im Laufe der Evolution von einer Asparagin- und Glykosylasparagin-Hydrolase hin zu einer Endopeptidase entwickelt hat, welche eine spezifische Spaltungs-Sequenz mit Aspartat an Position P1 erkennt (Hsieh et al. 2003a). Ihre Rolle für die durch die MLL-Spaltung vermittelte *HOX*-Gen-Expressionskontrolle weist auf eine Koevolution von Taspase1 und MLL/Trithorax-Proteinen zum Zeitpunkt der Entstehung komplexer Organismen hin.

Nachdem die proteolytische Spaltung der MLL-Proteine und ihre damit einhergehende Aktivierung beschrieben wurde, war es naheliegend, die homologen Trithorax-Proteine aus *Drosophila* auf eine ähnliche Modifikation hin zu untersuchen, zumal Trithorax eine der MLL-CS2 (QLD/GVDD) ähnlichen Erkennungssequenz (QMD/GVDD) enthält. Die *Drosophila* Taspase1 (dTaspase1) ist ein 365 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 38 kDa (Adams et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass *Drosophila* Trx ein Substrat der homologen *Drosophila* Taspase1 darstellt (Capotosti et al. 2007). Dabei entwickelte sich die Enzym-Substrat-Spezifität während der Evolution vermutlich parallel, da sich trotz großer Sequenz-Ähnlichkeiten die Spaltung der Substrate MLL und Trx durch die Taspase1-Homologen unterscheidet. Die Taspase1-Aktivität scheint somit an ihr jeweiliges Substrat angepasst zu sein und besitzt nur bei dessen Umsetzung optimale Aktivität, nicht jedoch bei der Umsetzung Art-fremder Substrate (Capotosti et al. 2007).

In Gegensatz dazu ergab die Analyse des als konserviert geltenden Proteins HCF-1 (*host cell factor 1*) die Entwicklung verschiedener proteolytischer Signalwege. Während das *Drosophila*-Homolog dHCF als Zielprotein für dTaspase1 dient, wird das entsprechende Protein HCF-1 im Menschen nicht durch Taspase1, sondern einen ungewöhnlichen proteolytischen Signalweg prozessiert (Capotosti et al. 2007).

Neben ihrer proteolytischen Aktivität bezüglich des Trithorax- und HCF-Proteins in *Drosophila* wurden bislang keine weiteren Funktionen der dTaspase1 *in vivo* charakterisiert.

2.9 Post-translationale Modifikationen

Die Struktur und Funktion von Proteinen in zellulären Netzwerken wird nicht allein durch ihre genetisch festgelegte Primärstruktur bestimmt, sondern auch maßgeblich durch verschiedene chemische Modifikationen beeinflusst. Neben kotranslationalen Veränderungen der Proteinstruktur spielen dabei vor allem post-translationale Modifikationen (PTMs) eine wichtige Rolle. Hierbei werden Protein-Eigenschaften durch proteolytische Spaltung oder die kovalente Anlagerung funktioneller Gruppen an eine oder mehrere Aminosäuren beeinflusst (Mann und Jensen 2003). Die erzielten Effekte sind dabei ebenso vielfältig wie die vorkommenden PTMs selbst. So sind mehr als 200 Arten post-translationaler Modifikationen dokumentiert (Li et al. 2010). Zu den häufigsten und wichtigsten zählen Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glycosylierung, sowie Acylierung (Fettsäure-Modifikation) und Ubiquitinierung. Diese Protein-Modifikationen sind meist reversibel und regulieren den Aktivitätsstatus von Enzymen, die Stabilität oder subzelluläre Lokalisation von Proteinen sowie deren Interaktion mit anderen Proteinen oder Nukleinsäuren (Mann et al. 2003; Seo und Lee 2004). Dabei unterscheiden sich die einzelnen PTMs durch ihre Selektivität bezüglich des modifizierenden Aminosäure-Restes und der Position innerhalb des Proteins. Eine Zusammenfassung der häufigsten Modifikationen und ihrer Funktionen ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Auswahl kovalenter Protein-Modifikationen und deren Funktionen (verändert nach (Mann et al. 2003; Seo et al. 2004)).

Typ	modifizierter AS-Rest	Position	Einfluss auf
Acetylierung	S K	N-terminal überall	Protein-Stabilität Protein-Protein/DNA-Interaktion, Protein-Funktion
Phosphorylierung	Y, S, T, H, D	überall	Protein-Aktivität, Interaktionen Signalgebung
Methylierung	K, R	überall	Genexpression, Protein-Stabilität
Acylierung			
Farnesylierung	C	überall	Zelluläre Lokalisation,
Myristoylierung	G K	N-terminal überall	Membranverankerung, Protein-Protein-Interaktion
Palmitoylierung	C (S, T, K)	überall	
Glykosylierung			
O-linked	S, T	überall	Zell-Zell-Interaktion/ Signalgebung
N-linked	N		Sekretierte Proteine Regulatorische Funktionen
Ubiquitinierung	K	überall	Protein-Degradation
Sumoylierung	K	[L,FV]K.D	
Deaminierung	N, Q	überall	N→D, Q→E Protein-Interaktionen, aber auch häufig Artefakt

Die wohl prominenteste Protein-Modifikation stellt die Phosphorylierung dar, eine hoch-reversible Addition von Phosphatgruppen hauptsächlich an Serin-, Tyrosin-, Threonin- und

Histidin-Resten. Diese spielt bei der Aktivierung bzw. Inaktivierung von Enzym-Aktivitäten und der Regulation von Signalkaskaden innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle. Wie die meisten Protein-Modifikationen wird auch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von spezifischen Enzymen katalysiert, den Kinasen und Phosphatasen (Ubersax und Ferrell 2007 und). Im Allgemeinen findet man nur einen sehr geringen Anteil zellulärer Proteine im phosphorylierten Zustand vor ($>0,1\%$), obwohl diese Modifikation für eine Vielzahl an Proteinen beschrieben ist (Seo et al. 2004). Dies verdeutlicht die hohe Reversibilität der Reaktion, was für eine stringente Regulation der komplexen zellulären Netzwerke notwendig ist.

Eine insbesondere für die Regulation der Protein-Stabilität entscheidende Protein-Modifikation stellt die Ubiquitinierung dar. Dabei werden im Gegensatz zu den kleinemolekularen Modifikationen, wie Phosphorylierung und Acetylierung, größere funktionelle Gruppen, die selbst Proteincharakter besitzen, an Proteine angehängt (Schwartz und Hochstrasser 2003). Das hierfür verantwortliche System ist hochkomplex und besteht aus einer Vielzahl regulierender Enzyme, welche maßgeblich die Halbwertszeit zellulärer Proteine mitbestimmen. Je nach Art der Ubiquitin-Verknüpfung führt diese Modifikation zum proteasomalen oder lysosomalen Protein-Abbau, kann aber auch die zelluläre Lokalisation und Interaktionen von Proteinen beeinflussen (Polo et al. 2002). Während die Ubiquitinierung als Teil der proteasomalen Protein-Degradation gut charakterisiert ist, sind weitere Modifikationen dieser Klasse noch nicht komplett verstanden. So existiert eine Vielzahl Ubiquitin-verwandter Polypeptide, welche an Zielproteine angefügt werden und so verschiedene Signalwege regulieren (Seo et al. 2004). Beispielsweise wird der Modifikation durch das Protein SUMO, der sogenannten Sumoylierung, eine bedeutende Rolle für intrazelluläre Signal- und Transportprozesse sowie die Regulation der Genexpression zugeschrieben (Seeler und Dejean 2003). Die Tatsache, dass ein Ungleichgewicht dieser Modifikationen mit der Entstehung verschiedener Krankheiten assoziiert ist, unterstreicht deren Bedeutung für die Regulation zellulärer Prozesse (Schwartz et al. 2003).

Des Weiteren sind als regulatorisch bedeutende Modifikationen die Methylierung, Acylierung und Glycosylierung zu nennen. Durch Lipid-Modifikationen von Proteinen (Acylierung) werden dem Zielprotein hydrophobe Eigenschaften verliehen, was häufig im Zusammenhang mit Protein-Membran-Interaktionen, Protein-Transport oder Enzymaktivität steht (Seo et al. 2004). Eine vergleichbare Aufgabe erfüllt auch die Glycosylierung von Proteinen, wobei hier eine Kohlenhydratgruppe angefügt wird. Dieser Prozess findet meist im Endoplasmatischen Retikulum statt und reguliert zusammen mit Signalpeptiden den Transport des glycosylierten Proteins zur Zellmembran oder die Sekretion in den extrazellulären Matrixraum (Lai et al.). Das Anhängen einer Methylgruppe (Methylierung) erfolgt vor allem an Arginin- und Lysin-Reste und wird durch spezifische Methyltransferasen katalysiert. Die Bedeutung dieser

Modifikation ist vor allem im Bereich der Histonmodifikation und somit der epigenetischen Genregulation zu sehen (Paik et al. 2007).

2.9.1 Acetylierung und Deacetylierung

Eine der häufigsten Modifikationen von eukaryotischen Proteinen stellt die Acetylierung dar. Während die kotranslationale, N α -terminale Acetylierung bei etwa 85% aller Proteine zu finden ist, ist die post-translationale Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysin-Resten weitaus seltener, jedoch funktionell bedeutsamer (Glozak et al. 2005). Die Addition der Acetylgruppe an Lysin-Reste bewirkt über die Neutralisation positiver Ladungen an der Aminogruppe veränderte elektrostatische Eigenschaften des Gesamtproteins und hat somit zahlreiche Auswirkungen auf dessen Struktur und Funktion. Anfänglich wurde die Bedeutung der Acetylierung vor allem für Histone beschrieben (Allfrey et al. 1964). Da eine Acetylierung/Deacetylierung von Histon-Domänen die Chromatinstruktur maßgeblich beeinflusst, ist diese Modifikation hinsichtlich der epigenetischen Regulation der Genaktivität unabdingbar (Spange et al. 2009). Demnach wurden auch die für die Acetylierung verantwortlichen Enzyme zunächst als Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) bezeichnet. Bislang sind etwa 30 Proteine mit HAT-Aktivität bekannt, die unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen (Glozak et al. 2005). Neben Histon-Proteinen werden jedoch zunehmend alternative Substrate als Ziel der Acetylierung beschrieben (vgl. Abschnitt 2.9.2), so dass diese Enzyme auch als Lysin-Acetyl-Transferasen (KAT) bezeichnet werden (Yang und Seto 2008). Im Folgenden wird die Bezeichnung HAT verwendet, da es aktuell noch immer die vorherrschende Bezeichnung in der Literatur ist.

Die Gruppe der HATs umfasst zahlreiche Vertreter, welche einerseits sehr divers in Struktur und Funktion sind, andererseits jedoch evolutionär hoch konservierte Proteine darstellen (Yang 2004; Kimura et al. 2005). Dabei ist die Klassifizierung dieser Gruppe nicht eindeutig. Es werden zwei allgemeine HAT-Klassen unterschieden, die Typ A- und Typ B-HATs. Die Typ A-Acetyltransferasen werden in fünf Untergruppen eingeordnet: GNAT (*GCN5-related N-acetyltransferases*), MYST (*MOZ*, *Ybf2*, *Sas2*, und *Tip60*), p300/CBP, basale Transkriptionsfaktoren sowie nukleäre Rezeptor-Kofaktoren (SRC) (Spange et al. 2009). Die zytoplasmatischen TypB-Transferasen acetylieren vor allem freie Histone und steuern damit ihre nukleäre Translokation (Allis et al. 1985). Die Acetylierung von Lysin-Resten erfolgt durch die spezifischen HATs nicht zufällig, sondern folgt zumindest bei nukleären Proteinen einem charakteristischen Motiv (GKxxP) (Spange et al. 2009). Zytoplasmatische Proteine hingegen weisen bezüglich der HAT-abhängigen Acetylierung kein spezielles Sequenzmuster auf.

Viele HATs beinhalten eine evolutionär konservierte Proteindomäne, die sogenannte Bromodomäne, welche spezifisch acetylierte Lysin-Reste in Proteinen erkennt (Yang 2004). So können beispielsweise Chromatin-assoziierte Proteine zu acetylierten Histonen dirigiert werden.

Zu den am besten charakterisierten HATs zählen p300 und CBP (*CREB-binding Protein*), welche beide eine Bromodomäne besitzen und häufig in den gleichen Protein-Komplexen gefunden werden (Spange et al. 2009). Die GNAT-Familie umfasst die HATs GCN5 (*General control of amino acid synthesis protein 5-like*) und pCAF (*p300/CBP associated factor*), die vor allem bei der Transkriptions-Initiation eine wichtige Rolle spielen (Spange et al. 2009).

Neben den erwähnten Acetyltransferase-Gruppen existieren noch weitere Enzyme mit vergleichbarer katalytischer Aktivität. Diese können jedoch aufgrund ihrer Heterogenität keiner der genannten Klassen zugeordnet werden.

Im Gegensatz zur N α -terminalen Acetylierung ist die Acetylierung von ϵ -Aminogruppen ein hochreversibler Prozess. Die Deacetylierung wird hierbei von Histon-Deacetylasen (HDACs) katalysiert, was zeitnah zur Entdeckung der Histon-Acetylierung bereits in den 1960er Jahren erstmalig beschrieben wurde (Inoue und Fujimoto 1969). Anhand ihrer phylogenetischen Übereinstimmung können HDACs in vier Klassen eingeordnet werden (Gregoretta et al. 2004). Während die Mitglieder der Klassen I, II und IV zu den klassischen HDACs gerechnet werden, umfasst Klasse III die sogenannten Sirtuine (SIRTs), homologe Proteine zu Sir2 aus der Hefe. Eine Zusammenfassung der HDAC-Klassen, ihrer jeweiligen Mitglieder und Eigenschaften ist Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Tabelle 2.4: Übersicht der Klassifizierung und Eigenschaften der humanen HDAC
(verändert nach(Kim et al. 2006))

	Klasse I	Klasse IIa	Klasse IIb	Klasse III	Klasse IV
Mitglieder	HDAC 1/2/3/8	HDAC 4/5/7/9	HDAC 6/10	SIRT 1-7	HDAC 11
Ortholog (Hefe)	Rpd3	Hda1	Hda1	Sir2	Rpd3, Hda1
Vorkommen	ubiquitär	Gehirn, Herz, glatte Muskulatur	Testis, Leber, Niere	ubiquitär	Gehirn, Testis
Lokalisation	nukleär	nukleär/ zytoplasmatisch	meist zytoplasmatisch	nukleär/ zytopl., auch mitochondrial	nukleär
Substrate (Bsp.)	Histone, p53, NF κ B	Histone	Histone, Tubulin, HSP	Histone, p53, TAF, Tubulin	Histone

(HSP: Hitzeschockprotein; TAF: TBP-assoziiertes Faktor)

Sirtuine unterscheiden sich bezüglich ihres katalytischen Mechanismus entscheidend von den klassischen HDACs. Während Deacetylasen der Klassen I, II und IV ein Zn^{+} -Ion als Nukleophil zur Hydrolyse der Amidbindung nutzen, übertragen Sirtuine die Acetylgruppe auf das Co-Substrat NAD^{+} (Denu 2005). Dadurch hängt die SIRT-vermittelte Deacetylierung direkt vom $NAD^{+}/NADH$ -Verhältnis und somit dem metabolischen Status der Zelle ab (Spange et al. 2009).

Innerhalb der Klasse I zeigen phylogenetische Studien eine besonders starke Ähnlichkeit von HDAC1 und HDAC2 (Brunmeir et al. 2009). Es wird vermutet, dass beide Gene über ein relativ neues Duplikationsereignis eines gemeinsamen Vorläufers-Gens in Vertebraten entstanden sind. Betrachtet man zudem die hohe Sequenzidentität zwischen HDAC1 und 2 (82% globale AS-Identität bei humanem HDAC1/2), deutet vieles auf funktionelle Überlagerungen hin (Segre und Chiocca 2011). Diese Hypothese wird durch Untersuchungen der HDAC1/2-Aktivität gestützt, einige *knockout*-Studien zeigen jedoch auch individuelle, nicht-redundante Funktionen beider Enzyme (Brunmeir et al. 2009). So resultiert einerseits aus der Depletion von HDAC1 oder HDAC2 in Krebszelllinien eine kompensatorische Hochregulation des jeweils anderen Enzyms (Segre et al. 2011). Andererseits ist ein HDAC1-*knockout* in Mäusen bereits in der frühen Embryogenese letal, während HDAC2-*knockout*-Mäuse bis zur perinatalen Periode überleben (Lagger et al. 2002; Montgomery et al. 2007). HDAC1 und HDAC2 zeigen beide die für Klasse I HDACs charakteristische Struktur mit spezifischen funktionellen Domänen (siehe Abb. 2.5). Dabei bilden etwa die ersten 50 N-terminalen Aminosäuren die sogenannte HDAC-assoziierte Domäne, welche essentiell an der Homo- und Heterodimerisierung von HDAC1 und 2 beteiligt ist (Brunmeir et al. 2009). Die Dimerisierungsregion überlappt teilweise mit der katalytischen HDAC-Domäne, die sich etwa über 300 Aminosäuren erstreckt. Im Bereich des C-Terminus, in dem beide Enzyme die geringsten Übereinstimmungen aufweisen, befinden sich verschiedene Motive, die spezifische Protein-Interaktionen und -Modifikationen vermitteln. Eine Deletion des C-Terminus führt zu verminderter HDAC-Aktivität, was für eine wichtige Rolle dieser Domäne bei der Regulation der Enzymfunktion spricht (Segre et al. 2011).

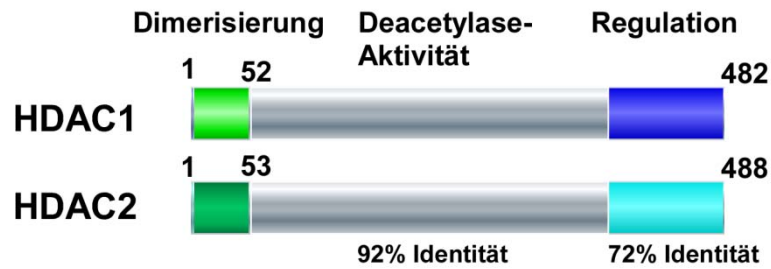


Abbildung 2.5: schematische Domänenorganisation von HDAC1 und HDAC2 (verändert nach (Segre et al. 2011)).

2.9.2 Acetylierung und Deacetylierung von Nicht-Histon-Proteinen

Sowohl HATs als auch HDACs besitzen ein hohes Maß an Substratspezifität und sind in der Lage neben Histonen zusätzlich eine Reihe von Nicht-Histon-Proteinen zu modifizieren. Dabei sind vor allem die Klasse I-HDACs hervorzuheben, da sie durch Substrate wie p53 und NFκB maßgeblich an der Regulation wichtiger Signalkaskaden beteiligt sind (Glozak et al. 2005).

Das Tumorsuppressor-Protein p53 wurde als erstes Nicht-Histon-Substrat beschrieben, welches durch HATs bzw. HDACs acetyliert und deacetyliert wird (Gu und Roeder 1997). Mehrere Lysin-Reste in der C-terminalen DNA-Bindedomäne von p53 werden durch p300/CBP acetyliert, wodurch es zur Aktivierung der p53-DNA-Bindung kommt. So wird durch Acetylierung von p53 die Expression der spezifischen Zielgene erhöht. Die p300/CBP-Aktivität scheint dabei essentiell für die p53-abhängige Genfunktion zu sein (Luo et al. 2004). Zudem wurde eine Interaktion mit HDAC1 und eine daraus resultierende Deacetylierung von p53 nachgewiesen (Luo et al. 2000). Im komplexen Netzwerk der p53-Regulation spielt des Weiteren die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 eine wichtige Rolle, da diese die Deacetylierung von p53 durch Rekrutierung eines HDAC1-Komplexes fördert (Ito et al. 2002). Die deacetylierten Lysine werden daraufhin direkt durch MDM2 ubiquitiniert, was den proteasomalen Abbau von p53 zur Folge hat. Das Beispiel von p53 verdeutlicht, wie das komplexe Zusammenspiel verschiedener post-translationaler Modifikationen die Aktivität und Stabilität von Proteinen beeinflussen kann.

Es wurden noch eine Reihe weiterer Nicht-Histon-Proteine als durch HATs/HDACs modifiziert beschrieben. Darunter befinden sich Transkriptionsfaktoren wie YY1, Stat3 und c-MYC sowie nukleäre Rezeptoren (Androgen- und Östrogen-Rezeptor), E2F/Rb und NFκB. Auch werden weitere zelluläre Proteine unterschiedlichster Funktion, beispielsweise α-Tubulin, Importin-α, Ku70 und das Hitzeschockprotein Hsp90, auf diese Weise modifiziert (Glozak et al. 2005). Zusammenfassend stellt die Acetylierung eine der häufigsten kovalenten Modifikationen in eukaryotischen Zellen dar. Bezüglich ihrer Bedeutsamkeit für

die Regulation zellulärer Prozesse ist die Acetylierung der Phosphorylierung gleichzusetzen (Kouzarides 2000). Dabei scheint die Acetylierung ein weitaus breiteres Substratspektrum zu zeigeb. Es sind bereits hunderte acetylierte Proteine bekannt, wobei der Effekt dieser Modifikation auf Proteinstruktur und -funktion beträchtlich sein kann. Veränderte elektrostatische Eigenschaften und die Vergrößerung der Aminosäure-Seitenkette können die Ausbildung von Sekundärstrukturen und somit die gesamte Proteinstruktur beeinflussen. Verschiedene Modifikationen konkurrieren zudem um gleiche Lysin-Reste und können sich gegenseitig ausschließen (Spange et al. 2009). So werden multiple zelluläre Prozesse, angefangen von der Genexpression über die Proteinaktivität, -stabilität und Lokalisation bis hin zur veränderten Wechselwirkung mit anderen Proteinen durch den Acetylierungs-Status von Proteinen gesteuert (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Auswahl acetylierter Nicht-Histon-Proteine und biologische Auswirkungen der Modifikation (verändert nach (Glozak et al. 2005; Spange et al. 2009))

Biologische Auswirkung auf	Beispiele	
Protein-Stabilität	Gesteigerte Stabilität p53, p73, Smad7, c-Myc	Verminderte Stabilität GATA1, HIF-1 α , pRb
DNA-Bindung	Gesteigerte Bindung p53, SRY, STAT3, GATA-TF, E2F1, NF κ B	Verminderte Bindung YY1, HMG-A1, HMG-N2
Genexpression	Aktiviert p53, HMG-A1, STAT3, GATA-TF, NF κ B	Inaktiviert HIF-1 α , STAT1, FOXO1
Protein-Interaktion	Verstärkt STAT3, AR, Importin A, STAT1, TFIIB, α -Tubulin	Vermindert p65 (RelA), Ku70, Hsp90
Lokalisation	Ac \rightarrow nukleär PCAF, SRY, PCNA, CtBP2	Ac \rightarrow Zytosol c-Abl, p300, PAP
mRNA-Stabilität	Erhöht p21, Brm	Vermindert Tyrosinhydrolase, eNOS
Enzymatische Aktivität	Erhöht p300, ATM	Vermindert PTEN, HDAC1, Mdm2

2.10 Zielsetzung der Arbeit

Proteasen stellen wichtige Regulatoren für alle essentiellen Lebensprozesse dar. Neben ihrer anfänglich beschriebenen Rolle als unspezifisch degradative Enzyme werden mit ihrer zunehmenden Erforschung ihre vielseitigen Aufgaben aufgedeckt. So spielen sie nicht nur für den Protein-Abbau eine wichtige Rolle, sondern übernehmen verschiedene Funktionen innerhalb regulatorischer Netzwerke der Zelle. Folglich können Störungen dieser proteolytischen Signalwege zur Entstehung von Krankheiten beitragen. Deregulierte Proteasen stellen somit ein interessantes therapeutisches Ziel für den Einsatz spezifischer Inhibitoren dar. Bei der evolutionär konservierten Threonin Aspartase1 (Taspase1) handelt es sich um eine Protease mit onkologischer Relevanz, welche sowohl in zahlreichen Leukämien als auch in soliden Tumoren überexprimiert wird. Trotz ihrer Charakterisierung als Tumor-relevante Protease sind die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen noch weitestgehend unverstanden, und es existieren bislang keine effizienten Inhibitoren der Taspase1-Aktivität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb mögliche Strategien zur Hemmung der onkogenen Aktivität von Taspase1 evaluiert. Dabei wurden sowohl eine potentielle Transdominanz inaktiver Taspase1-Mutanten als auch die Möglichkeit einer chemischen Inhibition untersucht. Die Aufklärung der genauen Wirkmechanismen der Taspase1 sollte zudem durch die Untersuchung ihrer evolutionären Entwicklung ermöglicht werden. Dazu wurden Taspase1-Orthologe aus dem Menschen und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bezüglich ihrer Struktur und Funktion analysiert und verglichen. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Konservierung bzw. Divergenz verschiedener Taspase1-Homologer soll Aufschluss über allgemeine Wirkungsmechanismen der Protease geben.

Neben evolutionären Studien wurde in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit eine mögliche post-translationalen Acetylierung der Taspase1 untersucht. Hierzu wurden verschiedene Expressions- und Deletionsstudien durchgeführt, um die HAT/HDAC-gesteuerte Modifikationen und deren funktionelle Auswirkungen detailliert zu charakterisieren. Zudem wurde mittels Massenspektrometrie die Existenz modifizierter Lysinreste von Taspase1 überprüft. Anschließend sollte die Relevanz dieser Modifikation für die Spaltungsaktivität der Taspase1 analysiert werden. Diese Untersuchungen stellen einen weiteren wichtigen Schritt zum allgemeinen Verständnis der Taspase1-Aktivität und ihrer Regulationsmechanismen dar.

3. Ergebnisse

3.1 Strategien zur Inhibition der onkogenen Taspase1-Aktivität

Chemico-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of Threonin-Aspartase-1

Désirée Wunsch, Verena Fetz, Dominik Heider, Stefan Tenzer, Carolin Bier, Lena Kunst, Shirley Knauer, and Roland Stauber. Blood Cancer Journal 2012, 2, e77; doi:10.1038/bcj.2012.22.

Zusammenfassung

Wie einleitend erwähnt handelt es sich bei der Taspase1 um eine onkologisch relevante Protease, die sowohl an der Entstehung verschiedener Leukämieformen als auch an der Onkogenese solider Tumoren beteiligt ist. Da die genetische Deletion der Taspase1 in der adulten Maus zu keinen offensichtlichen Defekten führt (Hsieh et al. 2003a), wurde die Inhibition der Taspase1-Aktivität als neuartige Strategie für die Krebstherapie vorgeschlagen. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnten bislang jedoch keine effizienten Taspase1-Inhibitoren identifiziert werden. Die Entwicklung und Evaluierung verschiedener Inhibitionsstrategien ist daher für Forschung und Klinik weiterhin von großem Interesse. Eine spezifische Hemmung der proteolytischen Aktivität von Taspase1 würde zudem einen entscheidenden Beitrag zur Bewertung der klinischen und therapeutischen Relevanz liefern.

Unsere Ansätze zur Entwicklung verschiedener Taspase1-Inhibitionsstrategien umfassen dabei zum einen die Hemmung der Taspase1 mit Hilfe inaktiver, *trans*-dominanter Protease-Mutanten (genetische Inhibition, Abb. 3.1 Mitte), sowie andererseits die Charakterisierung eines potentiellen Taspase1-Inhibitors (chemische Inhibition, Abb. 3.1 rechts).

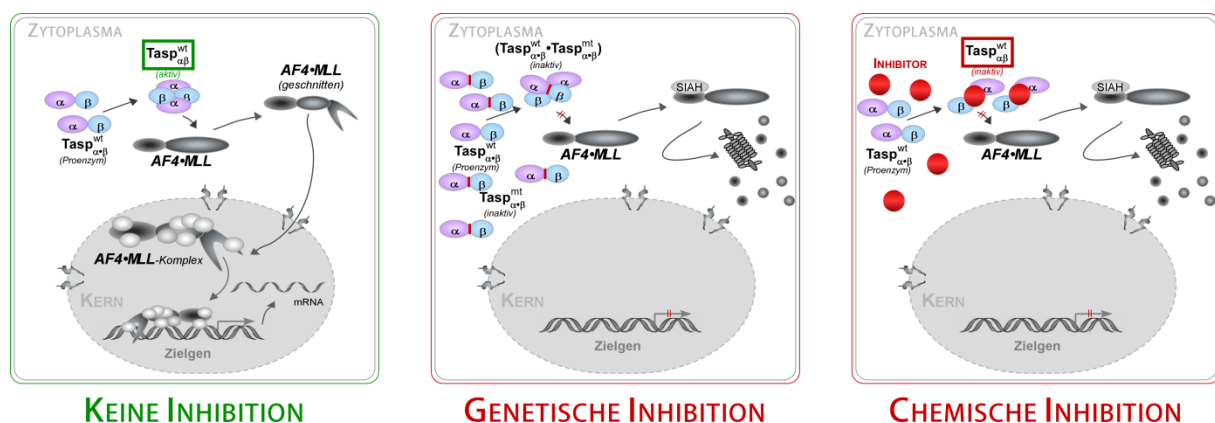


Abbildung 3.1: Inhibitionsstrategien zur Hemmung der onkogenen Aktivität von Taspase1.

Die Autoproteolyse des Taspase1 Proenzym führt zur Bildung des aktiven Heterodimers, welches durch die Prozessierung von MLL-Fusionsproteinen (hier: AF4-MLL) in der Lage ist onkogene Programme zu aktivieren (links). Eine genetische Inhibition mittels Überexpression *trans*-dominanter inaktiver Taspase1-Varianten führt zur Bildung inaktiver Heterodimere, welche sowohl eine

Prozessierung des AF4-MLL-Substrates als auch eine Aktivierung onkogener Prozesse verhindern (Mitte). Der Einsatz chemischer Inhibitoren, welche direkt die katalytische Aktivität der Protease hemmen, stellt eine weitere Strategie zur Hemmung der onkogenen Aktivität der Taspase1 dar (rechts).

Ausgehend von der Annahme, dass es nach autokatalytischer Spaltung des Taspase1-Proenzym zur Formation des aktiven Enzyms durch Heterodimer-Bildung ($\alpha\beta\alpha$ -Heterotetramer) kommt, eröffnet dies die Möglichkeit zur Inhibition durch die Expression inaktiver Taspase1-Varianten. Gemäß unserer Hypothese kommt es dabei zur Komplexierung von wildtypischen und inaktiven Taspase1-Dimeren, was eine vollständige Inhibition des Komplexes zur Folge hat. Mit Hilfe unseres etablierten Testsystems zur Bestimmung der Taspase1-Aktivität in lebenden Zellen (vgl. Abschnitt 2.7) konnten wir zeigen, dass die Expression der inaktiven TaspT234V-, sowie TaspD233A-Mutante keine Hemmung der Taspase1-Aktivität bewirkt (Bier et al. 2011b; Bier et al. 2012a). Sowohl der Biosensor-Assay als auch Western-Blot-Analysen verdeutlichten, dass selbst ein 9-facher Überschuss an inaktiver Taspase1 gegenüber dem wildtypischen Enzym keinen Einfluss auf die Prozessierung des Biosensors nehmen konnte. Diese Ergebnisse deuten erstmalig darauf hin, dass die Taspase1 *in vivo* bereits als $\alpha\beta$ -Monomer ihre volle proteolytische Aktivität erlangt und dazu nicht, wie bislang angenommen, die Ausbildung eines $\alpha\beta\alpha$ -Heterotetramers nötig ist. In einer ergänzenden Studie konnten wir zeigen, dass in lebenden Zellen tatsächlich ein aktives $\alpha\beta$ -Monomer die vorherrschende Konformation der Taspase1 darstellt und eine verstärkte Dimerisierung im Gegenteil sogar eine Hemmung der Taspase1-Aktivität zur Folge haben kann (Bier et al. 2012b). Dies lieferte nicht nur eine Erklärung für das Fehlen einer Transdominanz inaktiver Mutanten, sondern eröffnet zudem die Möglichkeit zur Entwicklung einer weiteren Inhibitionsstrategie über den Einsatz „chemischer *Dimerizer*“, die eine vermehrte Taspase1-Dimerisierung und somit Hemmung des Enzyms bewirken.

Neben diesen „genetischen“ Ansätzen stellt die Identifizierung eines chemischen Hemmstoffs eine weitere vielversprechende Strategie zur Hemmung der Taspase1-Aktivität dar. Trotz einzelner Studien, die sich mit der Suche nach einem geeigneten Taspase1-Inhibitor beschäftigten, ist es bislang nicht gelungen, einen effizienten und gleichsam spezifischen Hemmstoff zu charakterisieren. Die als Taspase1-Inhibitor beschriebene 4-[(4-*arsonophenyl*)methyl]phenyl-Arsonsäure (NSC48300) konnte mit Hilfe unseres *in vivo*-Assays als therapeutisch relevanter Kandidat ausgeschlossen werden. Der beobachtete inhibitorische Effekt dieser Substanz auf das Wachstum von Brust- und Hirntumoren im

Mausmodell ist womöglich nicht primär auf eine Taspase1-Hemmung, sondern vielmehr auf eine anti-angiogene und anti-migratorische Wirkung zurückzuführen.

Zusammenfassend erscheint es als unwahrscheinlich, eine Hemmung der Taspase1-Aktivität durch ein Eingreifen in dessen Heterokomplex-Formation zu erreichen. Vielmehr sollten sich zukünftige experimentelle sowie *in silico* Ansätze auf die Identifizierung eines spezifischen chemischen Inhibitors, beispielsweise mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screening-Methoden konzentrieren.

Für detaillierte Ausführungen sind entsprechende Veröffentlichungen an die Arbeit angehängt. Eine Übersicht der bis heute gewonnenen Erkenntnisse zur Biologie der Taspase1 mit einem Fokus auf ihre onkologische Relevanz liefert zudem ein im Rahmen dieser Arbeit angefertigter *Review*-Artikel.

Overexpression of the Catalytically Impaired Taspase1^{T234V} or Taspase1^{D233A} Variants Does Not Have a Dominant Negative Effect in T(4;11) Leukemia Cells

Carolin Bier^{1*}, Rouven Hecht², Lena Kunst², Sabine Scheiding³, Désirée Wünsch¹, Dorothee Goesswein¹, Günter Schneider⁴, Oliver H. Krämer³, Shirley K. Knauer^{2*}, Roland H. Stauber^{1*}

1 Molecular and Cellular Oncology, Mainz Screening Center (MSC), University Hospital of Mainz, Mainz, Germany, **2** Institute for Molecular Biology, Center for Medical Biotechnology (ZMB), University Duisburg-Essen, Essen, Germany, **3** Institute for Biochemistry and Biophysics/Centre for Molecular Biomedicine (CMB), Friedrich-Schiller-University Jena, Jena, Germany, **4** Department of Internal Medicine II, Technical University of Munich, Munich, Germany

Abstract

Background: The chromosomal translocation t(4;11)(q21;q23) is associated with high-risk acute lymphoblastic leukemia of infants. The resulting AF4•MLL oncoprotein becomes activated by Taspase1 hydrolysis and is considered to promote oncogenic transcriptional activation. Hence, Taspase1's proteolytic activity is a critical step in AF4•MLL pathophysiology. The Taspase1 proenzyme is autoproteolytically processed in its subunits and is assumed to assemble into an $\alpha\beta\beta$ -heterodimer, the active protease. Therefore, we investigated here whether overexpression of catalytically inactive Taspase1 variants are able to interfere with the proteolytic activity of the wild type enzyme in AF4•MLL model systems.

Methodology/Findings: The consequences of overexpressing the catalytically dead Taspase1 mutant, Taspase1^{T234V}, or the highly attenuated variant, Taspase1^{D233A}, on Taspase1's processing of AF4•MLL and of other Taspase1 targets was analyzed in living cancer cells employing an optimized cell-based assay. Notably, even a nine-fold overexpression of the respective Taspase1 mutants neither inhibited Taspase1's *cis*- nor *trans*-cleavage activity *in vivo*. Likewise, enforced expression of the α - or β -subunits showed no *trans*-dominant effect against the ectopically or endogenously expressed enzyme. Notably, co-expression of the individual α - and β -subunits did not result in their assembly into an enzymatically active protease complex. Probing Taspase1 multimerization in living cells by a translocation-based protein interaction assay as well as by biochemical methods indicated that the inactive Taspase1 failed to assemble into stable heterocomplexes with the wild type enzyme.

Conclusions: Collectively, our results demonstrate that inefficient heterodimerization appears to be the mechanism by which inactive Taspase1 variants fail to inhibit wild type Taspase1's activity in *trans*. Our work favours strategies targeting Taspase1's catalytic activity rather than attempts to block the formation of active Taspase1 dimers to interfere with the pathobiological function of AF4•MLL.

Citation: Bier C, Hecht R, Kunst L, Scheiding S, Wünsch D, et al. (2012) Overexpression of the Catalytically Impaired Taspase1^{T234V} or Taspase1^{D233A} Variants Does Not Have a Dominant Negative Effect in T(4;11) Leukemia Cells. PLoS ONE 7(5): e34142. doi:10.1371/journal.pone.0034142

Editor: Matthew Bogyo, Stanford University, United States of America

Received: October 14, 2011; **Accepted:** February 22, 2012; **Published:** May 3, 2012

Copyright: © 2012 Bier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Grant support: German Cancer Aid (FKZ102362), Head and Neck Cancer Foundation (CB), donation by R. Patzke, Rheinland-Pfalz für Innovationen, Mainz Screening Center, DFG KN973/1-1 and DFG INST371/5-1FUGG, and the Inneruniversity Funds and MAIFOR Mainz Support Program (RS and SK). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bier@uni-mainz.de (CB); shirley.knauer@uni-due.de (SK); rstauber@uni-mainz.de (RS)

Introduction

Chromosomal rearrangements of the mixed lineage leukemia (*MLL*) gene with numerous partner genes are frequently found in acute myeloid (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) [1,2]. Fused on chromosome4 (AF4) is the most common translocation partner in MLL-mediated leukemia, resulting in the expression of the AF4•MLL and MLL•AF4 fusion proteins. Although the pathomechanism of t(4;11)-mediated leukemia is still discussed controversially, expression of the AF4•MLL fusion enhanced the hematopoietic repopulating potential of CD34⁺ cells, and led to the development of predominantly proB ALL in a mouse model [2,3]. Similar to the prototypic MLL protein, the AF4•MLL fusion protein contains cleavage-sites for Threonine

Aspartase 1 (Taspase1, Tasp) and, is considered a bona fide substrate for this protease [4,5,6,7,8].

In leukemic cells, the unprocessed AF4•MLL fusion protein is a substrate for the E3-ubiquitin ligases SIAH1 and SIAH2 [9,10]. SIAH1 and SIAH2, belonging to the family of the seven in absentia homolog (SIAH), are E3 ligases involved in ubiquitination and proteasome-mediated degradation of specific proteins [9,10]. Therefore the presence of these ligases leads to a low steady-state level of the AF4•MLL fusion, hampering its detection and experimental analysis. However, following its proteolytic processing by Taspase1, the AF4•MLL cleavage products AF4•MLL.N and MLL.C heterodimerize through their FYRN and FYRC interaction domains, forming a high molecular-weight protein

complex resistant to SIAH-mediated degradation [9,10]. Thus, chemico-genetic interference with Taspase1's activity is expected to promote AF4•MLL degradation, thereby precluding the activation of oncogenic programs and disease development. Moreover, a total of at least 64 MLL chromosomal-fusion partners have been characterized so far at the molecular level, associated with disease (**Table S1**) [1,11,12]. Hence, Taspase1's proteolytic processing of MLL fusions in general may contribute to various pathologies.

The human Taspase1 gene encodes a protein of 420 amino acids (aa) and is able to cleave other substrates *in trans* by recognizing a conserved peptide motif ($Q^3[F,LLV]^2D^1 \downarrow G^{1'}x^{2'}D^3D^4'$) with an aspartate at the P1 position [6,7]. The discovery of Taspase1 founded a new class of endopeptidases that utilize the N-terminal threonine of its mature β -subunit as the active site, which is generated by autoproteolysis of the proenzyme (*cis*-cleavage) [6]. Mutation of the catalytic nucleophile, Thr²³⁴, completely abolishes Taspase1's catalytic activity [6,13]. Based on data mainly derived from analyzing bacterially expressed Taspase1, it is assumed that the proenzyme assembles into an asymmetric $\alpha\beta\beta\alpha$ -heterodimer following autoproteolysis, representing the active protease [6,13].

Protein-protein interactions (PPIs) in general are key players for multiple (patho)biological cellular processes [14]. Thus, interfering with disease-relevant interactomes *via* enforced expression of dominant-negative mutants and/or small molecules has emerged as a promising, though challenging strategy for human therapeutics [15,16]. Blocking the p53-mdm2 interaction with synthetic molecules had been shown to induce p53 activation and thereof tumor cell death [17]. Likewise, the peptide-mediated disruption of the AF4–AF9 protein complex, or targeting the oligomerization domain of RUNX1/ETO interfered with the activity of the fusion proteins in leukemic cells [18,19]. Recently, we also showed that it is in principle possible to specifically inhibit and to destroy the AF4•MLL oncoprotein by genetic PPIs inhibitors [9].

Consequently, as currently no effective synthetic Taspase1 inhibitors are available, we here investigated whether selectively interfering with the formation of the proposed active Taspase1 $\alpha\beta\beta\alpha$ -heterodimer would block processing of the AF4•MLL fusion and thus, may prevent leukemogenesis [20,21]. Studies investigating the biological consequences of overexpressing inactive Taspase1 variants have not been performed before. Hence we here developed and employed novel cell-based assays allowing to functionally monitor the effects of overexpressing catalytically inactive or attenuated Taspase1 mutants on Taspase1's processing of AF4•MLL in living cancer cells in real time. To our knowledge, this is the first comprehensive study addressing Taspase1 multimerization and genetic interference thereof *in vivo*.

Materials and Methods

Antibodies (Ab), Reagents and Compounds

Ab used: anti-(α)-GapDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, sc-47724; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany); α -GFP (green fluorescent protein, sc-8334; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany); α -GST (glutathione S-transferase, sc-57753; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany); α -NPM1 (nucleophosmin, #3542 Cell Signaling); α -Tasp_C (directed against the C-terminus of Taspase1, AP1330b BioCat GmbH, Heidelberg, Germany); α -Tasp_N (directed against the N-terminus of Taspase1, sc-85945; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) were used.

Plasmids

AF4•MLL, transcription factor IIA (TFIIA) and upstream stimulatory factor2 (USF2) indicator protein expression plasmids were derived from pNLS-GFP/GST-CS3-RevNES (pCasp3-Clev), encoding a fusion composed of the SV40 large T-antigen nuclear localization signal (NLS), GST, GFP, the Caspase3 cleavage site (CS3), and a strong nuclear export signal (NES) of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein. [7,22] In p_NLS-GFP/GST-AF4•MLL_S1/2-NES_{Rev} (pA•M_S1/2), p_NLS-GFP/GST-AF4•MLL_S1-NES_{Rev} (pA•M_S1) and p_NLS-GFP/GST-AF4•MLL_S2-NES_{Rev} (pA•M_S2), CS3 was replaced by the Taspase1 cleavage site from AF4•MLL (S1/2 – both cleavage sites aa 1582–1710; S1 – first cleavage site: ¹⁶⁰⁰AEGQVDGADD¹⁶⁰⁹; S2 – second cleavage site: ¹⁶⁵²KISQLDGVDD¹⁶⁶¹), as well as by a GSGS linker following the cleavage site. To determine the linker sequences allowing optimal processing by Taspase1, plasmids containing the sequences ¹⁶⁵⁵QLDGVDD¹⁶⁶¹, GSGS¹⁶⁵⁵QLDGVDD¹⁶⁶¹ or ¹⁶⁵²KISQLDGVDD¹⁶⁶¹G were established likewise. pA•M_S1_{mut} and pA•M_S2_{mut} encode fusions containing mutated Taspase1 cleavage sites, in which P1 and P1' were exchanged by alanin (S1_{mut}: ¹⁶⁰⁰AEGQVAAADD¹⁶⁰⁹ and S2_{mut}: ¹⁶⁵²KISQLAAVDD¹⁶⁶¹), precluding their processing by Taspase1. pTFIIA_S, pUSF2_S, pTFIIA-GFP and pUSF2-GFP were described. [7] Besides the plasmids expressing green fluorescent protein fusions, we also constructed versions in which GFP was replaced by the red-fluorescent protein mCherry or RFP allowing performing dual- or triple-color *in vivo* assays.

Expression constructs encoding untagged Taspase1, Taspase1 fusion with autofluorescent proteins, including the red-fluorescent protein mCherry, a cytoplasmatic version of GFP-tagged Taspase1 (pTasp_{cyt}), and NPM1 as untagged or fusions with autofluorescent proteins were described. [7,23] Expression constructs encoding Taspase1 as a fusion with the small HA-tag was generated as described. [9,24] The Taspase1 expression plasmid was used as template to amplify the Taspase1 α - and β -subunits. Cloning of the subunits into expression vectors pc3-GFP and pc3-BFP using BamHI/NheI-restriction sites, respectively, allowed the expression of Taspase1 subunits as fusions with green and blue fluorescent proteins as described. [25] A cytoplasmatic version of a GFP-tagged Taspase1 β -subunit is encoded by pTasp- β _{cyt}, which was described. [20] Plasmids pTasp^{T234V}- and pTasp^{D233A}-GFP/-mCherry/-BFP or their untagged versions were generated by splice overlap extension PCR as reported. [7] pRevM10BL-RFP was generated by replacing BFP by RFP in RevM10BL-BFP using NheI- and EcoRI-restriction sites. pF143 encoding GFP, F145 encoding BFP and pBluescript (BSK) were described. [23,26] Bacterial expression plasmids pGEX_GST-Tasp-GFP and pGEX_GST-GFP were described. [20] A detailed overview of plasmids and oligonucleotides used for PCR amplification and cloning can be found in **Table S2** and **S3**.

Cells, Transfection and Microscopy

Leukemic and solid cancer cell lines used in the study were maintained and transfected as described [9,23]. Observation and image analysis of living or fixed cells were performed as described [7,27]. To determine the average intracellular protein localization, at least 200 fluorescent cells from three separate images were examined in three independent experiments, and representative images are shown. The number of cells exhibiting cytoplasmic (C; cytoplasmic signal >80% of the total cellular signal), cytoplasmic and nuclear (C/N), or nuclear (N; nuclear signal >80% of the total cellular signal) fluorescence was counted. As standards for this semiquantitative determination, the total cellular BFP (blue), GFP

(green) or mCherry/RFP (red) signal was quantitated by calculating the integrated pixel intensity in the imaged cell multiplied by the area of the cell in 100 fluorescent cells using a digital AxioCam CCD camera (Carl Zeiss, Jena, Germany) as described [7,27]. The nuclear signal was similarly obtained by measuring the pixel intensity in the respective nuclei. Nuclei were marked by Hoechst 33258 staining as described [20,27].

Criteria for efficient *in vivo* protein interaction using the protein interaction assay was that in >80% of 200 mCherry- and GFP-positive cells, mCherry and GFP co-localized at the nucleolus. Colocalization was further quantitated by confocal laser scanning microscopy using the “Overlap coefficient according to Manders” co-localization algorithm as described [24,27]. Colocalization coefficients represent “Overlap coefficient according to Manders” [9,24,27]. $R = \frac{\sum_i S_{1i} S_{2i}}{\sqrt{\sum_i (S_{1i})^2 (S_{2i})^2}}$ R represents the calculated overlap coefficient, S_1 and S_2 the measured signal in the two channels, and i a specific pixel of the taken image. Therefore, the calculated R value indicates an overlap of the signals and thus represents the true degree of colocalization. Other presented coefficients resembling Pearson’s correlation coefficient R_p . Overlap coefficients k_1 and k_2 and colocalization coefficients m_1 and m_2 were described [27,28].

Protein Extraction and Immunoblot Analysis

Preparation of whole lysates from cells and immunoblotting were carried out as described [23]. Equal loading of lysates was controlled by reprobing blots for GapDH as described [7].

Gel Filtration Chromatography

MV4;11 cells were harvested by centrifugation at 350°g, 4°C, 5°min, washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed by the addition of NETN buffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 8; 10% Glycerol; 1 mM EDTA; 0.5% v/v NP40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 fold Complete Protease Inhibitor – Roche, Germany) as described in [7]. After sonication lysates were centrifuged (14,000 rpm, 4°C, 30 min) and supernatant filtered (micro-centrifuge-filtered tubes 0.2 µm – Laborservice Onken GmbH) prior to gel filtration chromatography. The extracts were fractionated using size exclusion chromatography with Superose-6 10/300 GL columns (GE Healthcare FPLC system, optimal separation range from 3 MDa to 5 kDa). For system calibration purified aprotinin (6.5 kDa), ribonuclease A (13.7 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and ovalbumin (44 kDa) were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Munich, Germany) and used as standards. Loading and elution of the FPLC system was carried out in 50 mM Phosphate with 0.15 M NaCl pH 7. 500 µl fractions were collected and stored at –70°C until analyzed by SDS-PAGE as described [29].

Immunoprecipitation (IP)

IP of GFP-tagged proteins was performed using α-GFP magnetic beads and µ-MACS columns (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) [7,20]. Briefly, whole cell lysates were incubated with 50 µl α-GFP magnetic beads for 30 min on ice. Lysates with magnetic beads were applied onto the columns, washed, 20 µl elution buffer was applied and incubated for 5 min. To complete protein elution, 50 µl elution buffer were applied. 30 µl of the eluate, as well as 3% of input were analyzed as outlined [23].

Statistical Analysis

For experiments stating p -values, a paired Student’s t -test was performed. Unless stated otherwise, p -values represent data

obtained from three independent experiments done in triplicate. p -values <0.05 were considered significant [23].

Results

Monitoring Taspase1 Processing of AF4•MLL Substrates in Living Cells

As the AF4•MLL fusion is a substrate for SIAH1/SIAH2, its steady-state level is low, thereby hampering its detection and experimental analysis [8]. In fact, studies visualizing the intracellular localization of uncleaved or processed AF4•MLL protein are still missing [3]. Also, as biochemical data and *in vitro* interference strategies must be effective at the cellular level, they have to be verified *in vivo*. Hence, we set out to establish a suitable cell-based assay in the most relevant test tube, the living cell (**Figure 1**).

To analyze Taspase1’s processing of AF4•MLL substrates in living cells, we exploited a two component autofluorescent indicator protein system [22]. Therefore, the AF4•MLL residues surrounding the two Taspase1 cleavage sites (A•M_S1/2: aa 1582–1710 of the AF4•MLL fusion protein) were inserted into a backbone composed of GST, GFP, a N-terminal nuclear import (NLS) and a C-terminal nuclear export signal (NES) (**Figure 1a**). As second element the Taspase1 open reading frame was cloned from the Taspase1-expressing acute monocytic leukemia (AMoL) cell lines MV4;11 and THP-1, carrying a t(4;11) or t(9;11) translocation, respectively. Both sequences are identical to the one described by Hsieh et al. [6]. The rationale of this specific assay set-up was that the resulting NLS-GFP/GST-AF4•MLL_S1/2-NES fusion protein (A•M_S1/2) localizes predominantly to the cytoplasm, whereas Taspase1-mediated cleavage liberates the NES triggering nuclear accumulation (**Figure 1b**). However, due to the presence of two cleavage-sites, the A•M_S1/2 indicator protein was already (partially) cleaved by endogenous Taspase1 (**Figure 1c**), which was especially evident in cell lines with high protease expression levels (**Figure 1a**).

As this efficient processing precludes the use of the indicator protein in its current set-up, we engineered proteins harboring only individual AF4•MLL cleavage sites, A•M_S1⁽¹⁶⁰⁰⁾AEGQVD-GADD⁽¹⁶⁰⁹⁾ or A•M_S2⁽¹⁶⁵²⁾KISQLDGVDD⁽¹⁶⁶¹⁾, which are expected to be less efficiently processed. As shown in **Figure S1b–e**, we found that the addition of a linker sequence was crucial for the performance of the A•M_S1 and A•M_S2 indicator proteins. Both indicator proteins localize predominantly to the cytoplasm in cancer cells, whereas ectopic expression of biologically active Taspase1 promoted their cleavage and complete nuclear accumulation (**Figure 1d**). As a control, constructs containing non-functional Taspase1 cleavage sites (A•M_S1_{mut}, aa¹⁶⁰⁰AEGQVAAADD¹⁶⁰⁹ or A•M_S2_{mut},¹⁶⁵²KISQLAAVDD¹⁶⁶¹) remained cytoplasmic (data not shown).

Also in leukemic cells Taspase1 localizes predominantly to cellular nucleus and both indicator proteins localize predominantly to the cytoplasm, while co-expression of either indicator protein and the active protease promotes the indicator protein’s nuclear accumulation (**Figure 2a**). Mutation of Thr²³⁴ into Val (Tasp^{T234V}) or Asp²³³ into Ala (Tasp^{D233A}) of Taspase1 affected autoprocessing as well as the protease’s *trans*-cleavage activity. Both mutants showed a nuclear but not nucleolar localization, but in contrast to the wild type protease co-expression of the catalytically inactive Tasp^{T234V}- or Tasp^{D233A}-GFP mutants did not result in effective cleavage and nuclear translocation of the indicator proteins. Similar results were obtained upon co-expression of untagged Tasp^{T234V} or Tasp^{D233A} as well as of their fusions to the red- (mCherry) or blue-fluorescent (BFP) protein, allowing their independent detection in living cells

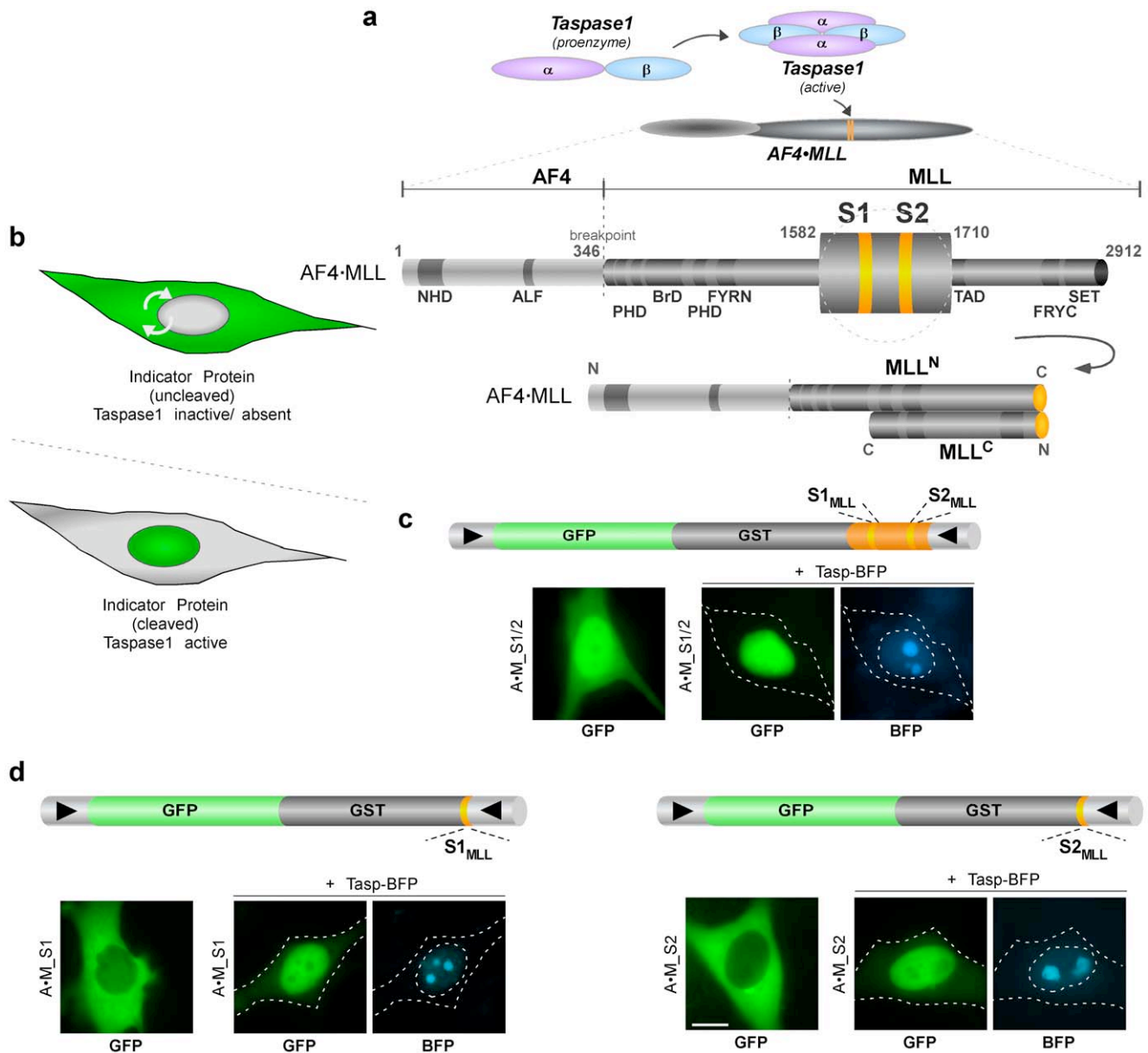


Figure 1. Analyzing Taspase1's processing of AF4-MLL substrates in living cells. **A.** Autoproteolysis of the Taspase1 proenzyme is assumed to trigger formation of the active $\alpha\beta\alpha$ -heterodimer, which hydrolyses the AF4-MLL fusion protein. Following processing, the cleavage products AF4-MLL^N and MLL^C heterodimerize, forming a high molecular-weight protein complex resistant to degradation. Domain organization of the AF4-MLL fusion. Taspase1 cleavage sites, S1 (QVDGADD) and S2 (QLDGVDD), are highlighted. NHD: N-terminal homology domain; ALF: AF4/LAF4/FMR2 homology domain; PHD: plant homeodomain; BrD: bromodomain; FRYN: F/Y rich domain N-terminal; TAD: transactivation domain; FRYC: F/Y rich domain C-terminal; SET: suppressor of variegation, enhancer of zeste and trithorax. Domains are not drawn to scale. **B.** Principle of the cell-based biosensor assay to analyze Taspase1-mediated AF4-MLL processing. The indicator protein localizes predominantly to the cytoplasm but is continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm. Co-expression of active Taspase1 results in the proteolytic removal of the NES, thereby triggering nuclear accumulation of the green fluorescent indicator. **C-D.** Domains of the indicator protein, composed of GST, GFP, combinations of a nuclear import (? NLS) and an export (? NES) signal, combined with the indicated cleavage sites of AF4-MLL. **c.** A·M_S1/2 containing both cleavage sites is already partially processed by endogenous Taspase1 (left panel), but is completely nuclear upon expression of Taspase1-BFP (right panel). **D.** Indicator proteins containing only one cleavage site (A·M_S1 or A·M_S2) are cytoplasmic in their uncleaved state, whereas ectopic expression of active Taspase1 triggers their cleavage and complete nuclear accumulation. GFP/BFP were visualized by fluorescence microscopy in living HeLa transfectants 24 h after transfection. Scale bars, 10 μ m. Dashed lines mark cytoplasmic/nuclear cell boundaries obtained from the corresponding phase contrast images. doi:10.1371/journal.pone.0034142.g001

(Figure 2a, Figure S2 and Table S4), which was confirmed by immunoblot analysis (Figure 2b) [6,13].

These results demonstrate the specificity of the assay system for Taspase1 and underline the advantage of using rational combi-

nations of multi-color autofluorescent proteins to study Taspase1's biological activity in living cells. Interestingly, we found that Tasp^{D233A} showed cleavage-site specificity, being able to process A·M_S2_R, albeit with a highly attenuated activity, but not

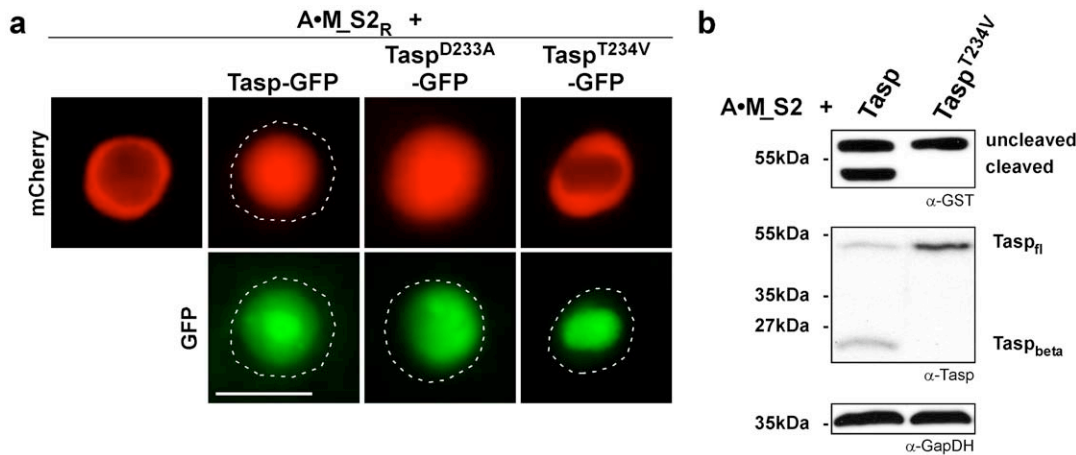


Figure 2. Activity and complex formation of Taspase1 and catalytically inactive mutants. **A.** Taspase1 processing of AF4•MLL substrates in leukemic cells. Co-transfection of Tasp-GFP resulted in proteolytic cleavage and nuclear accumulation of the red fluorescent biosensor, A•M_S2_R, in K562 cells. In contrast, co-expression of Tasp^{D233A}-GFP leads to partial processing and nuclear translocation, while Tasp^{T234V}-GFP was completely inactive. Localization was analyzed 24 h post transfection. GFP/mCherry were visualized by fluorescence microscopy. Scale bars, 10 μm. **B.** Processing of AF4•MLL substrates. Co-transfection of Tasp resulted in proteolytic cleavage of the biosensor A•M_S2_R in 293T cells as indicated by immunoblot. In contrast, Tasp^{T234V} was inactive in *cis* and *trans*. Proteins were visualized using α-GST or α-Taspase1 Abs. GapDH served as loading control. fl, unprocessed Taspase1; Tasp_β, Taspase1 β-subunit. doi:10.1371/journal.pone.0034142.g002

A•M_S1_R (Figure S2). Although fusions of Taspase1 with autofluorescent proteins have been shown to be fully functional, we confirmed these results by employing untagged or HA-tagged Taspase1 variants (data not shown) [23]. Hence, our system is also applicable to assess Taspase1 *trans*-cleavage activity on the individual AF4•MLL cleavage sites independently from each other.

Targeting Taspase1 Function in Trans by Catalytically Inactive Mutants

Subsequently, we used the established bioassay to investigate the consequences of overexpressing catalytically impaired Taspase1 mutants on the activity of the wild type (WT) enzyme *in trans*. We reasoned if inactive Taspase1 mutants are capable of forming heterodimers with WT Taspase1 (heterodimerization model), enforced overexpression of these mutants should have a dominant-negative effect. Besides the catalytically dead Tasp^{T234V}-GFP mutant, we also included Tasp^{D233A}-GFP in the analysis, as this variant exists in a biologically active though highly attenuated conformation. Notably, our assay demonstrated that even co-transfecting a nine-fold excess of the Tasp^{T234V}- or the Tasp^{D233A}-GFP mutants over the WT Taspase1 expression plasmid did not affect Taspase1's processing of either the first or the second AF4•MLL cleavage site in solid as well as in leukemic cancer cell lines. These results could be independently verified in several solid as well as leukemic cancer cell lines (Figure 3a/b and Table 1). Immunoblot analysis confirmed that the mutants were efficiently overexpressed (Figure 3c). Similar results were obtained when using HA-tagged or untagged Taspase mutants (data not shown). To further exclude the formal possibility that our results are only valid for ectopically expressed Taspase1, we used the SaOs and SW480 cell lines expressing high levels of endogenous Taspase1 [23]. Upon expression in these cells, the A•M_S1/2 indicator protein is already fully or partially cleaved by endogenous Taspase1 resulting in its predominant nuclear localization (Figure S1a and Table 1). As expected, overexpression of the inactive Taspase1 variants did not inhibit the

endogenous enzyme and thus, did not affect cleavage of the indicator protein in *trans* (Table 1).

Next, we further analyzed whether *cis*-cleavage of WT Taspase1 could be affected *in trans*. As shown in Figure 3d, co-transfection of the WT protease with GFP-tagged or untagged mutants did not inhibit Taspase1's *cis*-cleavage activity, since the processed Taspase1 β-subunit was detectable in all plasmid combinations used. Immunoblot analysis verified that the Tasp^{T234V}- or Tasp^{D233A}-GFP proenzymes are impaired in their activation by autoproteolytic *cis*-cleavage (Figure 3d).

Also, we tested whether overexpression of the individual Taspase1 α- or β-subunit, which are clearly proteolytically inactive, affects Taspase1's *trans* cleavage. In line with the results obtained upon overexpression of full-length inactive Taspase1 variants, no inhibition of Taspase1's processing was detectable (Figure S3a/b).

To additionally exclude the possibility that the lack of a *trans*-dominant phenotype was restricted to the AF4•MLL protein, we tested the ability of the mutants to interfere with the processing of indicator proteins containing the cleavage-sites from the *bona fide* Taspase1 targets TFIIA (NLS-mCherry/GST-TFIIA_S-NES = T-FIIA_S_R) and USF2 (NLS-mCherry/GST-USF2_S-NES = USF2_S_R) [7]. No inhibition of processing occurred for these substrates as well as for the full length TFIIA or USF2 proteins (Table 1).

Analysing Taspase1 Heterocomplex-formation

In general, interruption of pathological relevant protein complexes *via* enforced expression of *trans*-dominant negative mutants critically depends on efficient heterocomplex formation [9,30]. Thus, the lack of a *trans*-dominant negative effect upon overexpression of inactive Taspase1 mutants may be explained by inefficient heterocomplex formation *in vivo*. Expression of Taspase1-GFP in bacteria showed protein aggregation (Figure S3c), which had been previously reported [13]. Co-immunoprecipitation studies of overexpressed Taspase1 and GFP-fusions of the Taspase1 variants also indicated that the WT protein is in principle able to interact with biologically impaired mutants

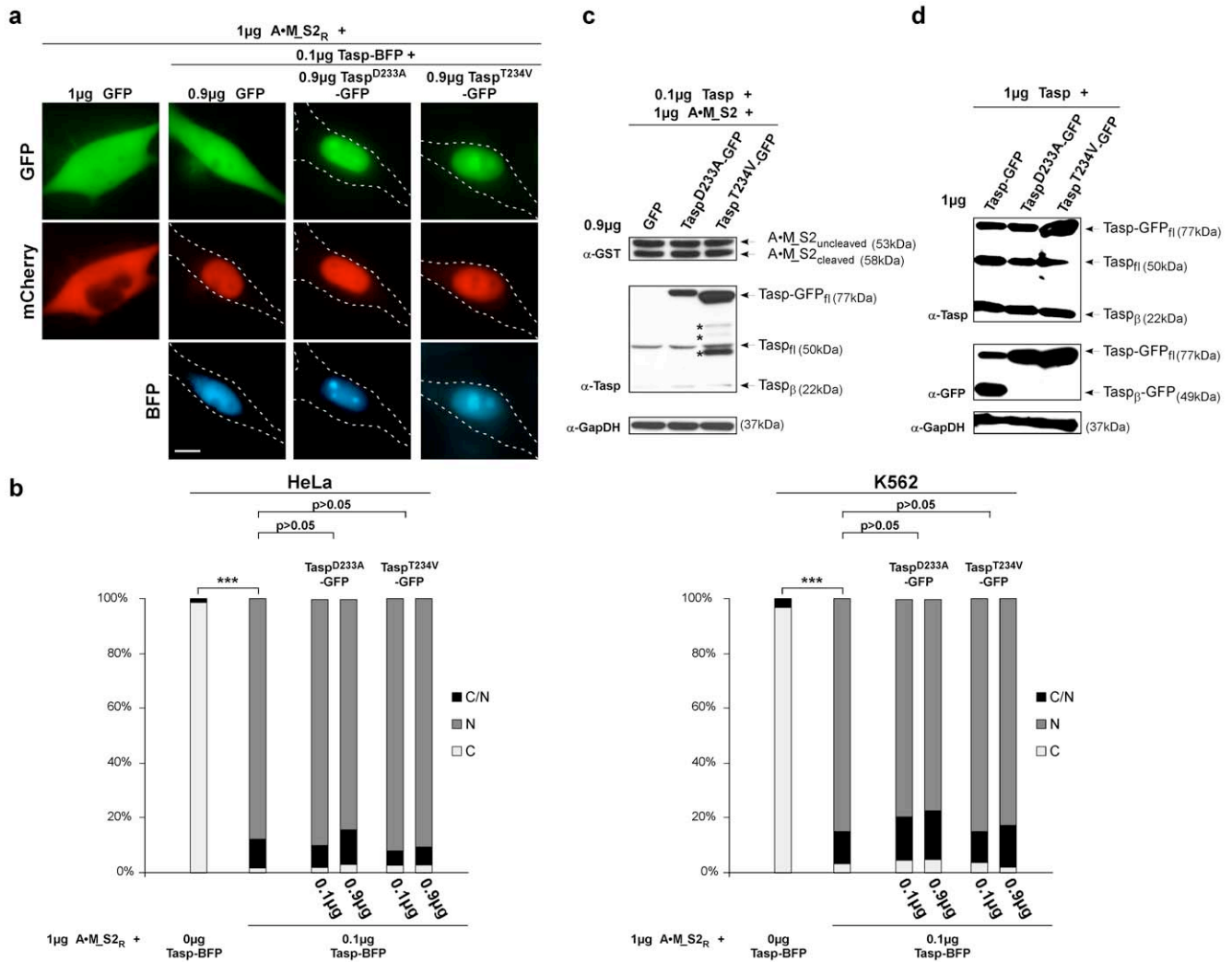


Figure 3. Overexpression of inactive Taspase1 mutants does not inhibit Taspase1's cis- or trans-cleavage activity. **A.** Cells were transfected with 1 μg of A·M_S2_R, 0.1 μg Tasp-BFP together with the indicated amounts of inactive Taspase1 mutants or GFP expression plasmid, and analyzed 24 h later. Even co-transfection of a nine-fold excess of plasmids encoding the inactive Taspase1 variants did not affect A·M_S2_R processing in living HeLa cells. **B.** The number of HeLa (left panel) or leukemic K562 cells (right panel) showing cytoplasmic (C), cytoplasmic and nuclear (N/C) or nuclear (N) fluorescence was counted in at least 200 A·M_S2_R-expressing cells. Results from one representative experiment of each indicated cell line are shown. Whereas the number of cell displaying cytoplasmic fluorescence significantly decreased by *trans*-cleavage upon co-transfection of 0.1 μg Tasp-BFP expression plasmid (***: $p < 0.0001$), no significant *trans*-dominant negative effect was evident for Taspase1 mutants. **C.** Taspase1 *trans*-cleavage of A·M_S2_R is unaffected by inactive Taspase1 mutants as shown by immunoblot analysis of 293T cells transfected with the indicated expression plasmids. Proteins and cleavage products were visualized using α -GST and α -Tasp Ab. GapDH served as loading control. **D.** *Cis*-cleavage of Taspase1 is not inhibited by inactive Taspase1 mutants as shown by immunoblot analysis of 293T cells transfected with 1 μg of the indicated expression plasmids.

doi:10.1371/journal.pone.0034142.g003

(**Figure 4a**). However, when compared to complex formation of Taspase1 with a *bona fide* interaction partner, the nucleolar protein NPM1, the observed interaction was rather weak (**Figure S3d**) [23].

To further exclude that these results might be valid only for ectopically overexpressed Taspase1, we additionally examined the endogenous protein in MV4;11 human leukemia cells. These cells were isolated from a patient containing a t(4;11) translocation and thus, express the AF4·MLL fusion protein, which is processed by endogenous Taspase1. Employing gel filtration chromatography of cell lysates isolated under native conditions, we detected endogenous Taspase1 predominantly as an $\alpha\beta$ -monomer (**Figure S3e**).

Probing Taspase1 Heterocomplex-formation in Living Cells by a Translocation-based Protein Interaction Assay

Subsequently, we applied a dual color translocation assay that allows visualization of protein complex formation in living cells (**Figure 4b**) to test our hypothesis. This principle has been successfully employed in several studies to assess protein interaction in living cells, including the t(4;11) leukemia relevant MLL-FYRN and -FYRC proteins [9,22,23,31]. Here, GFP-tagged Taspase1 was engineered to localize predominantly to the cytoplasm by C-terminal fusion of a strong nuclear export signal (NES) (Tasp_{Cyt}). Due to Taspase1's intrinsic nuclear import signal, Tasp_{Cyt} is continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm, and still catalytically active (**Figure 4b/c**) [23]. The red-fluorescent Taspase1 variants (Tasp-mCherry, prey) however

Table 1. Effects of overexpressing inactive Taspase1 mutants in trans on Taspase1's processing of various target proteins.

1 μ g indicator + localization	0.1 μ g BFP + 0.9 μ g GFP		0.1 μ g Tasp-BFP + 0.9 μ g GFP		0.1 μ g Tasp-BFP + 0.9 μ g Tasp ^{T234V} -GFP		0.1 μ g Tasp-BFP + 0.9 μ g Tasp ^{D233A} -GFP	
	C	N	C	N	C	N	C	N
A-M_S1 _R (HeLa)	>90%	<1%	<5%	>80%	<5%	>80%	<5%	>80%
A-M_S1 _R (K652)	>85%	<1%	<7%	>75%	<7%	>75%	<7%	>75%
A-M_S2 _R (HeLa)	>90%	<1%	<5%	>80%	<5%	>80%	<5%	>80%
A-M_S2 _R (K562)	>85%	<1%	<5%	>80%	<5%	>80%	<5%	>80%
TFIIA_S _R (HeLa)	>90%	<1%	<5%	>80%	<5%	>80%	<5%	>80%
USF2_S _R (HeLa)	>90%	<1%	<5%	>80%	<5%	>80%	<5%	>80%
	1 μ g BFP		1 μ g Tasp ^{T234V} -BFP		1 μ g Tasp ^{D233A} -BFP			
	C	N	C	N	C	N		
A-M_S1/2 (SaOs)	<2%	>90%	<2%	>90%	<2%	>90%		
A-M_S1/2 (SW480)	<5%	>80%	<5%	>80%	<5%	>80%		

Leukemic (K562) and solid tumor cells were transfected with the indicated amounts of the different indicator plasmids, together with respective control plasmids, or expression plasmids encoding active or inactive Taspase1 mutants, and analyzed 24 h later. The number of cells showing cytoplasmic (C) or nuclear (N) fluorescence was counted in at least 200 indicator protein-expressing cells. Results from one representative experiment are shown. Whereas the number of transfectants displaying cytoplasmic fluorescence, i.e., uncleaved indicator protein, significantly decreased upon co-transfection of 0.1 μ g Tasp-BFP expression plasmid (***: $p < 0.0001$), no inhibition of cleavage was observed even upon co-transfection of 0.9 μ g expression plasmids encoding for the inactive Taspase1 mutants. In transfectants with high (SaOs) or intermediate (SW480) levels of endogenous Taspase1, the A-M_S1/2 indicator protein (0.2 μ g expression plasmid) is already fully or partially cleaved in absence of ectopically expressed protease resulting in its predominant nuclear localization. A similar localization was observed upon co-expression of the inactive Taspase1 variants (1 μ g expression plasmid), indicating that the activity of endogenous Taspase1 is not inhibited in *trans*.
doi:10.1371/journal.pone.0034142.t001

accumulate in the nucleus/nucleolus (**Figure 4c/d**). Upon co-expression and efficient heterocomplex formation, the GFP-tagged Tasp_{Cyt} is expected to co-localize with the Tasp-mCherry prey variants in the nucleus/nucleolus. Therefore, nuclear translocation serves as a reliable indicator for efficient protein-protein interaction in living cells. This approach allows analyzing complex formation between the WT and the inactive mutant enzymes (**Figure 4b**). Co-expression of the positive control, NPM1-RFP, significantly triggered nuclear/nucleolar translocation of GFP-Tasp_{Cyt}, whereas co-expression of the non-interacting nucleolar RevM10BL-RFP protein (negative control) showed no effect (**Figure 4d**), confirming the assays specificity. As already expected from the functional data (**Figure 3**), co-expression of mutant Taspase1 variants did not result in strong nuclear/nucleolar translocation of Tasp_{Cyt}, indicative of only weak heterocomplex formation (**Figure 4d**). Similar results were obtained upon expression of untagged WT or mutant Taspase1 by immunofluorescence analysis in fixed cells (data not shown). To objectively quantitate the degree of co-localization, we employed confocal laser scanning microscopy revealing a colocalization R-value of 0.74 for NPM1-RFP, 0.19 for RevM10BL-RFP and R-values of 0.38–0.39 for WT and Taspase1 mutants, respectively (**Table S4** and **Figure S4**). Hence, although WT or mutant Taspase1 variants are in principle able to form (hetero)complexes, these complexes appear to be rather unstable.

Subsequently, we investigated whether the individual α - or β -subunits efficiently bound to WT or mutant Taspase1 variants. We found that the nuclear Taspase1 α -BFP protein (**Figure S5a**, upper picture) was unable to efficiently multimerize with Tasp_{Cyt} and to recruit it to the nucleus (**Figure S5b**). Second, co-expression of Taspase1- or Tasp^{T234V}-mCherry did not induce nuclear/nucleolar translocation of Tasp β -GFP (**Figure S5a**, lower picture and **S5c**).

Of note, although the subunits were unable to efficiently interact with full length Taspase1, we though observed hetero-

complex formation when both subunits were co-expressed. As shown in **Figure S5d**, Tasp α -BFP or Tasp α -HA recruited Tasp β -GFP to the nucleus. Also, an engineered cytoplasmic Tasp β protein (Tasp β -Cyt), accumulated in the nucleus due to complex formation with nuclear Tasp α -BFP or Tasp α -HA (**Figure S5e**). These results are somehow unexpected as overexpression of the individual Taspase1 α - or β -subunits showed no *trans*-dominant negative effect (**Figure S3c/d**). Thus, we examined whether the complex formed upon coexpression of the individual subunits resembles biologically active Taspase1 generated by autoproteolytic cleavage of the proenzyme. Upon co-expression of Tasp α -BFP with Tasp β -GFP neither the AF4•MLL- nor the TFIIA-indicator protein was cleaved (**Figure S5f** and data not shown). Similar results were obtained by co-expressing Tasp α -HA with untagged Tasp β (data not shown). Hence, co-expression of the individual α - and β -subunit does not allow their assembly into an enzymatically active protease complex. Formation of the $\alpha\beta$ -monomer by *cis*-cleavage of the proenzyme seems to occur by a regulated step-wise process.

Discussion

Recent advances towards the understanding of cancer system biology inspired to consider cancer-related protein-protein interaction networks as potential therapeutic targets [15,16,17]. Recently, we used our *in vivo* protein interaction assay to also demonstrate that it is in principle possible to specifically inhibit the AF4•MLL oncoprotein by genetic PPIs inhibitors [9]. As the steady-state amount of the AF4•MLL protein is critically controlled through its processing by Taspase1, it is tempting to target the formation of the active protease by interfering with its multimerization as a novel strategy to block the pathological function of AF4•MLL. However, in order to potentially transfer such approaches into the clinics it is imperative to know whether the protein of interest indeed efficiently forms multimers *in vivo* causally required for its pathological functions.

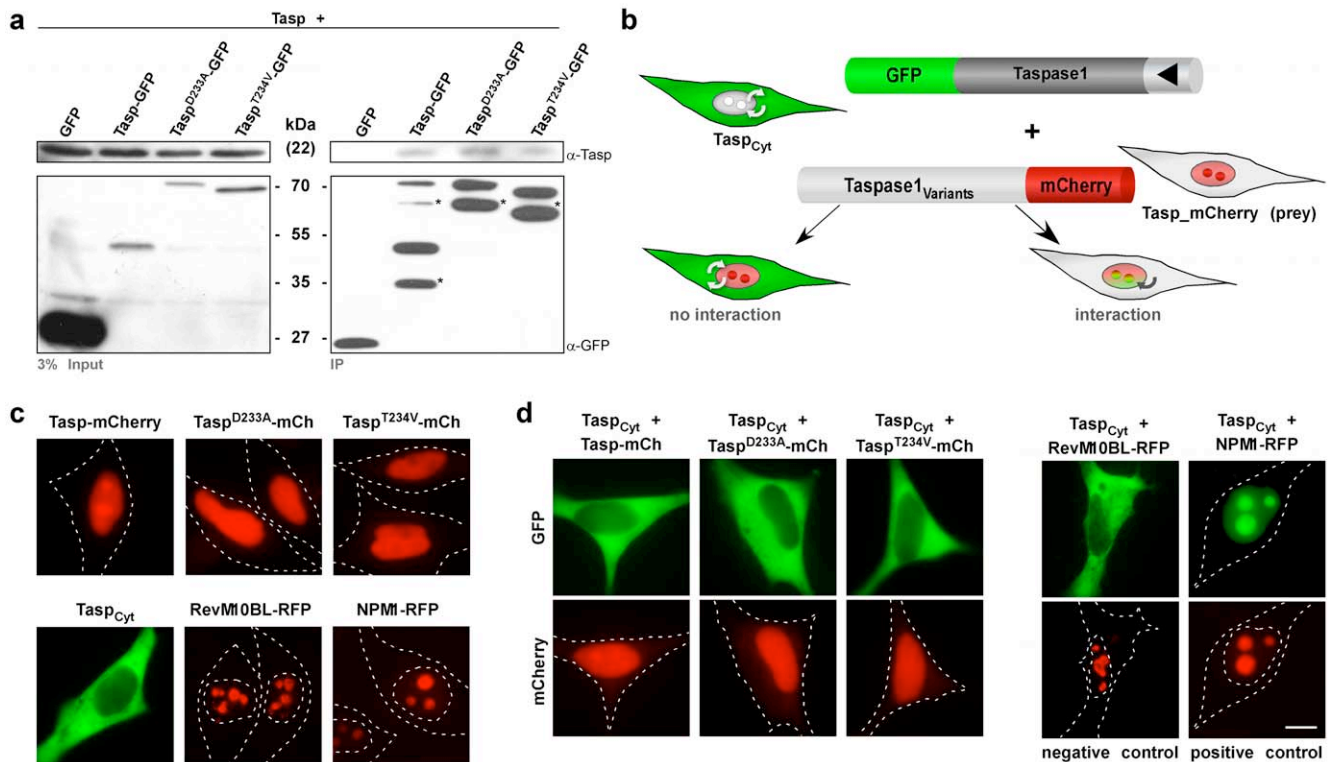


Figure 4. Probing Taspase1 multimerization in living cells. **A.** Heterocomplex formation of Taspase1 and Taspase1 variants shown by co-immunoprecipitation (IP). IPs of 293T cell extracts co-transfected with the indicated expression constructs were carried out using α -GFP Ab-coated magnetic beads and μ -MACS columns. Precipitated proteins were identified by immunoblot using the indicated antibodies. Input: Total amount of cell lysate. IP: immunoprecipitated proteins. *: GFP-degradation products [33]. **B.** Principle of the translocation based protein-protein interaction assay. The Tasp_{Cyt} fusion is composed of GFP, Taspase1 and a NES (?) and thus, continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm. The red-fluorescent Taspase1 variants (Tasp-mCherry prey) accumulate at the nucleus/nucleolus. Upon efficient protein-protein interaction, the GFP-tagged cytoplasmic Tasp_{Cyt} co-localizes with the Tasp-mCherry prey to the nucleus/nucleolus in living cells. **C.** Localization of indicated proteins in the absence of potential interaction partners. **D.** Neither co-expression of WT nor inactive Taspase1 variants resulted in strong nuclear/nucleolar translocation of Tasp_{Cyt}. Co-expression of NPM1-RFP, known to strongly interact with Taspase1, triggered nuclear/nucleolar translocation of Tasp_{Cyt} (positive control). In contrast, co-expression of the non-interacting nucleolar RevM10BL-RFP protein showed no effect (negative control) as visualized by fluorescence microscopy in living HeLa transfectants. Scale bars, 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0034142.g004

For Taspase1 it is assumed that following autoproteolysis of the zymogen, its subunits assemble into an asymmetric $\alpha\beta\alpha$ -heterodimer, representing the active protease [6,13]. This model is mainly based on the crystal structures of other type 2 asparaginases, as well as on the structure obtained from bacterially expressed Taspase1 [13]. Thus, it was concluded that the enzymes consist as a four-layered $\alpha\beta\alpha$ structure, with a central, mostly anti-parallel β -sandwich that is surrounded by α -helices on both faces [6,13]. However, experimental evidence convincingly demonstrating that not only Taspase1 but also other type 2 asparaginases do exist in their natural environment as heterodimers, and that multimerization is indeed essential for their biological activities is still missing. Clearly, the structure resolved by Khan et al. provided important insights into Taspase1 function, albeit some limitations may exist [13]. For example, the position of critical functional domains, such as the bipartite NLS can't be deduced from the current computational model of Taspase1 as these residues are disordered [13,23]. Also, the structure of the $\alpha\beta\alpha$ -heterodimer was obtained by co-crystallizing the individual subunits rather than the autoproteolytically processed zymogen. As shown in our study, co-expression of the individual Taspase1 subunits was unable to assemble into a functional protease *in vivo*.

Based on our data it is thus conceivable to speculate that *in vivo* a complex equilibrium between Taspase1 dimers and already active

$\alpha\beta$ -monomers might exist (Figure 5). According to the "heterodimer model", the full length Taspase1 zymogen dimerizes, and upon autoproteolysis assembles into an asymmetric Taspase1 $_{\alpha\beta\alpha}$ -heterodimer, representing the active protease. Hence, Taspase1 is expected to exist in equilibrium of full length Taspase1 monomers, unprocessed Taspase1 dimers as well as active processed Taspase1 $_{\alpha\beta\alpha}$ -heterodimers. The Taspase1 $_{\alpha\beta\alpha}$ -heterodimers may further dissociate into free Taspase1 $_{\alpha}$ and Taspase1 $_{\beta}$ subunits. The formation of these forms is regulated by their association (k_1) and dissociation constants (k_{-1}) as well as by the kinetics of autoproteolysis, which have not been determined yet (Figure 5a-c).

Interruption of pathological relevant protein complexes *via* enforced expression of *trans*-dominant negative mutants has been employed in several disease models and requires efficient heterocomplex formation [15,32]. Assuming that inactive Taspase1 variants are capable of interacting efficiently with the wild type enzyme, a nine-fold overexpression of inactive Taspase1 variants would strongly shift the equilibrium towards the formation of catalytically impaired heterodimers, resulting in a significant *trans*-dominant negative phenotype *in vivo*. For the cases reported, inhibition was already evident upon equimolar co-expression of WT protein and *trans*-dominant mutants, in contrast to what we observed for Taspase1 and inactive Taspase1 variants.

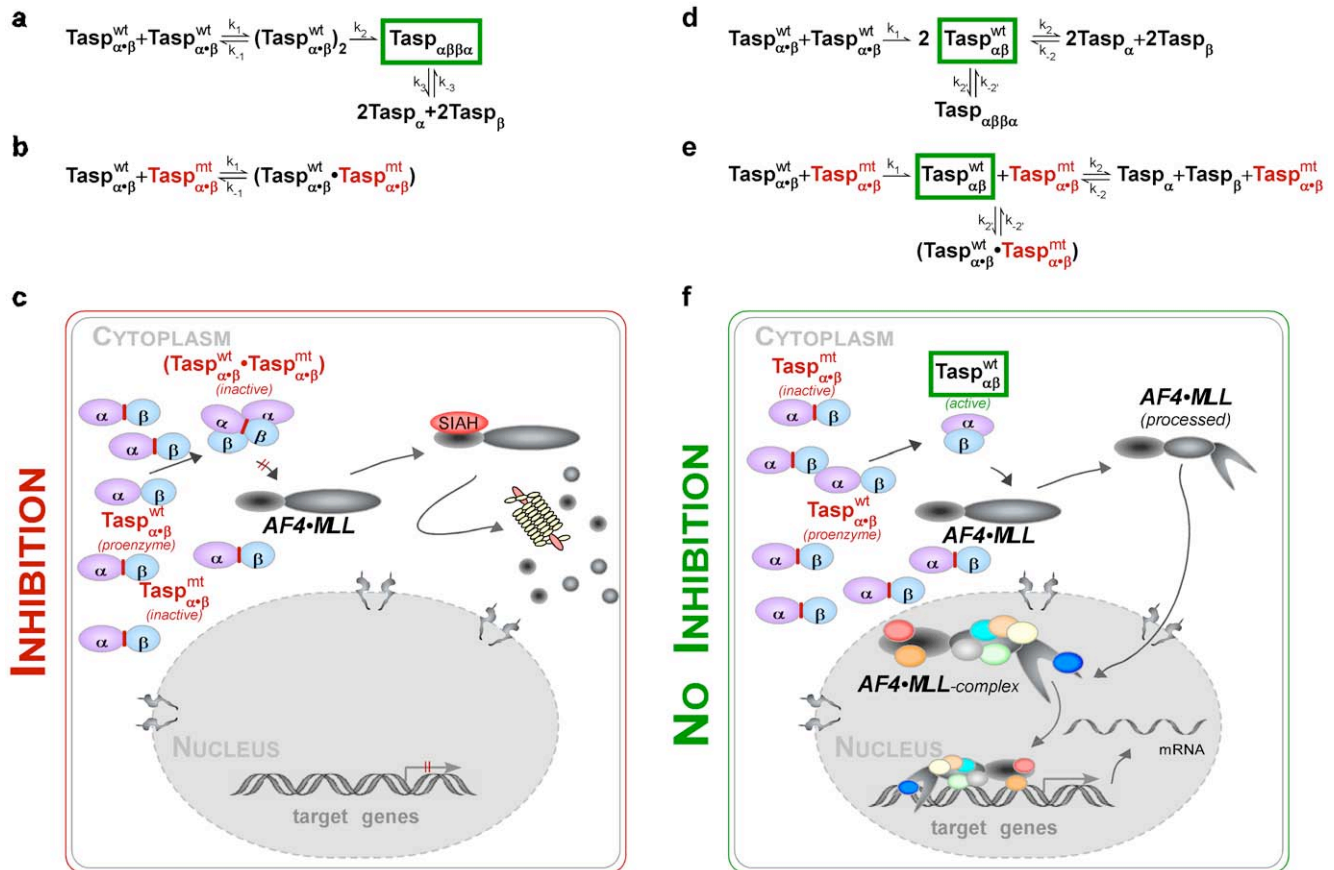


Figure 5. Models illustrating how Taspase1 heterocomplex formation determines the biological effects of overexpressing inactive Taspase1 mutants. **A–C:** Heterodimer model - allowing inhibition of Taspase1 function by *trans* dominant mutants. **A.** Upon translation, the Taspase1 zymogen dimerizes and following autoproteolysis matures into an asymmetric Taspase1_{αβ}α-heterodimer, representing the active protease. Taspase1 exist in equilibrium of unprocessed Taspase1 monomers, unprocessed Taspase1 dimers, and active processed Taspase1_{αβ}α-heterodimers. The Taspase1_{αβ}α-heterodimers may further dissociate into free Taspase1_α and Taspase1_β subunits. **B.** Co-expression of an excess of inactive Taspase1 variants results in the formation of catalytically impaired heterodimers, reducing the concentration of active Taspase1 molecules. **C.** Consequently, AF4•MLL processing is inhibited allowing its degradation by SIAH1/2, thereby preventing the activation of cellular proliferation programs. **D–F:** Monomer model - predicting Taspase1's resistance to enforced expression of inactive mutants. **D.** The Taspase1_{αβ} proenzyme is autoproteolytically cleaved, forming an active Taspase1_{αβ} monomer. The processed Taspase1_{αβ} monomer seems to exist also as a Taspase1_{αβ}α-heterodimer, and potentially in equilibrium with its subunits. **E.** Overexpression of inactive Taspase1 variants does not affect the concentration and activity of Taspase1_{αβ} monomers. **F.** Hence, Taspase1_{αβ} monomers are able to cleave the AF4•MLL fusion protein, resulting in the formation of a SIAH-resistant AF4•MLL complex allowing the activation of target genes driving oncogenesis.
doi:10.1371/journal.pone.0034142.g005

Albeit the current literature does not indicate that tagged- and untagged-Taspase1 behaves differently [7,23]; this report, we are aware that the results of the *in vivo* protein interaction assays might be affected by the use of Taspase1 variants fused to autofluorescent proteins.

Alternatively, our data could be interpreted by a “monomer model”, in which the Taspase1_{αβ} proenzyme is autoproteolytically cleaved forming a Taspase1_{αβ} monomer, already representing the active protease (Figure 5d–f). According to this model, the relative concentrations of these forms and thus, protease activity are regulated by the kinetics of autoproteolysis. As such, it is expected that even an excess of inactive Taspase1 variants would not affect the formation and biological activity of the Taspase1_{αβ} monomers, which is in line with our experimental evidence. Such a model though does not exclude that the cellular pool is composed of Taspase1_{αβ} monomers as well as Taspase1_{αβ}α-heterodimers. Whether such multimerization has additional biological implications, such as preventing Taspase1 degradation, conferring cleavage-site selectivity or specificity remains to be

resolved. Theoretically, processed Taspase1_{αβ} may also exist in equilibrium with its subunits. However our observation that co-expression of the individual α- and β-subunit does not allow their assembly into an enzymatically active protease complex, argues against a highly dynamic exchange of the subunits. Hence, assembly of the αβ-monomer by *cis*-cleavage of the proenzyme seems to occur by an ordered, stepwise process, which might be guided by molecular chaperones, such as NPM1 [23]. In line with our findings, Khan et al. reported significant differences in the structures obtained by co-expression of the individual Taspase1 subunits *versus* the full-length enzyme [13].

As one might argue that the catalytically inactive Tasp^{T234V} variant is unable to achieve a conformation allowing efficient complex formation with active Taspase1, we included the highly attenuated Tasp^{D233A} mutant in the analysis. The molecular mechanism explaining why this mutant showed cleavage-site specificity is not yet resolved. Although this variant thus exists, at least transiently, in a biologically relevant conformation, we did not observe an inhibitory effect.

In conclusion, we provide first evidence that (i) overexpression of biologically inactive Taspase1 mutants as well as of the α - or β -subunits does not interfere with Taspase1's *cis*- and *trans*-cleavage activity; and (ii) complexes formed by the individual Taspase1 α and β subunit are inactive and do not reflect biologically active Taspase1 generated by autoproteolytic cleavage of the zymogen.

We are aware that besides the models presented here, our results may be explained by alternative models, in which the tetramer only needs one active dimer or has such a high turn over that the effects are not measurable. Clearly, comprehensive experimental work is required to discriminate between these molecular scenarios *in vivo*. However, this would imply that targeting Taspase1 heteromultimerization by genetic or chemical decoys is unlikely to interfere with its (patho)biological activity, including activation of the AF4•MLL oncoprotein (Figure 5f). As stabilization of protein complexes by chemical decoys is currently considered an alternative approach to inhibit disease-relevant pathways, it is tempting to investigate such an approach also for Taspase1. Based on our work and studies reported so far, strategies to dissect and selectively inhibit the (patho)biological activity of Taspase1 in oncogenesis are still advised to focus on the (high-throughput) identification of chemicals targeting Taspase1's catalytic activity.

Supporting Information

Figure S1 Optimization of indicator proteins to monitor AF4•MLL processing. **A.** Nuclear localization of the A•M_{S1/2} indicator protein in cancer cell lines expressing high levels of endogenous Taspase1. **B–E.** Optimization of the AF4•MLL cleavage indicator proteins by addition of linker sequences shown in HeLa cells. Integration of the Taspase1 AF4•MLL recognition site alone does not allow processing and nuclear accumulation of the indicator protein by ectopically expressed Taspase1-BFP (**B**) Processing was improved by the integration of a GSGS- (**C**) or KIS-linker (**D**) N-terminal to the cleavage site. The A•M_{S2} indicator protein containing the KISQLDGVDDGSGS cleavage site (spacer sequence underlined) showed optimal performance, cytoplasmic in the absence of ectopic Taspase1, whereas co-expression of Taspase1-BFP triggered proteolytic cleavage and complete nuclear translocation (**E**). BFP/GFP-fusion was visualized by fluorescence microscopy in living transfectants. Scale bars, 10 μ m. Dashed lines mark cytoplasmic/nuclear cell boundaries obtained from the corresponding phase contrast images. (PDF)

Figure S2 Taspase1 *trans* processing of AF4•MLL substrates shows cleavage site-specificity. **A.** Whereas the indicator protein A•M_{S1R}, containing the first cleavage-site from AF4•MLL, was efficiently processed by Tasp-GFP, both Taspase1 mutants, Tasp^{T234V}- or Tasp^{D233A}-GFP, were inactive. **B.** In contrast, Tasp^{D233A}-GFP was able to partially process A•M_{S2R}, containing the second cleavage-site from AF4•MLL, whereas Tasp^{T234V}-GFP was inactive. Proteins were visualized by fluorescence microscopy in living HeLa cell transfected with the indicated expression plasmids 24 h after transfection. Scale bar, 10 μ m. **C–D.** Cytoplasmic (C), cytoplasmic and nuclear (N/C) or nuclear (N) fluorescence was counted in at least 200 A•M_{S1R} (**C**) or A•M_{S2R} (**D**) -expressing HeLa cell co-transfected with the indicated expression plasmids. Results from a representative experiment are shown. The number of cells displaying cytoplasmic fluorescence significantly decreased upon cotransfection of 0.1 μ g Tasp-BFP expression plasmid (***: $p < 0.0001$). Neither Tasp^{T234V}- nor Tasp^{D233A}-GFP cleaved A•M_{S1R}, but

Tasp^{D233A}-GFP was able to partially process A•M_{S2R}, containing the second AF4•MLL cleavage-site. (PDF)

Figure S3 A. Expression of GST-Tasp1-GFP (upper panel) in BL21 bacteria shows extensive protein aggregation. In contrast, GST-GFP showed no aggregation (lower panel). Images were taken with identical CCD camera settings. Scale bar, 1 μ m. **B.** NPM1 strongly interacts with Tasp-GFP. IPs of 293T cell extracts co-transfected with the indicated expression. Precipitated proteins were identified by immunoblot using the indicated antibodies. Input: Total amount of cell lysate. IP: Immunoprecipitated proteins. #: GFP-degradation products. **C–D.** Taspase1 *trans*-cleavage is unaffected by overexpression of the Taspase1 α -subunit. HeLa cells were co-transfected with the indicated expression plasmid and analyzed 24 h later. **C.** Even co-transfection of a nine-fold excess of the nuclear Tasp α -GFP did not affect A•M_{S2R} processing and its nuclear translocation. The cleaved red-fluorescent indicator protein, Tasp α -GFP, and active Tasp-BFP fusions were independently visualized by fluorescence microscopy in living cells. A representative cell is shown. Scale bar, 10 μ m. **D.** The number of cells showing cytoplasmic (C), cytoplasmic and nuclear (N/C) or nuclear (N) fluorescence was counted in at least 200 A•M_{S2R}-expressing cells. Results from a representative experiment are shown. Whereas the number of cell displaying cytoplasmic fluorescence significantly decreased upon co-transfection of 0.1 μ g Tasp-BFP expression plasmid, overexpression of Tasp α -GFP or GFP alone did not inhibit the activity of Tasp-BFP in *trans*. **E.** Endogenous Taspase1 is detectable predominantly as an $\alpha\beta$ -monomer. Cell lysates isolated under native conditions from MV4;11 human leukemia cells were separated by gel filtration chromatography and resolved by 1D-SDS PAGE. Immunoblot analysis of FPLC of MV4;11 cell lysates. Endogenous Taspase1 was visualized in the fractions (49 to 94 kDa) by immunoblot using α -Tasp Ab. *: degradation products. (PDF)

Figure S4 Quantitating Taspase1 protein-interaction in living cells by confocal microscopy. HeLa cells were transfected with the indicated expression plasmids and protein localization as well as co-localization analyzed by confocal microscopy 24 h post transfection. Scale bars, 10 μ m. **A–B.** Localization of RevM10BL- (negative control), NPM1-RFP (positive control), Tasp_{Cyt}, and the red-fluorescent Taspase1 variants (Tasp_{mCherry-prey}) in the absence of potential interaction partners in living cells. **C–D.** Quantitation of protein co-localization shown as scatter gram with the gained Manders overlap coefficient indicated (R values). **C.** Co-expression of RevM10BL-RFP had no effect on Tasp_{Cyt} localization (R = 0.1928), whereas efficient nuclear/nucleolar translocation was observed upon co-expression of NPM1-RFP (R = 0.7354). **D.** In contrast, neither co-expression of WT (R = 0.3867) nor mutant Taspase1 variants (Tasp^{D233A}-mCherry, R = 0.3942; Tasp^{T234V}-mCherry, R = 0.3876) resulted in strong nuclear/nucleolar translocation of Tasp_{Cyt}, indicative of only weak heterocomplex formation in living cells. (PDF)

Figure S5 Translocation assay to analyze complex formation of Taspase1 subunits. **A–C.** The Taspase1 α - or β -subunits do not form stable heterocomplexes with WT Taspase1. **A.** Localization of Taspase1 α - or β -subunits in HeLa transfectants. Tasp α -BFP localizes to the nucleus, whereas Tasp β -GFP is nuclear and cytoplasmic. **B.** Co-expression of Tasp α -BFP did not trigger nuclear/nucleolar translocation of full length

Tasp_{Cyt}. **C.** Also, co-expression of nuclear/nucleolar Tasp-mCh did not translocate Tasp_β-GFP to the nucleolus. Autofluorescent fusion proteins were visualized in the same cells by fluorescence microscopy. **D–E.** Co-expression of the isolated Taspase1 subunits results in complex formation. **D.** Upon co-expression, nuclear Tasp_α-BFP associates with Tasp_β-GFP and recruits to the nucleus. **E.** Also, a cytoplasmatic GFP-Tasp_β protein (Tasp-β_{Cyt}), generated by fusion of a strong nuclear export signal (left panel), accumulated in the nucleus by binding to nuclear Tasp_α-BFP (right panel). **F.** Upon co-expression the isolated Taspase1 subunits do not assemble into an enzymatically active protease complex. Co-expression of Tasp_α-BFP with Tasp_β-GFP does not result in processing of the A•M₂R indicator protein. The uncleaved red-fluorescent indicator protein, Tasp_α-BFP, and Tasp_β-GFP were independently visualized by fluorescence microscopy in living cells. A representative cell is shown. Scale bar, 10 μm.

(PDF)

Table S1 List of described disease-associated MLL fusions. *Abbreviations:* ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; AUL/ANL, acute undifferentiated leukemia/acute nonlymphocytic leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; tALL/tAML/tMDS, therapy related ALL/AML/MDS; tT-ALL, therapy related T-cell ALL. X: indicates the presence of a putative Taspase1 cleavage site, based on the Taspase1 recognition sequence (Q³[F,I,L,V]²D¹ ↓ G¹x²D³D⁴) [1].

(PDF)

References

- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, et al. (2009) New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23: 1490–1499.
- Montes R, Ayllon V, Gutierrez-Aranda I, Prat I, Hernandez-Lamas MC, et al. (2011) Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* 117: 4746–4758.
- Bursen A, Schwabe K, Ruster B, Henschler R, Ruthardt M, et al. (2010) The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4. *Blood* 115: 3570–3579.
- Hsieh JJ, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (2003) 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.
- Yokoyama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M (2002) Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100: 3710–3718.
- Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ (2003) Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* 115: 293–303.
- Bier C, Knauer SK, Klaphor A, Schweitzer A, Reikik A, et al. (2011) Cell-based Analysis of Structure-Function Activity of Threonine Aspartase 1. *J Biol Chem* 286: 3007–3017.
- Bursen A, Moritz S, Gaussmann A, Moritz S, Dingermann T, et al. (2004) Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* 23: 6237–6249.
- Pless B, Oehm C, Knauer S, Stauber RH, Dingermann T, et al. (2011) The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC-are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* 25: 663–670.
- Benedikt A, Baltruschat S, Scholz B, Bursen A, Arrey TN, et al. (2011) The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures. *Leukemia* 25: 135–144.
- Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ (2009) MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther* 8: 1204–1211.
- Marschalek R (2010) Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *Febs J* 277: 1822–1831.
- Khan JA, Dunn BM, Tong L (2005) Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL. *Structure* 13: 1443–1452.
- Huang YJ, Hang D, Lu LJ, Tong L, Gerstein MB, et al. (2008) Targeting the human cancer pathway protein interaction network by structural genomics. *Mol Cell Proteomics* 7: 2048–2060.
- Arkin MR, Whitty A (2009) The road less traveled: modulating signal transduction enzymes by inhibiting their protein-protein interactions. *Curr Opin Chem Biol* 13: 284–290.
- Tanaka T, Rabbits TH (2008) Interfering with protein-protein interactions: potential for cancer therapy. *Cell Cycle* 7: 1569–1574.
- Weber L (2010) Patented inhibitors of p53-Mdm2 interaction (2006–2008). *Expert Opin Ther Pat* 20: 179–191.
- Srinivasan RS, Nesbit JB, Marrero L, Erfurth F, LaRussa VF, et al. (2004) The synthetic peptide PFWT disrupts AF4-AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia* 18: 1364–1372.
- Wichmann C, Chen L, Heinrich M, Baus D, Pfitzner E, et al. (2007) Targeting the oligomerization domain of ETO interferes with RUNX1/ETO oncogenic activity in t(8;21)-positive leukemic cells. *Cancer Res* 67: 2280–2289.
- Knauer SK, Fetz V, Rabenstein J, Friedl S, Hofmann B, et al. (2011) Bioassays to monitor taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors. *PLoS One* 6: e18253.
- Lee JT, Chen DY, Yang Z, Ramos AD, Hsieh JJ, et al. (2009) Design, syntheses, and evaluation of Taspase1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 5086–5090.
- Knauer SK, Moodt S, Berg T, Liebel U, Pepperkok R, et al. (2005) Translocation biosensors to study signal-specific nucleocytoplasmic transport, protease activity and protein-protein interactions. *Traffic* 6: 594–606.
- Bier C, Knauer SK, Docter D, Schneider G, Krämer OH, et al. (2011) The Importin-Alpha/Nucleophosmin Switch Controls Taspase1 Protease Function. *Traffic* 12: 703–714.
- Krämer OH, Knauer SK, Greiner G, Jandt E, Reichardt S, et al. (2009) A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* 23: 223–235.
- Knauer SK, Bier C, Schlag P, Fritzmeyer J, Dietmaier W, et al. (2007) The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* 6: 1502–1509.
- Knauer SK, Carra G, Stauber RH (2005) Nuclear export is evolutionarily conserved in CVC paired-like homeobox proteins and influences protein stability, transcriptional activation, and extracellular secretion. *Mol Cell Biol* 25: 2573–2582.
- Knauer SK, Bier C, Habtemichael N, Stauber RH (2006) The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Rep* 7: 1259–1265.
- Schlingemann J, Habtemichael N, Itrich C, Toedt G, Kramer H, et al. (2005) Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles. *Lab Investigation* 85: 1024–1039.

Table S2 List of plasmids used in the study. Plasmid name, encoded protein, and function are indicated. *: tag used for detection.

(PDF)

Table S3 Oligonucleotides used for PCR amplification and cloning. Oligonucleotide name and nucleotide sequence are indicated.

(PDF)

Table S4 Quantitation of Taspase1 heterocomplex formation by confocal laser scanning microscopy in living cells. HeLa cells were co-transfected with 1 μg of Tasp_{Cyt} and 1 μg of the indicated mCherry-prey expression plasmids, and analyzed 24 h later. Colocalization coefficients as an indicator of complex formation were calculated using the colocalizer pro software. Rr, Pearson's correlation coefficient; R, overlap coefficient according to Manders; k1/k2, overlap coefficients; m1/m2, colocalization coefficients. Results from a representative experiment are shown. A colocalization R-value of 0.74 for NPM1-RFP with Tasp_{Cyt} indicates 74% of colocalization.

(PDF)

Acknowledgments

We thank Sandra Friedl for excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB SK RS. Performed the experiments: CB RH LK DW DG SS. Analyzed the data: CB OK GS SK RS. Contributed reagents/materials/analysis tools: RS OK GS. Wrote the paper: CB SK RS.

29. Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, et al. (2011) Nanoparticle size is a critical physico-chemical determinant of the human blood plasma corona - A comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano* nn-2011-01950e.R1.
30. Heger P, Rosorius O, Hauber J, Stauber RH (1999) Titration of cellular export factors, but not heteromultimerization, is the molecular mechanism of transdominant HTLV-1 rex mutants. *Oncogene* 18: 4080–4090.
31. Knauer SK, Stauber RH (2005) Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells. *Anal Chem* 77: 4815–4820.
32. Stauber RH, Afonina E, Gulnik S, Erickson J, Pavlakis GN (1998) Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* 251: 38–48.
33. Landgraf P, Wahle P, Pape HC, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2008) The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and -3 and supports its neuritogenic activity. *J Biol Chem* 283: 25036–25045.

Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization *in vivo*

Carolin Bier,* Shirley K. Knauer,^{†,1} Désirée Wunsch,* Lena Kunst,[†] Sabine Scheiding,[§] Markus Kaiser,[‡] Christian Ottmann,^{||} Oliver H. Krämer[§] and Roland H. Stauber^{*,1}

*Molecular and Cellular Oncology, Mainz Screening Center, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany; [†]Institute for Molecular Biology and [‡]Institute for Chemical Biology, Center for Medical Biotechnology (ZMB), University Duisburg-Essen, Essen, Germany; [§]Institute for Biochemistry and Biophysics, Center for Molecular Biomedicine, Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany; and ^{||}Chemical Genomics Center of the Max Planck Society, Dortmund, Germany

ABSTRACT Taspase1 mediates cleavage of the mixed lineage leukemia (MLL) protein and leukemia-provoking MLL fusions and promotes solid malignancies. Currently, no effective and specific Taspase1 inhibitors are available, precluding its therapeutic exploitation. As the Taspase1 proenzyme is autoproteolytically cleaved and assumed to assemble into an active $\alpha\beta\alpha$ heterodimer, we attempted to interfere with its activity by targeting Taspase1's dimerization. Notably, enforced expression of inactive Taspase1 mutants, aiming to inhibit formation of active protease dimers, was not inhibitory. Immunoprecipitation, gel filtration, and *in vivo* protein interaction assays revealed that active Taspase1 exists predominantly as an $\alpha\beta$ monomer in living cells, providing an explanation why overexpression of inactive mutants was not *trans*-dominant. To alternatively test the biological consequences of enforced dimerization, we engineered Taspase1 variants containing the Jun/Fos dimerization motif. In absence of the respective interaction partners, the protease fusions were fully active, while enforcing dimerization by coexpression significantly inhibited processing of several target proteins in living cells. Our study provides the first evidence that Taspase1 is already active as an $\alpha\beta$ monomer, arguing against heterocomplex formation being required for its pathobiological activity. Thus, it clearly supports strategies aiming to inhibit the cancer-promoting activity of Taspase1 by the identification of chemical decoys enforcing its dimerization.—Bier, C., Knauer, S. K., Wunsch, D., Kunst, L., Scheiding, S., Kaiser, M., Ottmann, C., Krämer, O. H., Stauber, R. H. Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization *in vivo*. *FASEB J.* 26, 000–000 (2012). www.fasebj.org

Key Words: protein complex stabilizer • chemical biology • protease • dominant negative • protein interaction • threonine aspartase-1

IN ANY PHYSIOLOGICAL OR pathophysiological state, numerous proteins are being processed or degraded in a highly controlled fashion. Among several factors involved, intrinsic hydrolytic cleavage is performed exclusively by proteases, playing critical roles in innumerable biological processes (1). As protease signaling is mostly irreversible, all proteases are strictly regulated (1, 2). Consequently, protease deregulation often leads to pathophysiological states that, in principle, could be mediated by protease inhibitors or activators (1–3). Proteases are, therefore, important drug targets in the pharmaceutical industry (1, 2).

In this respect, threonine aspartase-1 (Taspase1), a protease of 420 aa, is responsible for activation and stabilization of mixed lineage leukemia (MLL) and oncogenic MLL-fusion proteins (4, 5). For example, the Fused on chromosome4 (AF4)·MLL-fusion protein contains cleavage sites for Taspase1, and proteolytic processing results in a high-molecular-weight protein complex resistant to seven in absentia homolog 1 and 2 (SIAH1/2)-mediated proteasomal degradation, driving oncogenic events (6). Taspase1 is a member of the type 2 asparaginase family of enzymes (5). All members of this family share the ability to be autocatalytically processed in *cis*, albeit Taspase1 is the only one in this family of enzymes that functions as a protease against other substrates by recognizing a conserved peptide motif ($Q^3[F,I,L,V]^2D^1 \downarrow G^1x^{2'}D^3D^4$) with an aspartate

Abbreviations: Ab, antibody; AF4, Fused on chromosome4; BFP, blue fluorescent protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; mCh, mCherry; MLL, mixed lineage leukemia; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear import signal; NPM1, nucleophosmin-1; PPI, protein-protein interaction; RFP, red fluorescent protein; SIAH, seven in absentia homolog; Taspase 1, threonine aspartase-1; TFIIA, transcription factor IIA; USF2, upstream stimulatory factor2; wt, wild type

¹ Correspondence: R.H.S., Molecular and Cellular Oncology, Mainz Screening Center, University Medical Center, Mainz, Langenbeckstr. 1, 55101 Mainz, Germany. E-mail: rstauber@uni-mainz.de; S.K.K., Institute for Molecular Biology, Center for Medical Biotechnology, University Duisburg-Essen, Universitätsstr. 5, 45117 Essen, Germany. E-mail: shirley.knauer@uni-due.de

doi: 10.1096/fj.11-202432

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

at the P¹ position (5, 7). Mutation of the catalytic nucleophile, Thr²³⁴, results in loss of *cis* activity and also completely abolishes Taspase1's catalytic activity in *trans* (5, 8). On the basis of the crystal structures of other type 2 asparaginases, as well as on the structure obtained from bacterially expressed Taspase1, it was concluded that the enzyme consists of a 4-layered $\alpha\beta\alpha$ structure, with a central, mostly antiparallel β sandwich surrounded by α helices on both faces (5, 8). Hence, the proenzyme, as well as activated Taspase1, is considered to assemble into an $\alpha\beta\alpha$ heterodimer (8). However, there is an absence of studies clearly showing that Taspase1 and other type 2 asparaginases indeed exist in their natural environment as heterodimers and that multimerization is essential for their biological activities. Prediction of Taspase1's degradome (4), together with recent experimental evidence, further implies that the protease plays a crucial role not only in leukemia but, notably, also in solid tumors (4, 5, 9). Besides MLL-fusion proteins, other nuclear and cytoplasmic regulatory proteins, such as the precursor of transcription factor IIA (TFIIA) or upstream stimulating factor 2 (USF2), are also *bona fide* Taspase1 targets (10, 11). Unfortunately, Taspase1's catalytic activity is not affected by common protease inhibitors. Currently, neither genetic nor specific and highly effective chemical inhibitors for this enzyme are available, precluding not only further dissection of Taspase1's pathobiological functions *in vivo* but also assessment of its clinical and therapeutic relevance (5, 7–9, 12).

In this respect, interfering with protein-protein interactions (PPIs) *via* enforced expression of dominant-negative mutants and/or application of small molecules has emerged as a promising, though challenging, strategy for human therapeutics (13–15). Recently, we also showed that it is, in principle, possible to specifically inhibit and to destroy the AF4·MLL oncoprotein by genetic PPI inhibitors (6). Although most efforts have focused on the inhibition of protein interactions, stabilization of PPIs is currently considered an alternative approach to targeting disease-relevant signaling pathways (16, 17).

Here, our results not only indicate for the first time that Taspase1 is already active as an $\alpha\beta$ monomer but also that enforcing dimerization is applicable as a strategy to allosterically inhibit the pathobiological activity of proteases in general.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies (Abs), reagents, and compounds

Antibodies used were anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (α -GapDH; sc-47724; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-green fluorescent protein (α -GFP; sc-8334; Santa Cruz Biotechnology), anti-glutathione S-transferase (α -GST; sc-57753; Santa Cruz Biotechnology), anti-nucleophosmin-1 (α -NPM1; no. 3542; Cell Signaling, Beverly, MA, USA); α -Taspase1_C (directed against the C terminus/ β subunit, AP1330b; BioCat, Heidelberg, Germany), α -Taspase1_N (di-

rected against the N terminus/ α subunit, sc-85945; Santa Cruz Biotechnology). Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were used.

Plasmids

The Taspase1 biosensor expression plasmids were derived from the vector pNLS-GFP/GST-CS3-RevNES (pCasp3-Clev), encoding a fusion composed of the SV40 large T-antigen NLS, GST, GFP, and the caspase 3 cleavage site (CS3) (18). In p_{NLS-GFP/GST-AF4·MLL_S1-NES_{Rev}} (p_{BioTasp1}) and p_{NLS-GFP/GST-AF4·MLL_S2-NES_{Rev}} (p_{BioTasp2}), CS3 was replaced by the Taspase1 cleavage site from MLL (S1, first cleavage site: ²⁶⁶¹AEGQVDGADD²⁶⁷⁰; S2, second cleavage site: ²⁷¹³KISQLDGVDD²⁷²²) or mutated cleavage site versions, in which P1 and P1' were exchanged by alanine (S1_{mut}: ²⁶⁶¹AEGQVAAADD²⁶⁷⁰; S2_{mut}: ²⁷¹³KISQLAAVDD²⁷²²). In addition, a GSGS linker following the cleavage site, as well as a Myc-epitope-tagged NES from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein (NES_{Rev}), were inserted. Plasmids used to define the optimal linker sequence contain the sequences ²⁷¹⁶QLDGVDD²⁷²², GSGS²⁷¹⁶QLDGVDD²⁷²², or ²⁷¹⁶KISQLDGVDD²⁷²²G and were established likewise.

Expression constructs encoding untagged Taspase1 (Tasp), cytoplasmic Tasp_{cyt}, and NPM1 or as fusions with GFP, blue fluorescent protein (BFP), or the red autofluorescent protein mCherry were described previously (4, 7). Dimerization plasmids p_{Tasp-Jun-GFP/-mCherry} and p_{Tasp-Fos-GFP/-mCherry} were generated by amplification of the respective dimerization domains of Jun or Fos, which were inserted into p_{Tasp-GFP} using *NheI* restriction sites. Plasmids p_{GFP-Tasp_{cyt}-Jun} and p_{GFP-Tasp_{cyt}-Fos} were generated equally by insertion of the dimerization domains into p_{GFP-Tasp_{cyt}} using *XhoI* restriction sites. Plasmids p_{Tasp^{T234V}} and Tasp^{D233A}-GFP/-mCherry were generated by splice overlap extension polymerase chain reaction, as reported previously (7). RevM10BL-RFP was generated by exchange of BFP by red fluorescent protein (RFP) of RevM10BL-BFP (4) using *NheI* and *EcoRI* restriction sites. pF143 and pBluescript (BSK) were described previously (19). Plasmids are listed in Supplemental Table S1.

Cells, transfection, and microscopy

Suspension leukemic and adherent epithelial cancer cell lines used in the study include the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line, FaDu; the human cervical carcinoma cell line, HeLa; human embryonic kidney HEK293 cells; the human colon carcinoma cell lines RKO and SW-480, as well as the leukemic cell lines MV4, 11, THP-1, and K562; these cell lines were maintained and transfected as described previously (4, 6, 20). Observation and image analysis of living or fixed cells were performed using a digital AxioCam CCD camera (Carl Zeiss, Jena, Germany) as described previously (7, 21). Automated high content analysis was performed in triplicate in black-walled 96-well thin-bottom Greiner μ clear plates (Greiner, Frickenhausen, Germany), employing the molecular translocation algorithm on the Cellomics Array-Scan VTI Imaging Platform (Thermo Fisher Scientific, Reading, UK) as described previously (7). Briefly, the total cellular BFP, GFP, or mCherry signal was measured by calculating the integrated pixel intensity in the imaged cell multiplied by the area of the cell. The nuclear signal was similarly obtained by measuring the pixel intensity in the nucleus. Nuclei were marked by Hoechst 33258 staining, as described previously (7, 21). Scans were performed sequentially with settings to give subsaturating fluorescence intensity, and a minimum of 500 valid objects/well were recorded. To determine the average

intracellular protein localization, cells from 3 separate images were examined in 3 independent experiments, and representative images are shown. The number of cells exhibiting cytoplasmic (C; cytoplasmic signal >80% of the total cellular signal), cytoplasmic and nuclear (C/N), or nuclear (N; nuclear signal >80% of the total cellular signal) fluorescence was counted. Criteria for efficient *in vivo* protein interaction using the protein interaction assay were that in >80% of 200 mCherry- and GFP-positive cells, mCherry and GFP colocalized at the nucleolus. Colocalization was further quantitated by confocal laser scanning microscopy using the Manders overlap coefficient colocalization algorithm, as described previously (21, 22). R represents the calculated overlap coefficient; S_1 and S_2 , the measured signal in the two channels and in a specific pixel of the taken image. Therefore, the calculated R values indicate an overlap of the signals, and thus represent the true degree of colocalization.

Protein extraction and immunoblot analysis

Preparation of whole-cell lysates and immunoblotting were carried out as described previously (4). Equal loading of lysates was controlled by reprobing blots for GAPDH, as described previously (7, 23).

Immunoprecipitation (IP)

IP of GFP-tagged proteins was performed using α -GFP magnetic beads and μ -MACS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to the manufacturer's recommendation (7, 24). Briefly, whole-cell lysates were incubated with 50 μ l α -GFP magnetic beads for 30 min on ice. μ -MACS columns were placed into the magnetic field and equilibrated with 200 μ l lysis buffer. Lysates with magnetic beads were applied onto the columns, then washed 4 times with 200 μ l of lysis buffer and once with 100 μ l of wash buffer 2. After complete flowthrough, 20 μ l of preheated elution buffer was applied onto each column and incubated for 5 min. To complete protein elution, 50 μ l of preheated elution buffer was applied. A 30- μ l sample of the eluate and 3% of input were analyzed as outlined previously (4, 25).

Gel filtration chromatography

Leukemic MV4;11 or lung cancer A549 cells were harvested by centrifugation at 350 g and 4°C for 5 min, washed with ice-cold PBS, and lysed by the addition of NETN buffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 8; 10% glycerol; 1 mM EDTA; 0.5% v/v Nonidet P-40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; and 1-fold complete protease inhibitor; Roche, Mannheim, Germany), as described previously (4). After sonication, lysates were centrifuged (14,000 rpm, 4°C, 30 min), and supernatant was filtered (microcentrifuge-filtered tubes 0.2 μ m; Laborservice Onken, Gründau, Germany) prior to gel filtration chromatography. The extracts were fractionated using size-exclusion chromatography with Superose-6 10/300 GL columns (GE Healthcare FPLC system, optimal separation range from 3 MDa to 5 kDa; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). For system calibration, purified aprotinin (6.5 kDa), ribonuclease A (13.7 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and ovalbumin (44 kDa) were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) and used as standards. Loading and elution of the FPLC system was carried out in 50 mM phosphate with 0.15 M NaCl pH 7. 500 μ l fractions were collected and stored at -70°C until analyzed by SDS-PAGE as described previously (26).

Statistical analysis

For experiments stating P values, a paired Student's t test was performed (4). Unless stated otherwise, P values represent data obtained from 3 independent experiments done in triplicate. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Genetic inhibition of Taspase1's activity by inactive mutants

Processing of the AF4-MLL-fusion protein by Taspase1 is an accepted pathophysiologically relevant process (6). However, as the AF4-MLL fusion is also a substrate for the E3-ubiquitin ligases SIAH1/2, its steady-state level is low, hampering its detection and experimental analysis (6). As biochemical data and *in vitro* interference strategies must be effective at the cellular level, we used a 2-component cell-based assay, which allowed us to monitor and manipulate the Taspase1/AF4-MLL axis (Supplemental Fig. S1A). We engineered indicator proteins harboring the individual AF4-MLL cleavage sites, BioTasp1 (²⁶⁶¹AEGQVDGADD²⁶⁷⁰) and BioTasp2 (²⁷¹³KISQLDGVD²⁷²²). Sequences were inserted into a backbone composed of GST, GFP, a N-terminal nuclear import signal (NLS), and a C-terminal nuclear export signal (NES) (Supplemental Fig. S1B, C). The fusion proteins localize predominantly to the cytoplasm, whereas Taspase1-mediated cleavage liberates the NES, triggering nuclear accumulation of the autofluorescent protein. Notably, the addition of a specific linker sequence (KISQLDGVDGSGS, linker sequence underlined) was crucial for the optimal performance of the indicator proteins (data not shown). Whereas ectopic expression of active Taspase1 promoted cleavage and complete nuclear accumulation of the indicator proteins, coexpression of catalytically inactive Taspase1 mutants, in which the catalytic nucleophile, Thr²³⁴, was changed into Val (Tasp^{T234V}) (or Asp²³³), was mutated into Ala (Tasp^{D233A}) did not result in effective cleavage and nuclear translocation (Fig. 1A and data not shown). Compared to the wild-type (wt) enzyme, the inactive protease mutants showed a similarly nuclear but not nucleolar localization (Fig. 2B and Supplemental Fig. S2D).

Next, we employed our assay to study the functional consequences of overexpressing inactive Taspase1 mutants. Assuming a heterodimerization model, overexpression of the mutants should result in the formation of inactive heterodimers and thus, have a strong dominant-negative effect on the *cis*- and *trans*-cleavage activity of wt Taspase1 (Supplemental Fig. S2A–C). Interestingly, our assay demonstrated that even cotransfection of a 9-fold excess of the inactive mutants to wt Taspase1 expression plasmid did not affect Taspase1's processing of AF4-MLL (Fig. 1B–D). To formally exclude the possibility that these observations were restricted to the AF4-MLL protein, these results were also confirmed for the *bona fide* Taspase1 targets TFIIA and USF2 (data not shown).

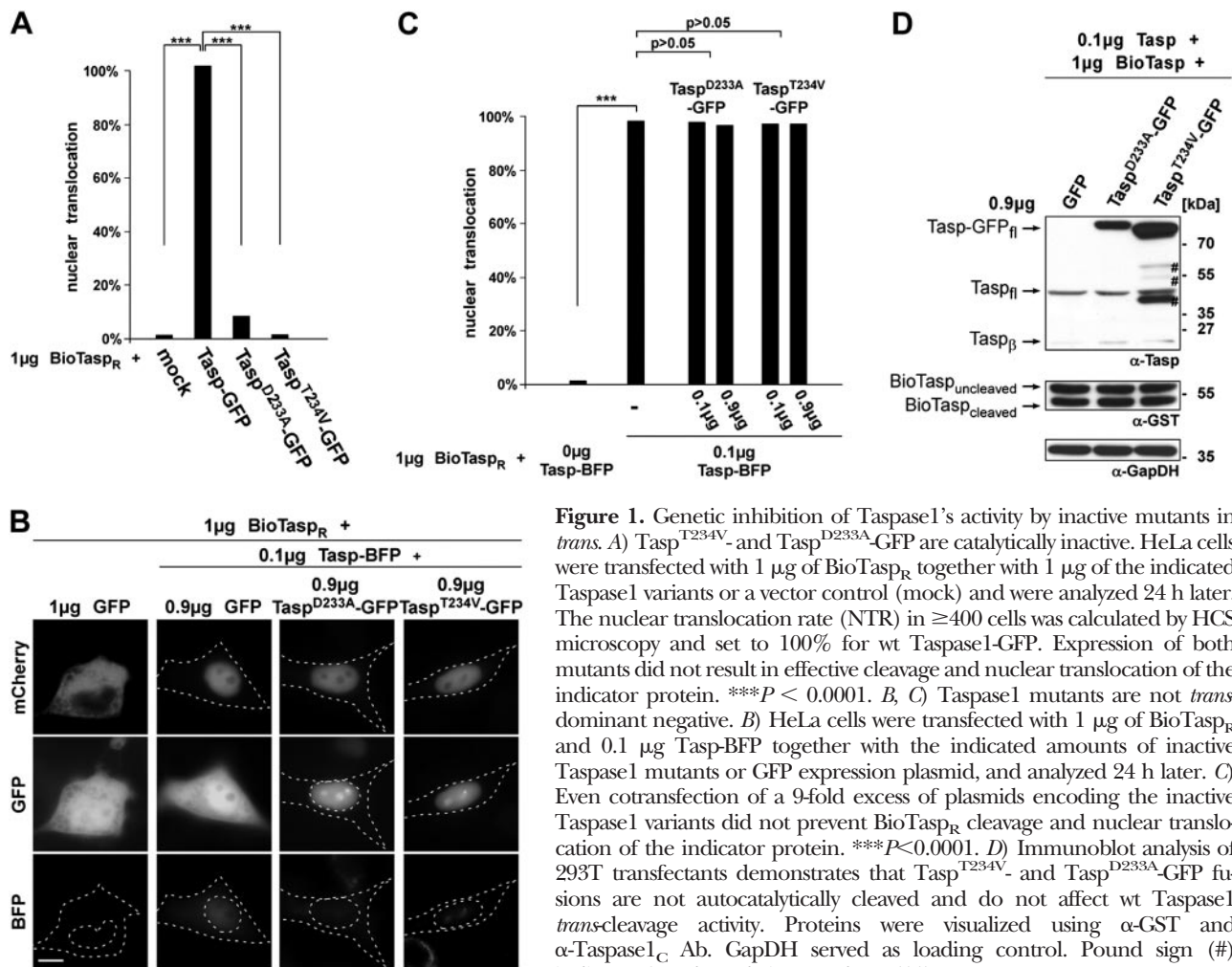


Figure 1. Genetic inhibition of Taspase1's activity by inactive mutants in *trans*. **A**) Tasp^{T234V}- and Tasp^{D233A}-GFP are catalytically inactive. HeLa cells were transfected with 1 µg of BioTasp_R together with 1 µg of the indicated Taspase1 variants or a vector control (mock) and were analyzed 24 h later. The nuclear translocation rate (NTR) in ≥400 cells was calculated by HCS microscopy and set to 100% for wt Taspase1-GFP. Expression of both mutants did not result in effective cleavage and nuclear translocation of the indicator protein. ****P* < 0.0001. **B, C**) Taspase1 mutants are not *trans*-dominant negative. **B**) HeLa cells were transfected with 1 µg of BioTasp_R and 0.1 µg Tasp-BFP together with the indicated amounts of inactive Taspase1 mutants or GFP expression plasmid, and analyzed 24 h later. **C**) Even cotransfection of a 9-fold excess of plasmids encoding the inactive Taspase1 variants did not prevent BioTasp_R cleavage and nuclear translocation of the indicator protein. ****P* < 0.0001. **D**) Immunoblot analysis of 293T transfectants demonstrates that Tasp^{T234V}- and Tasp^{D233A}-GFP fusions are not autocatalytically cleaved and do not affect wt Taspase1 *trans*-cleavage activity. Proteins were visualized using α-GST and α-Taspase1_C Ab. GapDH served as loading control. Pound sign (#) indicates GFP-degradation products (11).

Taspase1 is active as an αβ-monomer in living cells

In general, inhibition of the biological activity of protein complexes *via* enforced expression of *trans*-dominant negative mutants critically depends on efficient heterocomplex formation. Hence, inefficient heterodimerization appears to be the mechanism that explains why inactive Taspase1 variants fail to inhibit wt Taspase1's activity in *trans*. To experimentally test this hypothesis, we analyzed Taspase1 heteromultimerization by independent approaches. First, we used a modified dual-color protein interaction assay that has been successfully employed in several studies to assess efficient protein complex formation in living cells, including the leukemia relevant MLL-FYRN and MLL-FYRC proteins (6, 27). GFP-tagged Taspase1 was engineered to localize predominantly to the cytoplasm by the C-terminal fusion of a strong NES (GFP-Tasp_{Cyt}; Fig. 2A). Because of the protease's intrinsic NLS (4), GFP-Tasp_{Cyt} is continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm (Fig. 2A, B and Supplemental Fig. S2D). In contrast, red fluorescent Taspase1 (Tasp-mCherry/mCh prey) localizes to the nucleus or nucleolus (Fig. 2A, B and Supplemental Fig. S2D). On coexpression and efficient heterocomplex formation, the GFP-tagged Tasp_{Cyt} bait is expected to translocate and

colocalize with the Tasp-mCherry prey at the nucleus or nucleolus. Therefore, nuclear translocation serves as a reliable indicator for efficient protein-protein interaction for Taspase1 in living cells (Fig. 2A). Coexpression of the positive control, NPM1-RFP, significantly triggered nuclear/nucleolar translocation of GFP-Tasp_{Cyt}, whereas coexpression of the noninteracting nucleolar RevM10BL-RFP protein (negative control) showed no effect (Supplemental Fig. S2E), confirming the assay's specificity. However, as shown in Fig. 2B, neither coexpression of wt nor inactive Taspase1 variants resulted in strong nuclear/nucleolar translocation of GFP-Tasp_{Cyt}, indicative of only weak heterocomplex formation. Colocalization was further quantitated by confocal laser scanning microscopy, revealing colocalization *R* values of 0.74 for the positive control, NPM1-RFP; 0.19 for RevM10BL-RFP; and 0.38-0.39 for wt and Taspase1 mutants. Hence, although wt or mutant Taspase1 variants are able to form heterocomplexes, these complexes are rather weak.

Second, we examined Taspase1 multimerization by biochemical assays. Employing ectopically expressed untagged Taspase1 and GFP fusions of the Taspase1 variants, coimmunoprecipitation confirmed the results from the cell-based assays. Using an Ab recognizing the C-terminal

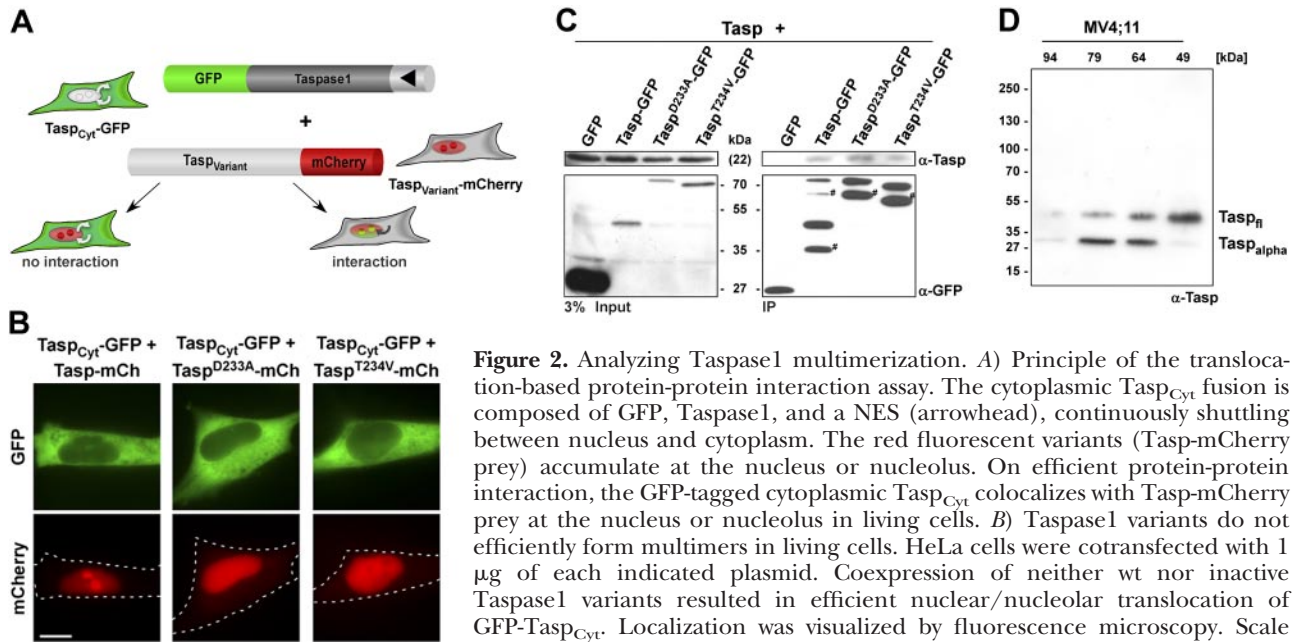


Figure 2. Analyzing Taspase1 multimerization. *A*) Principle of the translocation-based protein-protein interaction assay. The cytoplasmic Tasp_{Cyt} fusion is composed of GFP, Taspase1, and a NES (arrowhead), continuously shuttling between nucleus and cytoplasm. The red fluorescent variants (Tasp-mCherry prey) accumulate at the nucleus or nucleolus. On efficient protein-protein interaction, the GFP-tagged cytoplasmic Tasp_{Cyt} colocalizes with Tasp-mCherry prey at the nucleus or nucleolus in living cells. *B*) Taspase1 variants do not efficiently form multimers in living cells. HeLa cells were cotransfected with 1 μg of each indicated plasmid. Coexpression of neither wt nor inactive Taspase1 variants resulted in efficient nuclear/nucleolar translocation of GFP-Tasp_{Cyt}. Localization was visualized by fluorescence microscopy. Scale bar = 10 μm. *C*) Coimmunoprecipitation (IP) demonstrates only weak heterocomplex formation of Taspase1 variants. IPs of 293T cell extracts coexpressing the indicated proteins were carried out using α-GFP Ab-coated magnetic beads and μ-MACS columns. Precipitated proteins were identified by immunoblot using the indicated antibodies α-Taspase_C and α-GFP. Input: total amount of cell lysate. IP, immunoprecipitated proteins. *D*) Endogenous Taspase1 is present as an αβ monomer. Cell lysates isolated under native conditions from MV4;11 human leukemia cells were separated by gel filtration chromatography and resolved by 1D-SDS-PAGE. Endogenous Taspase1 was visualized in the FPLC fractions (49–94 kDa) by immunoblot using α-Taspase1_N Ab.

β subunit, α-Taspase1_N, allowed us to unambiguously distinguish between column-bound Taspase1-GFP fusions and interacting Taspase1. Detection of the untagged Taspase1 β subunit (molecular weight 22 kDa) demonstrated that Taspase1 has only a weak tendency to form heterocomplexes (Fig. 2C). In contrast, efficient complex formation was previously shown by coimmunoprecipitation experiments for the *bona fide* Taspase1 interaction partners NPM1 and importin α (11).

In addition, to underline the relevance of our results also for the endogenous protein, we used MV4;11 human leukemia cells. These cells were isolated from a patient containing a *t*(4;11) translocation and thus expressed the AF4-MLL fusion protein, which is processed by endogenous Taspase1. Employing gel filtration chromatography of cell lysates isolated under native conditions, we also found that endogenous Taspase1 is present predominantly as an αβ monomer (Fig. 2D). Of note, as endogenous Taspase1 levels are low and are additionally diluted in the gel filtration fractions, it was necessary to employ an antibody allowing the sensitive detection of Taspase1. As control experiments showed that the Ab α-Taspase1_N (directed against the Taspase1 N terminus/α subunit) allowed a more sensitive detection of full-length Taspase1 and the α-Taspase1 subunit compared to the Ab α-Taspase1_C (directed against the Taspase1 C terminus/β subunit), the Ab α-Taspase1_N was used in the experiment. Similar results were obtained for the epithelial human lung cancer cell line A549 (data not shown).

Enforced dimerization of Taspase1 inhibits its proteolytic activity

Collectively, cell-based as well as biochemical evidence favors a model in which Taspase1 seems active already as an αβ monomer. However, this would imply that targeting Taspase1 heteromultimerization by genetic or chemical decoys is unlikely to interfere with its pathological activity. Besides the inhibition of protein interactions, chemically or genetically induced stabilization of protein complexes is currently considered an attractive approach to also target disease-relevant pathways (16). As an alternative strategy, we next investigated the biological consequences of enforced dimerization on Taspase1's activity.

Given that chemical inducers of Taspase1 dimerization remain to be identified, we employed a genetic approach. On the basis of our previous work (28), we exploited the well-characterized Jun/Fos protein dimerization motifs of the *jun proto-oncogene* (Jun, aa 221–331) and the *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue* (Fos, aa 118–209), and fused them to wt and cytoplasmic Taspase1. On ectopic expression in HeLa or other solid and leukemic cell lines, Tasp-Fos-mCh and Tasp-Fos-GFP were nuclear or nucleolar, whereas GFP-Tasp_{Cyt}-Jun localized predominantly to the cytoplasm (Fig. 3A, Supplemental Fig. S3A and data not shown). We subsequently used our cell-based protein interaction assay to demonstrate specific Jun/Fos-mediated dimerization of the Taspase1 fusions (Fig. 3B, Supplemental Fig. S3B). As expected, only coexpress-

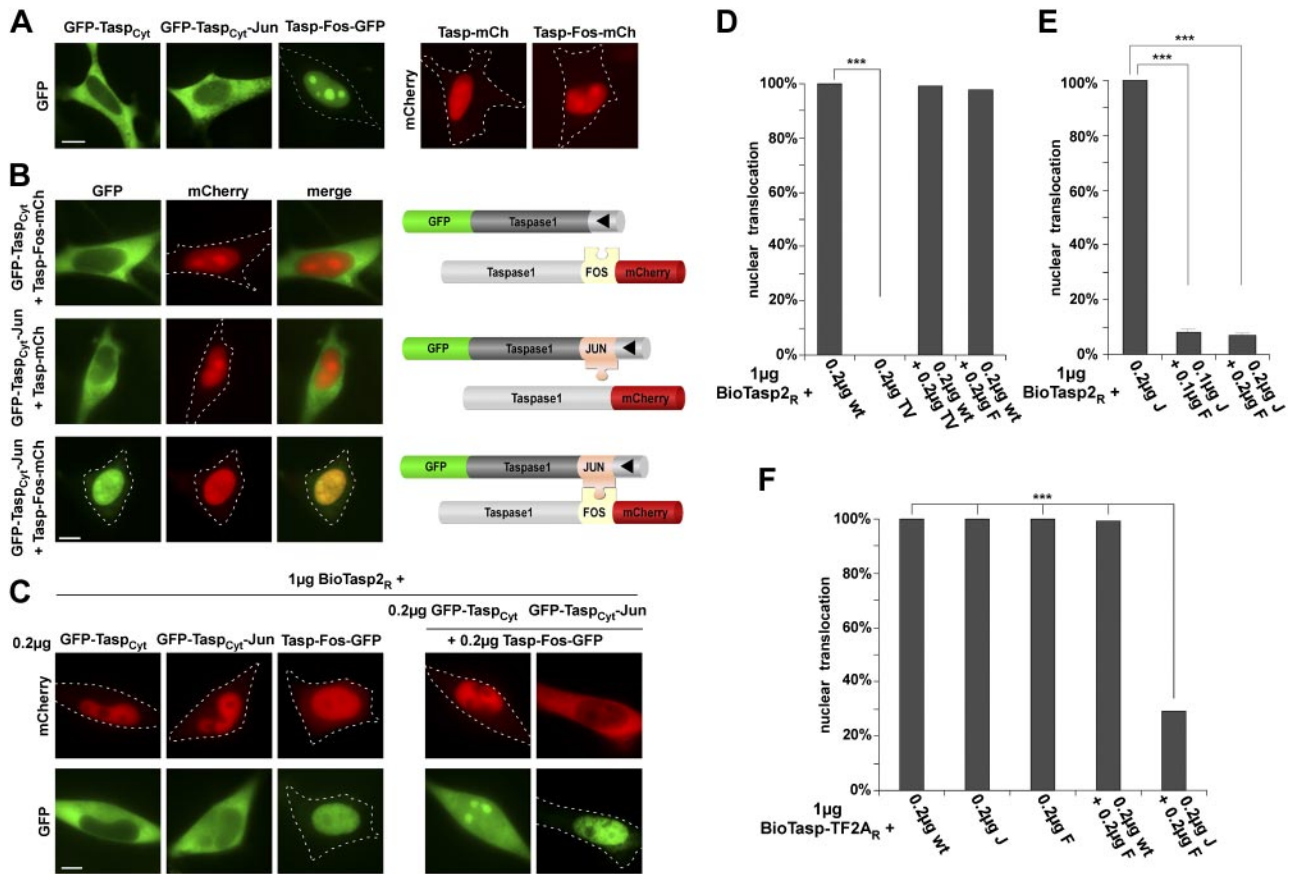


Figure 3. Enforced dimerization of Taspase1 inhibits its proteolytic activity. *A*) Localization of Jun- and Fos-containing Taspase1 fusion proteins in HeLa transfectants and were analyzed 24 h later by fluorescence microscopy. GFP-Tasp_{Cyt} and GFP-Tasp_{Cyt}-Jun fusions localize predominantly to the cytoplasm, whereas Tasp-Fos-mCh or -GFP fusions, as well as Tasp-Jun-mCh, are nuclear or nucleolar. Scale bars = 10 μ m. *B*) Jun/Fos-mediated dimerization of Taspase1. Only coexpression of GFP-Tasp_{Cyt}-Jun with Tasp-Fos-mCh leads to complex formation and nuclear translocation of the cytoplasmic GFP-Tasp_{Cyt}-Jun fusion protein (bottom panel). *C–F*) Dimerization inhibits Taspase1 *trans*-cleavage activity of the biosensor. HeLa cells were cotransfected with the indicated GFP-Taspase1 expression plasmids (0.2 or 0.1 μ g each, as indicated) together with 1 μ g of red fluorescent BioTasp_R, and analyzed 24 h later. *C*) Cleavage-induced nuclear translocation of BioTasp_R confirmed that GFP-Tasp_{Cyt} (wt), as well as GFP-Tasp_{Cyt}-Jun or Tasp-Fos-GFP, was fully active. Enforcing dimerization by coexpression of GFP-Tasp_{Cyt}-Jun with Tasp-Fos-GFP inhibited their proteolytic activity, whereas no effect was evident on coexpression of GFP-Tasp_{Cyt} with Tasp-Fos-GFP. *D–F*) Cleavage-induced nuclear translocation rate in cells transfected with the indicated plasmids was quantitated was calculated by HCS microscopy in 400 BioTasp_R-positive cells, and set to 100% for GFP-Tasp_{Cyt} (wt; panels *D*, *E*) or GFP-Tasp_{Cyt}-Jun (J; panel *F*). Whereas coexpression of the inactive variant Tasp^{T234V}-GFP (TV) or Tasp-Fos-GFP (F) showed no inhibitory effect in *trans* (*D*), enforcing dimerization resulted in significant inhibition of cleavage for indicator proteins containing the AF4·MLL (*D*, *E*) or the TFIIA cleavage site (*F*). ****P* < 0.0001.

sion of Jun- and Fos-containing Taspase1 fusion proteins resulted in their nuclear translocation, indicative of efficient dimerization. In contrast, the localization of Taspase1 variants was not affected by the presence of either Jun- or Fos-Taspase1 fusions. These results were confirmed by coimmunoprecipitation analysis (data not shown). Notably, the Jun- and Fos-Taspase1 fusions were fully proteolytically active, as confirmed by effective cleavage of the red fluorescent biosensor protein, BioTasp_{2R} (Fig. 3*C*, *E*, *F*).

Having established an *in vivo* system allowing the specific induction of Taspase1's dimerization, we next tested the effect of enforced dimerization on the biological activity of the enzyme. As shown in Fig. 3*C–F*, cleavage and nuclear translocation of red fluorescent indicator proteins containing the AF4·MLL (Fig. 3*C–E*)

or TFIIA (Fig. 3*F*) cleavage site were significantly impaired on dimerization. No inhibitory effect was evident when Jun or Fos fusions were coexpressed in the absence of the respective interaction partner. Inhibition of Taspase1's proteolytic activity could be reproduced in several solid tumors, as well as leukemia cell lines, and confirmed for the full-length TFIIA protein substrate (data not shown).

DISCUSSION

Besides their numerous physiological functions, protease deregulation often contributes to disease development and treatment failure that could be prevented or ameliorated by protease-specific inhibitors or activa-

tors (1–3). Most protease inhibitors on the market act at the active sites of proteases, and several of them have indeed achieved blockbuster status (3). In this respect, small-molecule-based modulation of PPIs has also gained increasing interest (1, 3). Recent advances toward the understanding of cancer system biology inspired the consideration of cancer-related PPI networks as potential therapeutic targets (14, 15, 29). Although the identification of potent low-molecular-weight PPI inhibitors, such as the Nutlins or ABT-737, has led to a revision of the long-standing perception of PPIs as “undruggable,” the development of suitable small-molecule PPI modulators remains a challenge (30). Yet, our advances in understanding how proteins engage and communicate with each other offer novel opportunities to elucidate and target the molecular basis of complex diseases, including cancer (31).

The pathobiological activity of the Taspase1 degrado- me is also regulated by protein interaction networks (4, 32). This is exemplified by AF4-MLL, a fusion protein relevant for the development of acute myeloid leukemia (6). Once processed by Taspase1, the two resulting protein fragments, AF4-MLL.N and MLL.C, heterodimerize and form a complex resistant to degradation, which ultimately contributes to disease (6).

On the basis of the structure obtained from bacterially expressed Taspase1, it was concluded that Taspase1 assembles into a $\alpha\beta\beta\alpha$ heterodimer, representing the biologically active protease. Thus, it was accepted that the enzyme consists of a 4-layered $\alpha\beta\beta\alpha$ structure, with a central, mostly antiparallel β sandwich that is surrounded by α helices on both faces (5, 8). Assuming that inactive Taspase1 variants are capable of interacting efficiently with the wt enzyme, such a heterodimerization model implies that overexpression of inactive Taspase1 mutants would strongly shift the equilibrium toward the formation of catalytically impaired heterodimers, and thus have a strong dominant-negative effect.

As biochemical data and *in vitro* interference strategies need be effective at the cellular level, we examined such an approach by functional probing of Taspase1 multimerization in living cells. Our results suggest that Taspase1 is active already as an $\alpha\beta$ monomer (Fig. 4), suggesting that a complex equilibrium between Taspase1 dimers and active $\alpha\beta$ monomers exists *in vivo*. This conclusion is supported by several lines of experimental evidence. First, even a 9-fold overexpression of inactive Taspase1 variants affected neither *cis*- nor *trans*-cleavage activity of Taspase1. Second, *in vivo* protein interaction, as well as biochemical assays, confirmed that Taspase1 has only a weak tendency to form heterocomplexes. Third, even the endogenous protein was detectable predominantly as an $\alpha\beta$ monomer in leukemic and solid cancer cells. Notably, our results do not exclude the possibility that processed as well as the unprocessed Taspase1 enzyme can also assemble into heterocomplexes (8). According to our data, these complexes appear to be rather weak, particularly when compared to the *bona fide* Taspase1 interaction partners, such as NPM1 or importin α (4). Blocking the

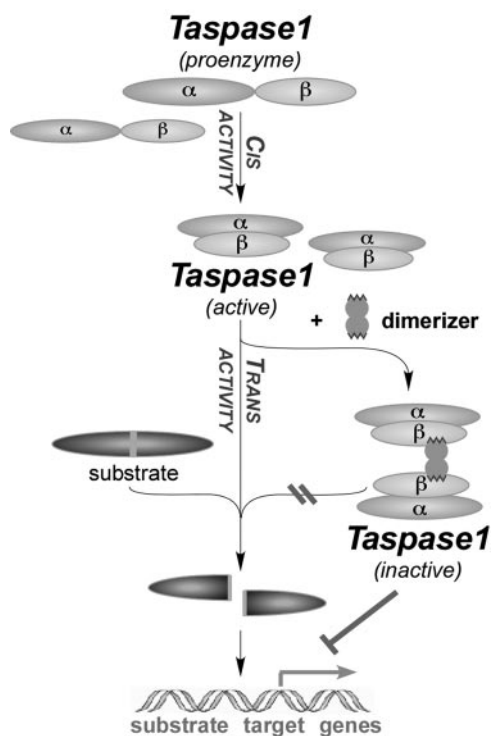


Figure 4. Model illustrating allosteric inhibition of Taspase1 by chemical-enforced dimerization. The Taspase1 $_{\alpha\beta}$ proenzyme is autoproteolytically cleaved (*cis* activity), forming an active Taspase1 $_{\alpha\beta}$ monomer. The active protease cleaves pathobiologically relevant substrates (*trans* activity), thereby modulating genetic programs. Enforced multimerization by the application of specific (chemical) Taspase1 dimerizers interferes with its proteolytic activity, precluding the activation of downstream pathophysiological pathways.

biological activity of protein complexes *via* enforced expression of *trans*-dominant negative mutants or PPI inhibitors critically depends on efficient heterocomplex formation. Thus, it is conceivable to speculate that it will be unlikely to inhibit Taspase1 by strategies attempting to interfere with its heterodimer formation.

This $\alpha\beta\beta\alpha$ -heterodimer model was mainly based on the crystal structures of other type 2 asparaginases, as well as on the structure obtained from bacterially expressed Taspase1 (8). Thus, it was concluded that the enzymes consist of a 4-layered $\alpha\beta\beta\alpha$ structure, with a central, mostly antiparallel β sandwich that is surrounded by α helices on both faces (5, 8). In contrast to the *in vivo* situation, expression of Taspase1 or Taspase1-GFP in bacteria revealed extensive protein aggregation (7, 8). Hence, bacterially expressed Taspase1 has a stronger tendency to heteromultimerize, which may facilitate formation of the $\alpha\beta\beta\alpha$ heterodimer, particularly as high-protein concentrations are required during X-ray crystallography. Indeed, asymmetric dimerization is known as a fairly common crystallization artifact. Although the structure resolved by Khan *et al.* (8) certainly provided important insights into Taspase1 function, some limitations may exist. For example, the position of critical functional domains, such as the bipartite NLS, can't be deduced from the current computational model of Taspase1, as

these residues are disordered (8, 11). Also, the structure of the $\alpha\beta\alpha$ heterodimer was obtained by cocrystallizing the isolated subunits rather than the autoproteolytically processed zymogen.

As an alternative targeting strategy, we thus explored the biological consequences of enforced dimerization on Taspase1's activity. It was shown for other protein complexes that PPI stabilization instead of inhibition should also be considered as a rationale to block disease-relevant signaling pathways (16, 33–35). The most prominent and already clinically relevant examples are the immunosuppressive macrolide rapamycin, which links the receptor protein FKBP12 with mTOR (36), or brefeldin A, stabilizing the ternary complex formed between Arf-GDP and its guanine nucleotide exchange factor (37).

To circumvent the limitation that chemical Taspase1 dimerizers remain to be identified, we exploited the well-characterized Jun/Fos protein interaction motifs to genetically enforce Taspase1 dimerization. Whereas the Jun- and Fos-Taspase1 fusions alone were proteolytically fully active in living cells, dimer formation by coexpression of the Jun- and the Fos-Taspase1 partners significantly impaired their *trans*-cleavage activity. Although inhibition was not confirmed for all predicted Taspase1 substrates (4), it is conceivable to speculate that this inhibitory effect is not restricted to certain Taspase1 targets. Notably, these results further support our monomer model. Assuming that Taspase1 is active exclusively as a dimer, enforced dimerization should have no inhibitory effect, in contrast to our experimental evidence. Currently, the structure-function relationship explaining on a molecular level why the enforced Taspase1 dimers are catalytically inactive is not resolved. Possible mechanisms include an inability of the Taspase1 dimers to specifically recognize and/or productively cleave their target sequence caused by sterical hindrance, and/or restriction of intra- and/or intermolecular conformational changes required for enzyme activity (38–41).

Although we provide here the first evidence that stabilization of Taspase1 dimers by allosteric modulators seems a promising strategy for targeting this protease, we are aware of the limitations of our study. The employed Jun/Fos protein interaction motifs represent relatively large high-affinity interaction interfaces. Whether such an efficient dimerization can also be achieved by proteinaceous or small-molecule Taspase1 dimerizers remains to be proven. Admittedly, allosteric modulators represent an attractive alternative for the design and synthesis of small-molecule activators and inhibitors of proteases and are, therefore, of wide interest for medicinal chemistry (16, 41). The structural bases of some allosteric protease regulators have been elucidated, indicating general mechanisms that might also be exploitable for the rational design of such molecules for Taspase1. Besides *in silico* testing, experimental approaches need to include screening of compound libraries obtained by rational diversity-oriented or biology-oriented synthesis to identify not only active site inhibitors of Taspase1 (7, 12) but also inactivating dimerizers (16). Still, the identification of biologically

active Taspase1 dimerizers remains a formidable challenge, as the fos-jun forced dimerization system is not applicable to inhibit the activity of endogenous Taspase1. Acknowledging that currently neither genetic nor highly specific chemical inhibitors for this pathobiologically relevant enzyme are available clearly justifies the need to pursue such a strategy. In addition, RNAi-mediated knockdown of Taspase1 preferentially by nanomaterial-based delivery systems could be investigated (26). Following submission of our report, Chen *et al.* (12) suggested 4-[(4-arsenophenyl)methyl]phenyl arsonic acid (NSC48300) as an effective Taspase1 inhibitor. However, although NSC48300 inhibited the growth of breast and brain tumors in murine models, it has not yet been fully resolved whether this activity is causally based on the inhibition of Taspase1 alone. Besides NSC48300's reported growth inhibition of numerous tumor cell lines, the compound interfered with cell migration and invasion (42) and was patented as an antiangiogenic compound (43). Hence, future work needs to define the molecular mechanism responsible for NSC48300 inhibition of Taspase1 and whether Taspase1-independent effects of NSC48300 may contribute to its antitumoral activity (44).

In summary, our results not only indicate for the first time that Taspase1 is active already as an $\alpha\beta$ monomer but also that enforcing dimerization may be applicable as a alternative strategy to allosterically inhibit the pathobiological activity of proteases in general. **FJ**

The authors thank Sandra Friedl for excellent technical assistance. This study was supported by grants from German Cancer Aid (FKZ102362), the Fritz Thyssen Foundation, the Head and Neck Cancer Foundation, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG INST371/5-1FUGG), and the Inneruniversität and MAIFOR Mainz Support Program. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799
2. Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., and Ehrmann, M. (2011) HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev.* **12**, 152–162
3. Drag, M., and Salvesen, G. S. (2011) Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701
4. Bier, C., Knauer, S. K., Klapthor, A., Schweitzer, A., Reik, A., Kramer, O. H., Marschalek, R., and Stauber, R. H. (2011) Cell-based analysis of structure-function activity of threonine aspartase 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 3007–3017
5. Hsieh, J. J., Cheng, E. H., and Korsmeyer, S. J. (2003) Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**, 293–303
6. Pless, B., Oehm, C., Knauer, S., Stauber, R. H., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2011) The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* **25**, 663–670
7. Knauer, S. K., Fetz, V., Rabenstein, J., Friedl, S., Hofmann, B., Sabiani, S., Schröder, E., Kunst, L., Proschak, E., Thines, E., Kindler, T., Schneider, G., Marschalek, R., Stauber, R. H., and Bier, C. (2011) Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors. *PLoS One* **6**, e18253

8. 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
9. Chen, D. Y., Liu, H., Takeda, S., Tu, H. C., Sasagawa, S., Van Tine, B. A., Lu, D., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2011) Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res.* **70**, 5358–5367
10. Zhou, H., Spicuglia, S., Hsieh, J. J., Mitsiou, D. J., Hoiy, T., Veenstra, G. J., Korsmeyer, S. J., and Stunnenberg, H. G. (2006) Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2728–2735
11. Bier, C., Knauer, S. K., Docter, D., Schneider, G., Kramer, O. H., and Stauber, R. H. (2011) The importin- α /nucleophosmin switch controls Taspase1 protease function. *Traffic* **12**, 703–714
12. Chen, D. Y., Lee, Y., Van Tine, B. A., Searleman, A. C., Westergard, T. D., Liu, H., Tu, H. C., Takeda, S., Dong, Y., Piwnica-Worms, D. R., Oh, K. J., Korsmeyer, S. J., Hermone, A., Gussio, R., Shoemaker, R. H., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2011) A pharmacologic inhibitor of the protease Taspase1 effectively inhibits breast and brain tumor growth. *Cancer Res.* **72**, 736–746
13. Kar, G., Gursoy, A., and Keskin, O. (2009) Human cancer protein-protein interaction network: a structural perspective. *PLoS Comp. Biol.* **5**, e1000601
14. Arkin, M. R., and Whitty, A. (2009) The road less traveled: modulating signal transduction enzymes by inhibiting their protein-protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 284–290
15. Tanaka, T., and Rabbitts, T. H. (2008) Interfering with protein-protein interactions: potential for cancer therapy. *Cell Cycle* **7**, 1569–1574
16. Thiel, P., Kaiser, M., and Ottmann, C. (2012) Small-molecule stabilization of protein-protein interactions: an underestimated concept in drug discovery? *Angew. Chemie* **51**, 2012–2018
17. Molzan, M., Schumacher, B., Ottmann, C., Baljuls, A., Polzien, L., Weyand, M., Thiel, P., Rose, R., Rose, M., Kuhenne, P., Kaiser, M., Rapp, U. R., Kuhlmann, J., and Ottmann, C. (2012) Impaired binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4698–4711
18. Knauer, S. K., Moodt, S., Berg, T., Liebel, U., Pepperkok, R., and Stauber, R. H. (2005) Translocation biosensors to study signal-specific nucleo-cytoplasmic transport, protease activity and protein-protein interactions. *Traffic* **6**, 594–606
19. Knauer, S. K., Carra, G., and Stauber, R. H. (2005) Nuclear export is evolutionarily conserved in CVC paired-like homeobox proteins and influences protein stability, transcriptional activation, and extracellular secretion. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2573–2582
20. Engels, K., Knauer, S. K., Metzler, D., Simf, C., Struschka, O., Bier, C., Mann, W., Kovacs, A. F., and Stauber, R. H. (2007) Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J. Pathol.* **211**, 532–540
21. Knauer, S. K., Bier, C., Habtemichael, N., and Stauber, R. H. (2006) The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Rep.* **7**, 1259–1265
22. Krämer, O. H., Knauer, S. K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K. H., Stauber, R. H., Böhmer, F. D., and Heinzl, T. (2009) A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev.* **23**, 223–235
23. Stauber, R. H., Knauer, S. K., Habtemichael, N., Bier, C., Unruhe, B., Weisheit, S., Spange, S., Nonnenmacher, F., Fetz, V., Ginter, T., Reichardt, S., Liebmann, C., Schneider, G., and Kramer, O. H. (2012) A combination of a ribonucleotide reductase inhibitor and histone deacetylase inhibitors down-regulates EGFR and triggers BIM-dependent apoptosis in head and neck cancer. *Oncotarget* **3**, 31–43
24. Labisso, W. L., Wirth, M., Stojanovic, N., Stauber, R. H., Schnieke, A., Schmid, R. M., Kramer, O. H., Saur, D., and Schneider, G. (2012) MYC directs transcription of MCL1 and eIF4E genes to control sensitivity of gastric cancer cells toward HDAC inhibitors. *Cell Cycle* **11**, 1593–1602
25. Ginter, T., Bier, C., Knauer, S. K., Sughra, K., Hildebrand, D., Munz, T., Liebe, T., Heller, R., Henke, A., Stauber, R. H., Reichardt, W., Schmid, J. A., Kubatzky, K. F., Heinzl, T., and Kramer, O. H. (2012) Histone deacetylase inhibitors block IFN γ -induced STAT1 phosphorylation. *Cell. Signal.* **24**, 1453–1460
26. Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Reikik, A., Knauer, S. K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirattanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schild, H., and Stauber, R. H. (2011) Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano.* **5**, 7155–7167
27. Knauer, S. K., Bier, C., Schlag, P., Fritzmam, J., Dietmaier, W., Rodel, F., Klein-Hitpass, L., Kovacs, A. F., Doring, C., Hansmann, M. L., Hofmann, W. K., Kunkel, M., Brochhausen, C., Engels, K., Lippert, B. M., Mann, W., and Stauber, R. H. (2007) The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* **6**, 1502–1509
28. Knauer, S. K., and Stauber, R. H. (2005) Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells. *Anal. Chem.* **77**, 4815–4820
29. Weber, L. (2010) Patented inhibitors of p53-Mdm2 interaction (2006-2008). *Expert Opin. Ther. Patents* **20**, 179–191
30. Sperandio, O., Reynes, C. H., Camproux, A. C., and Villoutreix, B. O. (2011) Rationalizing the chemical space of protein-protein interaction inhibitors. *Drug Disc. Today* **15**, 220–229
31. Zinzalla, G., and Thurston, D. E. (2009) Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future. *Fut. Med. Chem.* **1**, 65–93
32. Ordóñez, G. R., Puente, X. S., Quesada, V., and Lopez-Otin, C. (2009) Proteolytic systems: constructing degradomes. *Methods Mol. Biol.* **539**, 33–47
33. Simard, J. R., Grutter, C., Pawar, V., Aust, B., Wolf, A., Rabiller, M., Wulfert, S., Robubi, A., Kluter, S., Ottmann, C., and Rauh, D. (2009) High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38 α . *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18478–18488
34. Rose, R., Erdmann, S., Bovens, S., Wolf, A., Rose, M., Hennig, S., Waldmann, H., and Ottmann, C. (2011) Identification and structure of small-molecule stabilizers of 14-3-3 protein-protein interactions. *Angew. Chemie* **49**, 4129–4132
35. Ottmann, C., Weyand, M., Sassa, T., Inoue, T., Kato, N., Wittinghofer, A., and Oecking, C. (2009) A structural rationale for selective stabilization of anti-tumor interactions of 14-3-3 proteins by cotylenin A. *J. Mol. Biol.* **386**, 913–919
36. Yip, C. K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D. M., and Kang, S. A. (2011) Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* **38**, 768–774
37. Shen, X., Meza-Carmen, V., Puxeddu, E., Wang, G., Moss, J., and Vaughan, M. (2008) Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18788–18793
38. Schumacher, B., Mondry, J., Thiel, P., Weyand, M., and Ottmann, C. (2011) Structure of the p53 C-terminus bound to 14-3-3: implications for stabilization of the p53 tetramer. *FEBS Lett.* **584**, 1443–1448
39. Hauske, P., Ottmann, C., Meltzer, M., Ehrmann, M., and Kaiser, M. (2008) Allosteric regulation of proteases. *ChemBiochem* **9**, 2920–2928
40. Laskowski, R. A., Gerick, F., and Thornton, J. M. (2009) The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Lett.* **583**, 1692–1698
41. Mitternacht, S., and Berezovsky, I. N. (2011) Binding leverage as a molecular basis for allosteric regulation. *PLoS Comp. Biol.* **7**, e1002148
42. Saunders, L. P., Ouellette, A., Bandle, R., Chang, W. C., Zhou, H., Misra, R. N., De La Cruz, E. M., and Braddock, D. T. (2008) Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3352–3362
43. Zudaire, E., Aparicio, M., and Cuttitta, F. (2011) Antiangiogenic small molecule and methods of use. WIPO Patent Application WO 2011/014825 A2
44. Bier, C., Knauer, S. K., and Stauber, R. H. (2012) Letter: Targeting Taspase1 for cancer therapy. [E-pub ahead of print] *Cancer Res.* doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0150

Received for publication December 29, 2011.
Accepted for publication May 1, 2012.

LETTER TO THE EDITOR

Chemico-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of threonine aspartase-1

Blood Cancer Journal (2012) 2, e77; doi:10.1038/bcj.2012.22; published online 29 June 2012

Chromosomal rearrangements of the mixed lineage leukemia (*MLL*) gene with numerous partner genes are frequently found in acute myeloid and acute lymphoblastic leukemia.^{1,2} Although the pathomechanism of t(4;11)-mediated leukemia is still being discussed, expression of the AF4•*MLL* fusion was found to enhance the repopulating potential of CD34⁺ cells and lead to the development of predominantly proB-acute lymphoblastic leukemia in a mouse model.^{1,2} The AF4•*MLL* protein contains cleavage sites for threonine aspartase-1 (*Taspase1*).^{1–4} Upon processing by *Taspase1*, the AF4•*MLL* cleavage products form a protein complex resistant to *SIAH*-mediated degradation and activate oncogenic programs.^{3,5} Furthermore, *Taspase1* is over-expressed in liquid and solid human cancers, suggesting that

Taspase1 is co-opted to promote and sustain tumorigenesis.⁶ As genetic deletion of *Taspase1* in the mouse produced no overt deficiencies,³ inhibition of *Taspase1* may offer novel anticancer strategies, including the treatment of leukemias. Human *Taspase1* encodes a protease of 420 amino acids cleaving substrates *in trans* by recognizing a conserved peptide motif (Q³[F,I,L,V]²D¹ ↓ G¹x²D³D⁴).⁴ Unfortunately, *Taspase1*'s activity is not affected by common protease inhibitors, therefore currently precluding the assessment of its clinical and therapeutic relevance.^{3,4,7}

Here, we present our endeavors to target *Taspase1*'s oncogenic potential by (i) overexpressing inactive *Taspase1* variants, and (ii) testing a putative *Taspase1* inhibitor (Figure 1a).

As the *Taspase1* proenzyme is autoproteolytically cleaved and assumed to assemble into an active $\alpha\beta\alpha$ -heterodimer, we reasoned that overexpressing inactive *Taspase1* mutants would inhibit the formation of active protease dimers. To analyze *Taspase1*'s processing of AF4•*MLL* substrates in living cells,

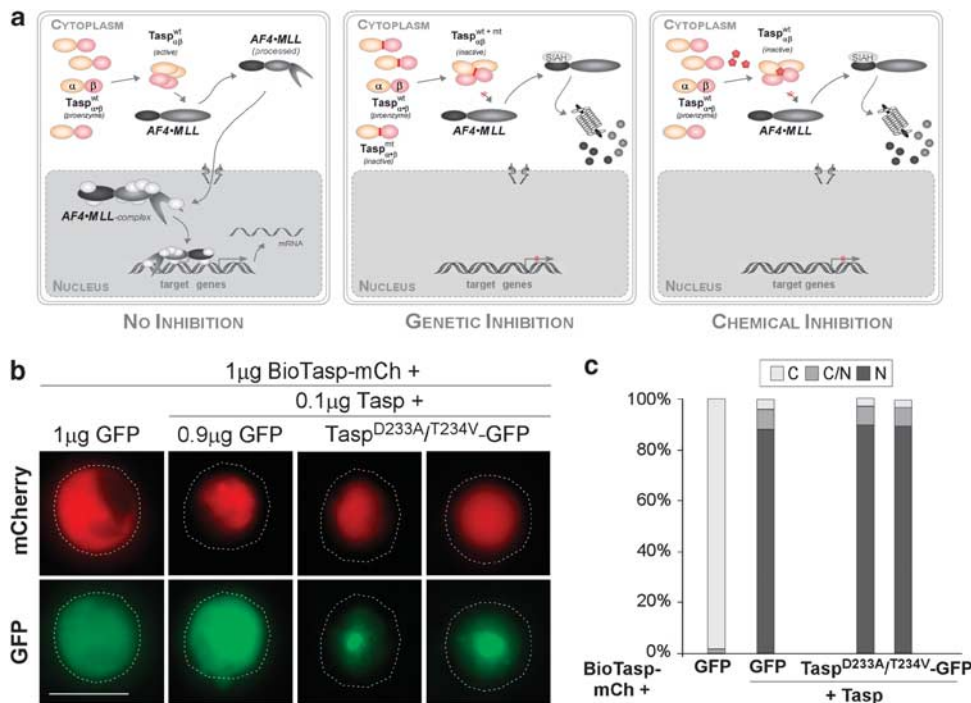


Figure 1. (a) Strategies targeting *Taspase1*'s oncogenic activity. Autoproteolysis of the *Taspase1* proenzyme triggers formation of the active $\alpha\beta\alpha$ heterodimer, hydrolyzing the AF4•*MLL* fusion protein and driving oncogenesis (left). Inhibition by overexpression of *trans*-dominant *Taspase1* mutants results in the formation of inactive heterodimers, precluding AF4•*MLL* processing, and the activation of oncogenic programs (middle). Chemical *Taspase1* inhibitors affect its proteolytic activity, preventing AF4•*MLL* processing and activation of pathological pathways (right). (b) Catalytically inactive *Taspase1* mutants are not inhibitory. K562 cells were transfected with 1 μg of red fluorescent BioTasp_R and 0.1 μg of Tasp-BFP, together with the indicated amounts of inactive *Taspase1*-green fluorescent protein (GFP) mutants or GFP expression plasmid. Even co-transfection of a ninefold excess of plasmids encoding the inactive *Taspase1* variants did not affect BioTasp_R processing. Localization was analyzed 48 h post transfection. GFP/mCherry (mCh) were visualized by fluorescence microscopy. Dashed lines mark cytoplasmic cell boundaries. (c) The number of cells showing cytoplasmic (C), cytoplasmic and nuclear (C/N), or nuclear (N) fluorescence was counted in at least 200 BioTasp_R-expressing cells. Whereas the number of cells displaying cytoplasmic fluorescence significantly decreased by co-transfection of 0.1 μg Tasp-BFP expression plasmid, no significant *trans*-dominant-negative effect was evident for *Taspase1* mutants.

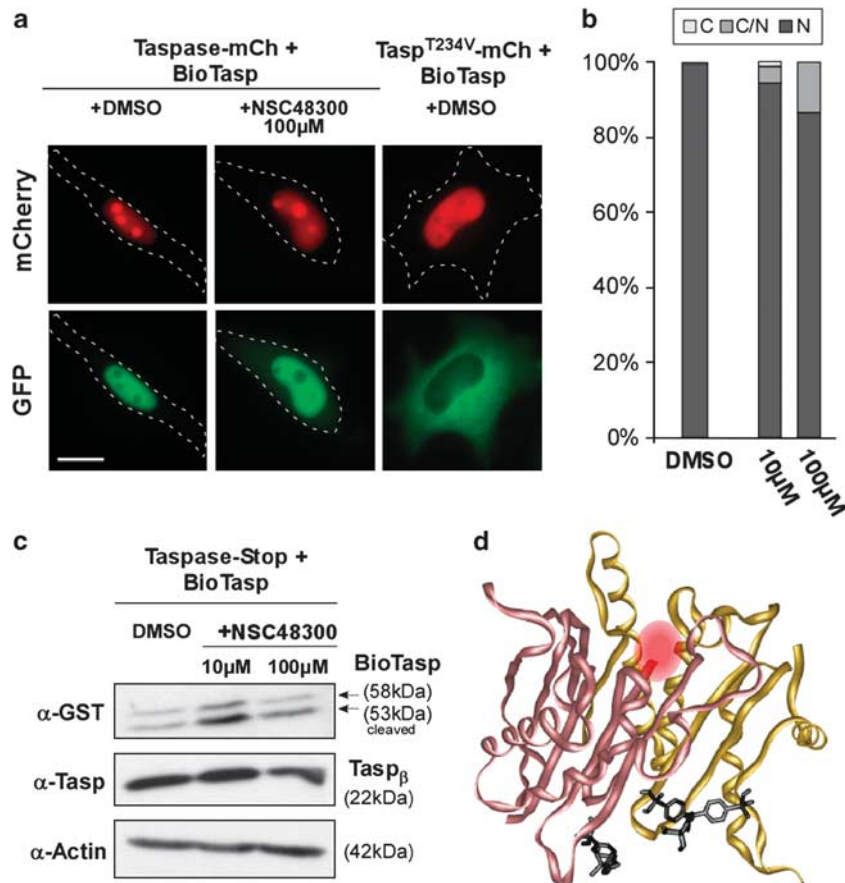


Figure 2. (a) NSC48300 does not inhibit Taspase1. HeLa transfectants coexpressing green fluorescent BioTasp_G and red fluorescent (mCherry, mCh) wild type or inactive Tasp^{T234V} were treated with dimethylsulfoxide (DMSO)/NSC48300 and analyzed 48 h later. Cleavage-induced nuclear translocation of BioTasp_G by Taspase1 was not affected by NSC48300. Inactive Tasp^{T234V}-mCh did not result in cleavage and nuclear accumulation of BioTasp_G. Scale bar, 10µm. (b) Quantitation of BioTasp_G processing. No significant inhibition of cleavage was observed upon treatment with NSC48300. Localization was analyzed 48 h post transfection. (c) Immunoblot analysis demonstrates that NSC48300 did not inhibit Taspase1's *trans*-cleavage, nor *cis*-cleavage. HeLa cells were transfected with 1 µg of BioTasp_G together with 1 µg of untagged Taspase1 and treated for 48 h. Proteins were visualized using α-glutathione S-transferase (GST) and α-Taspase1 Abs. GapDH served as loading control. (d) Stereo diagram showing the molecular docking of NSC48300 (black) to activated Taspase1. The α subunit is shown in yellow, and the β subunit in rose. The catalytic Thr²³⁴ is marked by a red sphere.

we employed our cell-based biosensor assay⁴ (Supplementary Figure S1a). Ectopic expression of Taspase1 promoted cleavage and complete nuclear accumulation of the autofluorescent BioTasp protein, containing the AF4•MLL cleavage site. Co-expression of catalytically inactive Taspase1 mutants, in which the catalytic nucleophile, Thr²³⁴, was changed into Val (Tasp^{T234V}) or Asp²³³ was mutated into Ala (Tasp^{D233A}), resulted in neither cleavage nor nuclear translocation (Figure 1b). Importantly, our assay as well as immunoblot analysis demonstrated that even co-transfecting a ninefold excess of the inactive Taspase1 mutants over the wild-type Taspase1 expression plasmid did not affect Taspase1's processing of the AF4•MLL biosensor (Figures 1b-d; Supplementary Figure S1b). Similar results were obtained using HA-tagged or untagged Taspase constructs, and these results were also confirmed for the Taspase1 targets TFIIA and USF2 (data not shown). Our results demonstrate that enforced expression of inactive Taspase1 mutants, aiming to inhibit formation of active protease dimers, was not inhibitory. One might speculate that Taspase1 is active already as an αβ-monomer, providing a mechanistic explanation why overexpression of inactive mutants was not *trans*-dominant.

Besides genetic approaches, chemical decoys allowing the targeted inhibition/activation of proteins also allow to dissect and regulate molecular pathomechanisms. Consequently, we next tested (4-[(4-*arsonophenyl*)methyl]phenyl) arsonic acid

(NSC48300), a recently described Taspase1 inhibitor.⁸ Prior to experimentation, the identity of the used batch of NSC48300 was confirmed by mass spectrometry (Supplementary Figure S2). NSC48300's potential to inhibit Taspase1's processing of the AF4•MLL substrate was examined in adherent and leukemic cell lines. Surprisingly, NSC48300 did not affect Taspase1's *trans*-cleavage activity, as indicated by the nuclear accumulation of the AF4•MLL biosensor at concentrations ranging from 10 to 500 µM (Figures 2a and b; Supplementary Figures S2c and d). The possibility that nuclear accumulation of the biosensor was indirectly mediated through the inhibition of nuclear export by NSC48300 was excluded by microinjection experiments (Supplementary Table S1). Albeit treatment with 500 µM NSC48300 impaired cell vitality, this effect was independent of endogenous Taspase1 levels (Supplementary Figures S2e and f). These results were confirmed by immunoblot analysis, revealing that NSC48300 did also not prevent Taspase1's autoprocessing (Figure 2c), and also further confirmed for the Taspase1 targets TFIIA, DPOLZ and USF2 (data not shown). To provide a molecular rationale for the observed lack of inhibition, we performed molecular docking. Albeit high-affinity NSC48300 binding sites in both the active and inactive Taspase1 structure⁷ were identified, no binding was detectable at or close to the catalytic nucleophile, Thr²³⁴ (Figure 2d, data not shown).

Collectively, though NSC48300 interfered with cell migration and invasion,⁹ was patented as an anti-angiogenic compound, and inhibited the growth of breast and brain tumors in murine models,⁸ our results show that these effects are not primarily based on the inhibition of Taspase1. The reason why NSC48300 was reported to affect Taspase1 in an *in vitro* assay⁸ but not *in vivo* (this study) remains to be elucidated.

As it will be unlikely to inhibit Taspase1 by using strategies attempting to interfere with its heterodimer formation, experimental and *in silico* strategies should focus on the identification of specific chemical Taspase1 inhibitors by screening of compound libraries.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

D Wünsch¹, V Fetz¹, D Heider², S Tenzer³, C Bier¹,
L Kunst¹, S Knauer⁴ and R Stauber¹

¹Department of Molecular Oncology, University Medical Center
Mainz, Mainz, Germany;

²Department of Bioinformatics/ZMB, University of
Duisburg-Essen, Essen, Germany;

³Department of Immunology, University Medical Center Mainz,
Mainz, Germany and

⁴Department of Molecular Biology/ZMB,
University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
E-mails: shirley.knauer@uni-due.de or
rstauber@uni-mainz.de

REFERENCES

- Bursen A, Schwabe K, Ruster B, Henschler R, Ruthardt M, Dingermann T *et al.* The AF4bulletMLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLLbulletAF4. *Blood* 2010; **115**: 3570–3579.
- Montes R, Ayllon V, Gutierrez-Aranda I, Prat I, Hernandez-Lamas MC, Ponce L *et al.* Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* 2011; **117**: 4746–4758.
- Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* 2003; **115**: 293–303.
- Knauer SK, Fetz V, Rabenstein J, Friedl S, Hofmann B, Sabiani S *et al.* Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors. *Plos One* 2011; **6**: e18253, 1–14.
- Pless B, Oehm C, Knauer S, Stauber RH, Dingermann T, Marschalek R. The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC-are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* 2011; **25**: 663–670.
- Chen DY, Liu H, Takeda S, Tu HC, Sasagawa S, Van Tine BA *et al.* Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res* 2011; **70**: 5358–5367.
- Khan JA, Dunn BM, Tong L. Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL. *Structure* 2005; **13**: 1443–1452.
- Chen DY, Lee Y, Van Tine BA, Searleman AC, Westergard TD, Liu H *et al.* A Pharmacologic inhibitor of the protease Taspase1 effectively inhibits breast and brain tumor growth. *Cancer Res* 2011; **72**: 736–746.
- Saunders LP, Ouellette A, Bandle R, Chang WC, Zhou H, Misra RN *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Mol Cancer Ther* 2008; **7**: 3352–3362.



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Blood Cancer Journal website (<http://www.nature.com/bcj>)

3.2 Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von Taspase1

3.2.1 Fly versus Man: Evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of *Drosophila*'s Taspase1

Désirée Wunsch, Angelina Hahlbrock, Christina Heiselmayer, Sandra Bäcker, Patrick Heun, Dorothee Goesswein, Walter Stöcker, Tanja Schirmeister, Günter Schneider, Oliver H. Krämer, Shirley K. Knauer, and Roland H. Stauber. *The FASEB Journal (in press)*; doi: 10.1096/fj.14-262451 fj.14-262451

Zusammenfassung

Die humane Taspase1 wurde initial als einzigartige Protease beschrieben, welche für die Spaltung des *Mixed Lineage Leukemia* (MLL) Proteins verantwortlich ist. Diese Tatsache macht die Existenz von Taspase1-Orthologen in anderen Spezies, die ebenso MLL-Homologe exprimieren, wahrscheinlich. Als einer der wichtigsten Modellorganismen gilt die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, deren Entwicklung entscheidend durch das MLL-Homolog Trithorax (Trx) reguliert wird. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass in *Drosophila* eine homologe Protease, die *Drosophila* Taspase1 (dTaspase1) für die Spaltung von Trithorax verantwortlich ist. Abgesehen von der Spezies-spezifischen Trx-Spaltung sind weitere strukturelle und funktionelle Eigenschaften der dTaspase1 nicht näher charakterisiert. Im Rahmen dieser Studie ist es gelungen, neue Einblicke in die evolutionäre Entwicklung der Taspase1 „von der Fliege zum Menschen“ zu gewinnen. Zudem konnten wir erstmals einen neuartigen Transport-/Lokalisations-basierten Mechanismus aufdecken, welchen Proteasen evolutionäre Divergenz erlangen.

Eine erfolgreiche Anpassung unseres etablierten *in vivo* Biosensor-Assays an das *Drosophila*-Zellsystem stellte die Grundlage für die Analysen der *Drosophila* Taspase1 im Spezies-spezifischen System dar. Erste Analysen konnten eine autokatalytische Spaltung der dTaspase1 zwischen Asp194 und Thr195 nachweisen und sprechen somit für einen konservierten Aktivierungsprozess des Proenzym in eine aktive α - (20 kDa) und β -Untereinheit (18 kDa). Dabei dient Threonine¹⁹⁵ als essentielles Nukleophil sowohl für die *cis*-, als auch die *trans*-Aktivität der *Drosophila* Taspase1.

Da bereits die Spaltung des MLL orthologen Proteins Trithorax in *Drosophila* durch dTaspase1 gezeigt werden konnte, erscheint eine funktionelle Ko-Evolution dieser Typ-2 Asparaginasen wahrscheinlich. Um diese Hypothese weitergehend zu prüfen und somit ein genaueres Verständnis für die Substrat-Spezifität der dTaspase1 zu erlangen, wurden die für die *trans*-Aktivität der dTaspase1 essentiellen Aminosäurereste mit Hilfe einer Alanin-Scan-Mutagenese bestimmt. Auf Grundlage dieser Biosensor-basierten Methode wurde folgende Spaltungs-Konsensus-Sequenz für die dTaspase1 ermittelt: Q³(F/I/L/M)²D¹G¹X²X³. Eine

anschließende Datenbanksuche im gesamten Proteom von *Drosophila melanogaster* ergab 70 potentielle Zielproteine, womit im Vergleich zum humanen Homolog eine starke Vergrößerung des Degradoms vorhergesagt wurde.

Im Unterschied zur humanen Taspase1 zeigte die homologe Protease in *Drosophila* keine abgegrenzte Lokalisation im Zellkern und an den Nukleoli, was auf das Fehlen eines aktiven nukleären/nukleolären Lokalisationssignals (NoLS) zurückgeführt werden konnte. Dieses in der humanen Taspase1 charakterisierte NoLS ist in allen Vertebraten konserviert und vermittelt über eine Importin- α /Nucleophosmin1(NPM1)-Interaktion die nukleäre/nukleoläre Akkumulation der Taspase1 (Abb. 3.2). Bedingt durch das Fehlen des NoLS zeigt die dTaspase1 weder eine vergleichbare Interaktion mit dem *Drosophila* Nucleoplasmin-like Protein (dNLP) noch mit humanem NPM1.

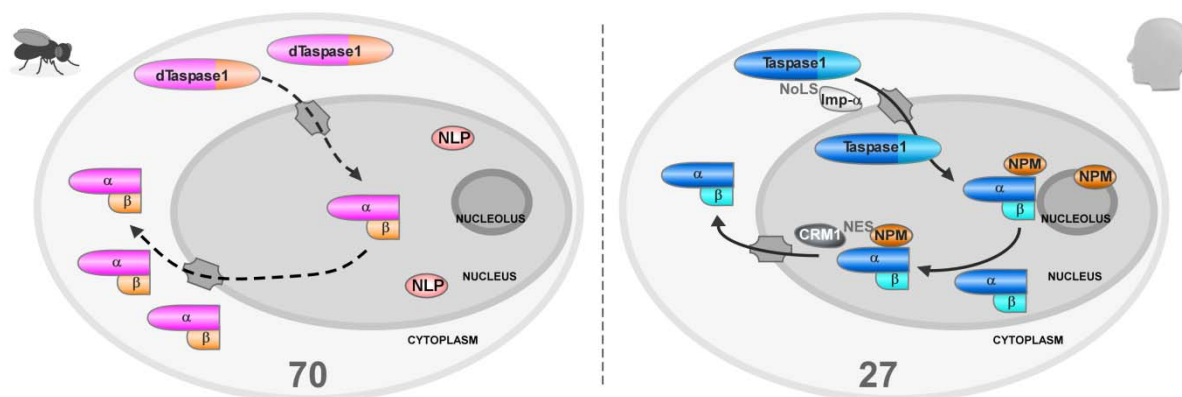


Abbildung 3.2: Modell eines Importin- α /Nucleophosmin1-basierten Mechanismus zur Feinregulation des Taspase1-Degradoms von Invertebraten (links) zu Vertebraten (rechts).

In Invertebraten wie *Drosophila* wird die intrazelluläre Taspase1 Lokalisation nicht aktiv durch ein Lokalisationssignal gesteuert, was eine Verteilung im gesamten Zytoplasma und Zellkern zur Folge hat. Dies ermöglicht der Taspase1 die Spaltung einer Vielzahl potentieller Substrate (70 bei *Drosophila*), wobei die Prozessierung nukleärer Substrate aufgrund der fehlenden nukleären Akkumulation vermindert ist. Im Gegensatz dazu hat die Taspase1 in Vertebraten ein aktives NoLS erworben, welches einen effizienten nukleären Import über die Importin- α /Nucleophosmin1-Achse vermittelt und somit die Spaltung nukleärer Zielproteine erlaubt. Durch die Interaktion mit dem shuttle-Protein NPM1 gelangt die aktive Taspase1 zudem ins Zytoplasma um dort weitere Substrate zu spalten. Anzahl der vorhergesagten Substrate ist angegeben. NoLS: nukleäres Import/nukleoläres Lokalisationssignal; Imp- α : Importin-alpha; NPM: Nucleophosmin1; CRM1: chromosome region maintenance 1 export receptor; NLP: *Drosophila* Nucleoplasmin-like Protein.

Auswirkungen der Taspase1-Lokalisation auf ihre proteolytische Aktivität, wie bereits für das humane Enzym gezeigt, konnten nun auch für die dTaspase1 bestätigt werden. So ist dTaspase1 im Gegensatz zur humanen Taspase1 nicht in der Lage, nukleäre Substrate effizient zu spalten, wie etwa den Transkriptionsfaktor USF2. Durch das genetische

Einbringen des humanen NoLS in die dTaspase1-Sequenz konnte sowohl eine nukleoläre Lokalisation und Interaktion mit NPM1, als auch eine effiziente Spaltung des nukleären Substrates USF2 vermittelt werden.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für unsere Annahme, dass sich erst in Vertebraten ein Importin- α /Nucleophosmin1-basierter Mechanismus zur Feinregulation des Taspase1-Degradoms entwickelt hat. Damit beschreiben wir erstmals einen Transport-basierten evolutionären Mechanismus zur Modulation einer proteolytischen Aktivität.

Für zusätzliche Informationen (engl. *supplementary information*) siehe Onlineversion der Veröffentlichung (Quelle:<http://www.fasebj.org>).

Fly versus man: Evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of *Drosophila*'s Taspase1

Désirée Wunsch,^{*,1} Angelina Hahlbrock,^{*} Christina Heiselmayer,[†] Sandra Bäcker,[†] Patrick Heun,[‡] Dorothee Goesswein,^{*} Walter Stöcker,[§] Tanja Schirmeister,[¶] Günter Schneider,^{||} Oliver H. Krämer,[#] Shirley K. Knauer,[†] and Roland H. Stauber^{*,1}

^{*}Molecular and Cellular Oncology, Ear, Nose and Throat Department, University Medical Center of Mainz, Mainz, Germany; [†]Institute for Molecular Biology, Centre for Medical Biotechnology, Mainz Scientific Screening Center UG & Co. KG, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany; [‡]Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany; [§]Cell and Matrix Biology, Institute for Zoology, and [¶]Institute for Pharmacy and Biochemistry, University of Mainz, Mainz, Germany; ^{||}II. Medizinische Klinik, Technische Universität München, Munich, Germany; and [#]Department of Toxicology, University Medical Center, Mainz, Germany

ABSTRACT Human Taspase1 is essential for development and cancer by processing critical regulators, such as the mixed-lineage leukemia protein. Likewise, its ortholog, trithorax, is cleaved by *Drosophila* Taspase1 (dTaspase1), implementing a functional coevolution. To uncover novel mechanism regulating protease function, we performed a functional analysis of dTaspase1 and its comparison to the human ortholog. dTaspase1 contains an essential nucleophile threonine¹⁹⁵, catalyzing *cis* cleavage into its α - and β -subunits. A cell-based assay combined with alanine scanning mutagenesis demonstrated that the target cleavage motif for dTaspase1 (Q³[F/I/L/M]²D¹↓G¹X²X³) differs significantly from the human ortholog (Q³[F,I,L,V]²D¹↓G¹x²D³D⁴), predicting an enlarged degradome containing 70 substrates for *Drosophila*. In contrast to human Taspase1, dTaspase1 shows no discrete localization to the nucleus/nucleolus due to the lack of the importin- α /nucleophosmin1 interaction domain (NoLS) conserved in all vertebrates. Consequently, dTaspase1 neither interacts with the *Drosophila* nucleoplasmin-like protein nor human nucleophosmin1. The impact of localization on the protease's degradome was confirmed by demonstrating that dTaspase1 did not efficiently process nuclear substrates, such as upstream stimulatory factor 2. However, genetic introduction of the NoLS into dTaspase1 restored its nucleolar localization, nucleophosmin1 interaction, and efficient cleavage of nuclear substrates. We report that evolutionary functional divergence separating vertebrates from invertebrates can be achieved for proteases by a transport/localization-regulated mechanism.—Wunsch, D., Hahlbrock, A.,

Heiselmayer, C., Bäcker, S., Heun, P., Goesswein, D., Stöcker, W., Schirmeister, T., Schneider, G., Krämer, O. H., Knauer, S. K., Stauber, R. H. Fly versus man: Evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of *Drosophila*'s Taspase1. *FASEB J.* 29, 000–000 (2015). www.fasebj.org

Key Words: cancer • development • leukemia • protease • threonine aspartase

PROTEOLYSIS IS A CRITICAL requirement for life. Approximately 700 proteases are present in the human genome, and proteases are key enzymes throughout evolution, bridging “simple” viruses with higher eukaryotes (1–3). Hence, proteases can be considered “molecular fossils” that serve to mark evolutionary milestones in the history of life. Based on the analysis of complete genomes, it is assumed that ~2% of proteins in all kinds of organisms are proteases. The MEROPS database classifies proteolytic enzymes based on structural similarity or sequence features supporting (functional) homology (1, 3).

In higher organisms, proteases are key regulators in homeostasis and disease, involved in numerous (patho) physiologic processes including intra- and intercellular protein degradation, metabolism, tissue remodeling, apoptosis, cell proliferation, and migration (4, 5). Thus, these enzymes are not only accepted as important signaling molecules but also as key targets for therapeutic strategies. However, to effectively and specifically modulate proteases, a profound knowledge of their molecular mechanistic function, of their degradome, *i.e.*, the sum of their substrates,

Abbreviations: Ab, antibody; BioTasp, fluorescent biosensor containing Taspase1 cleavage site; CRM1, chromosome region maintenance 1 export receptor; dNLP, *Drosophila* nucleoplasmin-like protein; GFP, green/blue/red fluorescent protein; GI, GenInfo identifier; GST, glutathione S-transferase; MLL, mixed lineage leukemia;

(continued on next page)

¹ Correspondence: Molecular and Cellular Oncology/ENT/ University Medical School Mainz, Langenbeckstr. 1, D-55101 Mainz, Germany; D.W., E-mail: wuensch@uni-mainz.de; R.H.S., E-mail: rstauber@uni-mainz.de
doi: 10.1096/fj.14-262451

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

as well as of the involved pathways in health and disease, are important requirements.

Whereas much is known about key proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (6) and the proteasome (7), our knowledge on the mechanistic function, *in vivo* regulation, and (patho)biologic impact of threonine aspartase 1 (Taspase1) in humans and particularly in other organisms is still incomplete.

Human Taspase1, a protease composed of 420 amino acids, is responsible for the activation and stabilization of the mixed-lineage leukemia protein (MLL) and oncogenic MLL fusions at conserved ($Q^3[F, I, L, V]^2D^1\downarrow G^1x^2D^3D^4$) sites (8, 9). It belongs to a family of enzymes possessing an asparaginase-2 homology domain. In contrast to the other exclusively *cis* active type 2 asparaginases, only Taspase1 is able to cleave other substrates in *trans* (9). Thus, the discovery of Taspase1 founded a new class of endopeptidases that use the N-terminal threonine of its mature β -subunit as the active site. In humans, this N-terminal threonine (Thr²³⁴) is generated by autoproteolysis of the Taspase1 proenzyme (referred to as *cis* cleavage) into the 2 subunits α and β , which assemble into an $\alpha\beta$ -monomer representing the active protease (10, 11). Human Taspase1 is accumulating at the nucleus/nucleolus but is exploiting the dynamic importin- α (IMP- α)/nucleophosmin (NPM1) axis, allowing the processing of substrates in both the nucleus and the cytoplasm (12). As such, human Taspase1 is one of the few examples for which protease signaling is combined with active nucleo-cytoplasmic transport allowing an additional level of regulatory complexity (12).

Prediction of Taspase1's degradome (13) together with recent experimental evidence further implies that the protease plays not only a crucial role in leukemia, but is also important in solid tumors (9, 12, 14). Besides MLL fusions, other nuclear and cytoplasmic regulatory proteins, such as the precursor of the transcription factor IIA (TFIIA) or the upstream stimulating factor 2 (USF2), are *bona fide* Taspase1 targets (13, 15). Taspase1's catalytic activity is not affected by common protease inhibitors. Currently, neither effective synthetic small molecule nor natural inhibitors are available for this enzyme, counteracting not only to further dissect Taspase1's (patho)biologic functions *in vivo*, but also precluding the assessment of its clinical and therapeutic relevance (9, 13, 16–19).

Although MEROPS classification provides a context to decipher peptidase function, the wide diversity of proteolytic enzymes calls for investigation of how these proteins and their degradomes were shaped over time. It is expected that changes in the molecular structure have accompanied the evolution of proteolytic enzymes from more primitive organisms, serving relatively primitive functions, to the diverse and more complex functions that they fulfill in man. Hence, uncovering such structural

adaptions may deepen our understanding of the full repertoire of proteases' functional regulation.

The fruit fly *Drosophila melanogaster* has been extensively used as an important model organism (20). Many basic biologic functions and pathways are conserved between mammals and *Drosophila*, and nearly 75% of human disease-causing genes are believed to have a functional homolog in the fly (20), impressively underlined by the elucidation of the Ras signaling cascade (21).

After demonstrating that human Taspase1 is responsible for cleavage and stabilization of MLL proteins (9, 12), it was shown that the MLL homolog in *Drosophila*, called Trithorax (Trx), is proteolytically cleaved by the *Drosophila* Taspase1 homolog (dTaspase1) (22). Hence, a tight co-evolution of molecular mechanisms regulating Taspase1's proteolytic activity among these taxa was postulated (9, 22). However, because comprehensive experimental data supporting this hypothesis have been missing thus far, we performed the first detailed *in vivo* characterization and functional analysis of *Drosophila's* Taspase1.

Unexpectedly, our study not only provides novel insights into the evolutionary development of Taspase1 “from fly to man,” but uncovers for the first time that evolutionary functional divergence separating vertebrates from invertebrates can be achieved for proteases by a transport/localization-regulated mechanism.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies, reagents, and compounds

The antibodies (Abs) used were as follows: α -glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, sc-47724; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); α -green fluorescent protein (GFP, sc-8334; Santa Cruz Biotechnology); α -glutathione S-transferase (GST, sc-57753; Santa Cruz Biotechnology); α -NPM1 (#3542; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); α -myc-tag (#2276; Cell Signaling Technology); α -Taspase1 (directed against the C terminus, AP1330b; BioCat GmbH); and α -hemagglutinin (HA) (MMS-101R; Covance). Appropriate horseradish peroxidase-, Cy3-, or FITC-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, and Santa Cruz Biotechnology) were used. Reagents were from Sigma-Aldrich unless stated otherwise. Cells were treated with the export inhibitor Leptomycin B (LMB; 10 nM) as previously described (23).

Cell culture, microinjection, microscopy, and fluorescence imaging of cells

Mammalian and *Drosophila* Schneider 2 (S2) cell lines used in the study were maintained and transfected as previously described (13, 24, 25). Observation, quantitation, image analysis, and presentation were performed as previously described (12, 25, 26). Cell nuclei were stained with 0.5 μ g/mL Hoechst 33342 (excitation: 405 nm; emission: 430–480 nm).

Confocal laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy images were acquired using Leica LAS AF software on a Leica SP5 II system equipped with 4 lasers and a HCX-PL APO 63x/1.20 water lens (Leica, Buffalo Grove, IL, USA) as described previously in detail (27, 28). To determine the average intracellular protein localization, cells from 3 separate images were examined in 3 independent

(continued from previous page)

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Imp- α , Importin- α ; LMB, Leptomycin B; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear import signal; NoLS, nuclear import/nucleolar localization signal; NPM1, nucleophosmin1; SEMP, small ubiquitin-like modifier (SUMO)-specific protease; TFIIA, transcription factor 2A; Trx, trithorax; USF2, upstream stimulatory factor 2; WT, wild-type

experiments, and representative images are shown. The percentage of cells exhibiting cytoplasmic and nuclear (C/N; cytoplasmic/nuclear signal > 80% of the total cellular signal) or nuclear/nucleolar (N/Ncl; nuclear/nucleolar signal > 80% of the total cellular signal) fluorescence was determined by counting ≥ 50 cells.

Plasmids

Drosophila Taspase1 (dTaspase1) coding sequence was cloned from the *Drosophila* cell line S2 as previously described (12). Cloning of the dTaspase1 coding sequence into expression vectors pc3-GFP, pc3-mCherry, pc3-HA, and the *Drosophila* expression vector pAc5.1V5/HisA (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using *KpnI/NheI* or *KpnI/EcoRI* restriction sites (primers 5'-TTTGGTACCATGGCAGGCTTCGTCCAGTG-3' and 5'-TTTGCTAGCAATGCCGAGGTGGAAGTTGTGG-3'), respectively, allowed the expression of dTaspase1, alone or as a fusion with fluorescent proteins, as previously described (29, 30). Plasmid p_{dTaspTV}-GFP encoding the catalytically inactive Taspase1 mutant, dTaspT195V, was generated by splice overlap extension PCR as previously reported (31, 32). To generate the N-terminal myc-tagged dTaspase1, a construct myc-tag coding sequence flanked by *KpnI* restriction sites was produced by oligo annealing (30) and cloned into pC3-dTasp-GFP and pAc5.1dTaspase1-GFP. The human NPM1 coding sequence was amplified using pC3-NPM1-GFP and cloned into pAc5.1 vector using *KpnI/NheI* restriction sites. Expression constructs encoding Taspase1 (hTasp), hTaspTV, and NPM1 as fusions with green, blue, or red fluorescent proteins or HA-tag were described (12, 13). The USF2 coding sequence was derived by PCR from plasmids that were previously described (33, 34). Generation of plasmids p_{NLS}-GFP/GST-CS2-NES_{REV} (*BioTasp*), and biosensors containing cleavage sites of TFIIA, USF2, and other described Taspase1 substrates as described previously (12). p_{BioTaspR} encodes a red fluorescent biosensor (NLS-mCherry/GST-CS2-NES_{REV}), in which GFP was replaced by mCherry (31). The biosensor assay was adapted for the expression in *Drosophila* cell line S2R+ by cloning NLS-GFP/GST-CS2-NES_{REV} into pAc5.1V5/HisA via blunted *KpnI/EcoRI* restriction sites. Expression plasmids for BioTasp variants, in which CS2 was mutated, were previously described (12). pF143 plasmid expressing GFP alone was used as a control (35). pIB_{dNLP}-mCherry encoding the NMP-like protein from *Drosophila* was previously described (25). For cloning of the dTaspase1-NoLS mutant, the amino acid sequence₁₅₅NHYKSK-EESV₁₇₈ was mutated into₁₅₅KRNKRK-KKRR₁₇₈ by splice overlap extension PCR as previously reported (31, 32). Plasmids were verified by sequence analysis as previously described (36).

Protein extraction, immunoblot analysis, and immunofluorescence

Preparation of whole cell lysates was carried out as described using a physiologic lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (37). Equal loading of lysates was controlled by reprobing blots for GAPDH as previously described (38). Immunofluorescence was performed as reported previously in detail (12, 23).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of GFP-tagged proteins was performed using α -GFP magnetic beads and μ -MACS columns (Miltenyi Biotec) according to the supplier's recommendation. Briefly, whole cell lysates were incubated with 50 μ l α -GFP magnetic

beads for 30 minutes on ice. μ -MACS columns were placed into magnetic field and equilibrated with 200 μ l lysis buffer. Lysates with magnetic beads were applied onto the columns and washed 4 times with 200 μ l lysis buffer and once with 100 μ l wash buffer-2 (Miltenyi Biotec). After complete flow through, 20 μ l preheated elution buffer (Miltenyi Biotec) was applied onto each column and incubated for 5 minutes. To complete protein elution, 50 μ l preheated elution buffer was applied. Thirty microliters of the eluate and 3% of input were analyzed.

Bioinformatics and statistical analysis

dTaspase1 protein was analyzed using PredictNLS algorithm (<https://www.predictprotein.org>) and cNLS Mapper (39, 40). For protein alignment of Taspase1 protein sequences, the program GeneDoc (www.psc.edu/biomed/genedoc) was used, and protein sequences were obtained from National Center for Biotechnology Information databases [*Homo sapiens* (GenInfo identifier (GI): 19263670); *Maccaca mulatta* (GI: 109092934); *Mus musculus* (GI: 123233857); *Rattus norvegicus* (GI: 112982912); *Bos taurus* (GI: 164448634); *Canis familiaris* (GI: 73991167); *Oryctolagus cuniculus* (GI: 291389018); *Sus scrofa* (GI: 350594655); *Danio rerio* (GI: 169636455); *Xenopus laevis* (GI: 148227000); *Gallus gallus* (GI: 61098282); *Ciona intestinalis* (GI: 198426192); *Drosophila melanogaster* (GI: 23093366); *Amphimedon queenslandica* (GI: 340375835)]. For the *in silico* identification of potential *Drosophila* Taspase1 targets, ScanProsite searches (<http://ca.expasy.org/tools/scanprosite>) were performed using the pattern Q-[FILM]-D-G as the query. Searches were performed in the *Drosophila* taxon of the UniProtKB/SwissProt database, and all other parameters were used at default settings. For experiments stating *P* values, a paired Student *t* test was performed. Unless stated otherwise, *P* values represent data obtained from 3 independent experiments done in triplicate. *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Evolutionary conservation: Threonine¹⁹⁵ is the essential nucleophile for the *cis* and *trans* cleavage activity of *Drosophila* Taspase1

The function of human Taspase1 critically depends on the active nucleophile threonine²³⁴, essential not only for the protease's self-activating *cis* but also *trans* cleavage activity (9, 12). Sequence alignments of different Taspase1 homologs (Fig. 1A) indicate that activation occurs most likely by autocatalytic cleavage between aspartate¹⁹⁴ and threonine¹⁹⁵ for dTaspase1 (dTasp: ¹⁹³LD↓TVGAV¹⁹⁹). In fact, whereas protein alignment of human and *Drosophila* Taspase1 revealed only 36% overall amino acid identity (Supplemental Fig. S1A), the region required for their *cis* cleavage is fully conserved. *cis* cleavage would result in an α -subunit of about 20 kDa and a β -subunit of 18 kDa, thereby generating an N-terminal threonine at the β -subunit as the key nucleophile. To verify this prediction, we cloned dTaspase1 from *Drosophila* cells, and the predicted sequence could be verified (22). On expression as a GFP-tagged or myc-dTaspase1-GFP protein in *Drosophila* or human cells, dTaspase1 was detectable by immunoblot as a protein of 44 kDa, representing the β -subunit (18 kDa) in fusion with GFP (27 kDa) and the α -subunit (20 kDa)

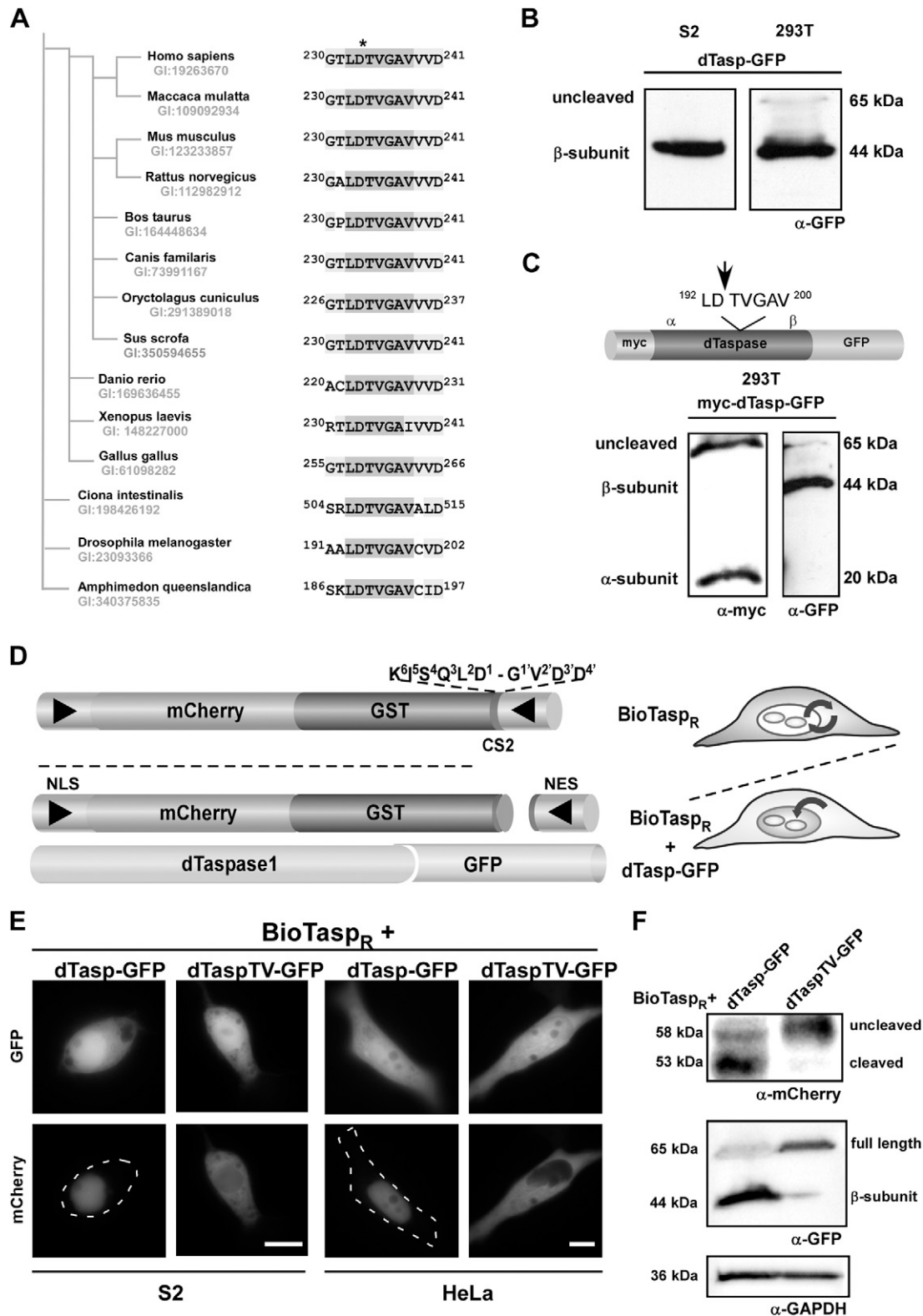


Figure 1. Threonine¹⁹⁵ is the essential nucleophile for the *cis* and *trans* cleavage activity of *Drosophila* Taspase1. A) Alignment of the predicted *cis* cleavage sequences in Taspase1 homologs. Phylogram was constructed on the basis of amino acid sequence similarities illustrating the evolutionary relationships among Taspase1 proteins from different species (TreeDomViewer, <http://www.bioinformatics.nl/tools/treedom/>). Sequence alignment demonstrates that the predicted active nucleophile threonine (gray) is conserved in all Taspase1 homologs. *cis* cleavage site is marked by asterisk. Organisms, GI, and amino acid positions are indicated. B, C) Verification of the predicted dTaspase1 *cis* cleavage site. *Drosophila* S2 or human 293T cells were transfected with GFP (B) or an N-terminal myc-tagged dTaspase1 (C) expression plasmid, and expression was analyzed in whole-cell lysates by immunoblot. (continued on next page)

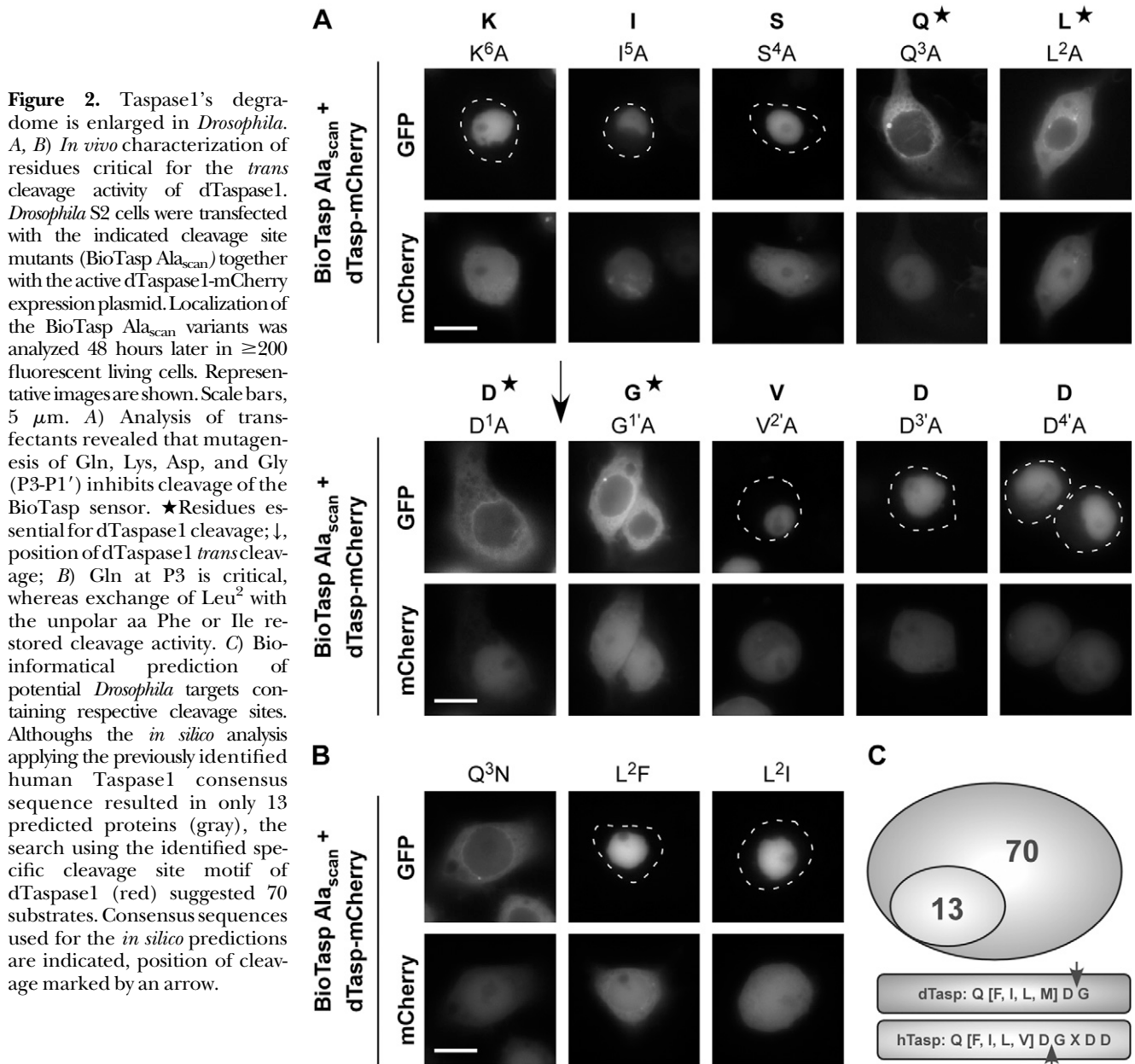
(Fig. 1B, C). Hence, *cis* cleavage of the proenzyme occurs in both *Drosophila* and human cells. Of note, the unprocessed protease with an expected size of 65 kDa was hardly detectable in the more physiologic environment of *Drosophila* cells (Fig. 1B). In contrast, we detected the precursor in human 293T cells, where proteolysis does not occur to 100% (Fig. 1C). Also, detection of the full-length protein was more efficient using an α -myc Ab in contrast to using the α -GFP Ab. These variations might be because of differences in the accessibility of the antibodies to the uncleaved/cleaved protein, antibody specificity, and unequal stabilities of the different dTaspase1 cleavage products.

To experimentally demonstrate that the presumed nucleophile is indeed required for dTaspase1's proteolytic activity, Thr¹⁹⁵ was mutated into Val, in analogy to the catalytically inactive human Taspase1^{T134V} mutant (10, 13). To investigate protease function in living cells, we first tested whether our translocation biosensor assay could be adapted to *Drosophila* cells (8, 13) (Fig. 1D). The fluorescent biosensor BioTaspR protein is composed of GST, mCherry, combinations of a nuclear import (NLS) and an export (NES) signal, and a Taspase1 cleavage site. BioTaspR localizes predominantly to the cytoplasm, but is continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm. Co-expression of BioTaspR with biologically active dTaspase1-GFP results in the proteolytic cleavage of the NES, causing nuclear accumulation of the red fluorescent sensor triggered by the NLS. As shown in Fig. 1D, E, expression of the biosensor BioTaspR in the context of a *Drosophila*-specific vector was followed by its cleavage and a cytoplasmic to nuclear accumulation on co-expression of tagged- or untagged biologically active wild-type (WT) dTaspase1. In contrast, the inactive dTaspTV¹⁹⁵ mutant showed no proteolytic activity (Fig. 1E), neither in *Drosophila* nor human cells, supporting a conserved proenzyme-to-active-protease coevolution. We independently verified the cleavage activity of HA-tagged dTaspase1 variants against BioTaspR by immunoblot analysis (Fig. 1F). Of note, we observed that the expression of the dTaspTV¹⁹⁵-mutant is lower compared with the WT enzyme. Because the expression plasmids are under the control of the same regulatory elements, these differences might be caused by reduced protein stability of the uncleaved protease. However, the molecular details need to be confirmed in follow-up studies.

Evolutionary protease divergence I: Taspase1's degradome is enlarged in *Drosophila*

As the MLL ortholog in *Drosophila*, trithorax (Trx), is cleaved by dTaspase1, a functional coevolution of these type 2 asparaginases is currently expected by the field. To experimentally test this hypothesis, we first performed an *in vivo* mapping of residues critical for the *trans* cleavage activity of dTaspase1 in the appropriate biologic environment, *i.e.*, *Drosophila* cells. Using our translocation biosensor assay, which was efficiently processed in *Drosophila* S2 cells (Fig. 1E), alanine scanning mutagenesis of the cleavage site motif (amino acids KISQLD↓GVDD) was performed. As depicted in Fig. 2, co-expression of the indicated *BioTasp Ala_{scan}*-mutants with the catalytically active dTaspase1-mCherry fusion resulted in proteolytic cleavage and nuclear accumulation of only those biosensor proteins, in which we mutated nonessential residues in the cleavage site. In contrast, mutation of critical residues completely prevented cleavage and nuclear accumulation of the fluorescent sensor proteins in *Drosophila* cells (Fig. 2; data not shown). We observed cytoplasmic localization of the biosensor for Gln³, Leu², Asp¹, and Gly^{1'}, unambiguously identifying those residues as essential for proteolysis. Interestingly, replacing Leu² by the chemically similar amino acid Phe or Ile restored protease recognition and cleavage, whereas substitution of Gln at P3 with the conatural amino acid Asn did not allow cleavage (Fig. 2B). By cotransfection of the inactive dTaspTV¹⁹⁵-mCherry mutant, we verified assay specificity, which did not result in nuclear accumulation of all biosensor variants (data not shown). Also, nuclear accumulation of all variants on treatment with the export inhibitor LMB further excluded the formal possibility that mutagenesis affected the shuttling capability of the biosensors in *Drosophila* cells (data not shown). Of note, we obtained similar results in human HeLa cells, indicating that cleavage site specificity is inherently controlled by the enzyme itself and not by additional organism-specific cofactors (data not shown). Collectively, our analysis identified the following *trans* cleavage site consensus sequence for dTaspase1: Q³[F/I/L/M]²D¹↓G^{1'}x^{2'}x^{3'}. Hence, compared with the consensus sequence defined for human Taspase1 (Q³[F,I,L,V]²D¹↓G^{1'}x^{2'}x^{3'}D^{4'}/D^{3'}x^{4'}) (8, 13) recognition and productive *trans* cleavage activity of *Drosophila* Taspase1 lacks specificity for Asp in the P3' and P4' positions and thus allows more flexibility in substrate recognition (Fig. 2C).

In both cell lines, a band of 44 kDa could be detected representing the β -subunit (18 kDa) fused with GFP (27 kDa). The α -subunit produced by autocatalytic cleavage of full-length dTaspase1 is detectable at 20 kDa. Proteins were detected using α -GFP or α -myc Ab. Molecular weight of proteins is indicated. D) Principle and domain organization of the translocation biosensor assay, BioTaspR, to probe dTaspase1 activity in living cells. For further information see Results section. →, NLS; ←, NES. E) WT dTaspase1 (dTasp), but not the catalytically inactive dTasp^{T195V} mutant (dTaspTV), is able to cleave BioTaspR in cells. The red fluorescent sensor is predominantly cytoplasmic, whereas co-expression of biologically active dTasp-GFP, but not of inactive dTaspTV-GFP, results in the proteolytic cleavage of the NES and nuclear accumulation of BioTaspR in *Drosophila* S2 or HeLa cells. Scale bars, 5 μ m. Dashed lines mark cytoplasmic cell boundaries obtained from the corresponding phase contrast images. F) Proteolytic cleavage of BioTaspR shown by immunoblot analysis of whole-cell lysates. 293T cells were transfected with BioTaspR together with the indicated Taspase1 expression plasmids (HA-tag about 1 kDa). A 2-fold higher amount of dTaspTV expression plasmid was transfected to obtain equal protein expression levels. In contrast to dTaspase1, the dTaspTV mutant showed neither *cis*- nor *trans* cleavage activity. Expression of proteins and cleavage products in cell lysates was visualized using α -GST and α -HA Ab. GAPDH served as loading control.



This finding motivated us to next perform an *in silico* identification of dTaspase1's degradome in *Drosophila*. Scanning of the UniProt/Swiss-Prot database resulted in the prediction of 70 potential dTaspase1 substrates in contrast to the 27 targets predicted for human Taspase1 (8, 13) (Fig. 2C; **Table 1**; Supplemental Table S1). These comprise not only proteins specifically expressed in *Drosophila*, but also homologs already verified as *bona fide* targets for the human protease, such as the transcription factor TFIIA or the proteasomal regulatory subunit 4. As summarized in Table 1 and Supplemental Table S1, bioinformatic analyses of the predicted dTaspase1 substrates indicated various molecular functions, as well as diverse intracellular localization patterns of these targets. Notably, using the consensus sequence motif found for human Taspase1 (8, 13) resulted in a prediction of only 13 candidates in *Drosophila* (Fig. 2C). Thus, one would have

missed 80% of the potential *Drosophila* degradome, underlining the need to perform a species-specific mapping of proteases' degradomes in general.

However, *in silico* analyses and predictions of a protease's degradome obtained by systematic biochemical methods, such as proteomics, have to be confirmed in detail for each of the proposed targets. Although it is beyond the scope of the current study to analyze all of the predicted 70 targets of dTaspase1, we investigated whether Asp at positions 3' and 4' is indeed not essential for cleavage by dTaspase1 by testing additional targets. Based on our prediction (Supplemental Table S1), we analyzed *Drosophila* histone-binding protein Caf1 and cyclin-dependent kinase 8, both lacking an Asp at positions 3' and 4', in our biosensor system. As shown in Supplemental Fig. S2F, coexpression of dTaspase1, but not of hTaspase1-mCherry, with the biosensor constructs

TABLE 1. Characteristics of selected dTaspase1 targets predicted by ScanProsite

Gene locus	Swiss Prot	Gene name	Alias	Length (amino acids)	Sequence	GO: biologic process	
						ID	Description
TRX	P20659	Histone-lysine N-methyltransferase trithorax	KMT2A Trx-g Rg-bx	3726	2232–2283 QMDGvDD	0006350 0006355 0016571	Transcription, regulation of transcription, histone methylation
TF2AA	P52654	Transcription initiation factor IIA subunit 1	TFIIA TFIIA-L	366	257–263 QLDGaID	0006350 0006355	Transcription, regulation of transcription
PRS4	P48601	26S protease regulatory subunit 4	Pros26.4 P26s4 S4 P56	439	314–319 QLDGfD	0000022 0006508 0006511 0008283	Mitotic spindle elongation, proteolysis, ubiquitin-dependent protein catabolic process, cell proliferation
XPC	Q24595	DNA repair protein complementing XP-C cells homolog	XPCDM mus210 Xpcc	1293	886–892 QLDGgDD	0006281 0006289 0006974	DNA repair, nucleotide-excision repair, response to DNA damage stimulus
RG190	Q9VX32	Rho GTPase-activating protein 190	RhoGAPp190 d-p190 RhoGAP	1561	1157–1162 QLDGeD	0007165 0043547 0050770	Signal transduction, positive regulation of gtpase activity, regulation of axonogenesis
Hcf	Q9V4C8	Host cell factor	dHCF CG1710	1500	1011–1017 QLDGagD	0007049 0035065 0045893 0045927	Cell cycle, regulation of histone acetylation, positive regulation of transcription DNA-dependent, positive regulation of growth
JHD1	Q9VHH9	JmjC domain-containing histone demethylation protein 1	JHDM1 CG11033	1345	774–780 QLDGteD	0006350 0006355 0016568 0070544	Transcription, regulation of transcription DNA-dependent, chromatin modification, histone H3K36 demethylation
INSL3	Q9VT52	Probable insulin-like peptide 3	ILP3 CG14167	120	65–71 QIDGfeD	0008286 0005158 0060180	Insulin receptor signaling pathway Insulin receptor binding Female mating behavior
TRXR2	Q9VNT5	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	CG11401	516	296–301 QMDGsD	0045454 0055114	Cell redox homeostasis, oxidation-reduction process
DPN	Q26263	Protein deadpan	44C bHLHe50 CG8704	435	133–138 QMDGiD	0006351 0007399 0007530 0030154 0048813	Transcription DNA-dependent, nervous system development, sex determination, cell differentiation, dendrite morphogenesis
MICAL	Q86BA1	Protein-methionine sulfoxide oxidase Mical	CG33208	4723	1742–1748 QMDGaID	0030042 0007411 0070995 0019417	Actin filament depolymerization Axon guidance NADPH oxidation Sulfur oxidation

Potential targets were identified using the consensus sequence: $Q^3[F/I/L/M]^2D^1\downarrow G^1X^2X^3$, $Q^3[F/I/L/M]^2D^1\downarrow G^1X^2X^3D^4$ and $Q^3[F/I/L/M]^2D^1\downarrow G^1X^2D^3X^4$ (for complete list, see Supplemental Table S1). Gene loci, SwissProt accession numbers, gene names, and aliases in accordance with the HUGO Gene Nomenclature Committee are given together with the amino acid sequence containing the predicted dTaspase1 cleavage site (consensus marked in bold). Gene ontology (GO) identifiers and descriptions are listed.

containing the cleavage site of histone-binding protein Caf1 (H^3Y^4) or cyclin-dependent kinase 8 (G^3L^4), resulted in their complete cleavage. As an additional example, we investigated the effects of mutating the MLL-CS2 from D^3D^4 to A^3A^4 (Supplemental Fig. S2G). As predicted from our data, we found that *Drosophila* but not human Taspase1 was still proteolytically active. Thus, these results support our finding of an extended cleavage site motif for dTaspase1 lacking amino acid specificity for positions 3' and 4'.

Evolutionary protease divergence II: Active nuclear transport and localization of dTaspase1 differ from its human relative

To investigate additional evolutionary divergence of the Taspase1 homologs, we analyzed in detail their intracellular localization and transport. Whereas protein alignment revealed high similarities in the region required for Taspase1's *cis* cleavage, we noticed that the sequence we previously identified as a functionally important

nuclear/nucleolar localization signal (NoLS) in human Taspase1 (12) is absent in *Drosophila* (Fig. 3A). Moreover, whereas the NoLS is highly conserved in all known vertebrate Taspase1 proteins, the sequence is missing in invertebrates, such as *Drosophila*. Applying 2 independent NoLS prediction tools did not identify other potential NoLS (data not shown).

The *in vivo* relevance of this finding became apparent when we studied the subcellular localization of dTaspase1 in living cells. In contrast to the nuclear/nucleolar localization of the human protease, ectopic expression of mCherry-GFP, or myc-tagged dTaspase1 in *Drosophila* S2 or human cell lines rather showed a predominantly cytoplasmic and only partial nuclear localization (Fig. 3B, C; Supplemental Fig. S2E; data not shown). Notably, quantitation of intracellular protein localization in ≥ 200 fluorescent cells confirmed that dTaspase1 was never detectable at the nucleoli (Fig. 3C). Treatment of cells with the export inhibitor

LMB did not induce nuclear accumulation dTaspase1 (Supplemental Fig. S2A), demonstrating that the localization of dTaspase1 is the result of passive diffusion rather than regulated by active transport signals, such as NLS or NES. Also, treatment with Actinomycin D, resulting in dissolution of the nucleolus, did not affect the intracellular distribution of dTaspase1 (data not shown).

Because localization and function of human Taspase1 is regulated by an Imp- α /NPM1 switch (12), we subsequently examined the interaction of dTaspase1 not only with human NPM1, but also with its *Drosophila* homolog dNLP (25). The dNLP protein is a member of the nucleophosmin/nucleoplamin family and shares $\sim 30\%$ sequence similarity with its human homologs (25) (Supplemental Fig. S1B). We recently showed that dNLP plays an important role in centromere clustering and nucleolar anchoring (25). On co-expression of dTaspase1 with dNLP-mCherry or with human NPM1-GFP, no detectable

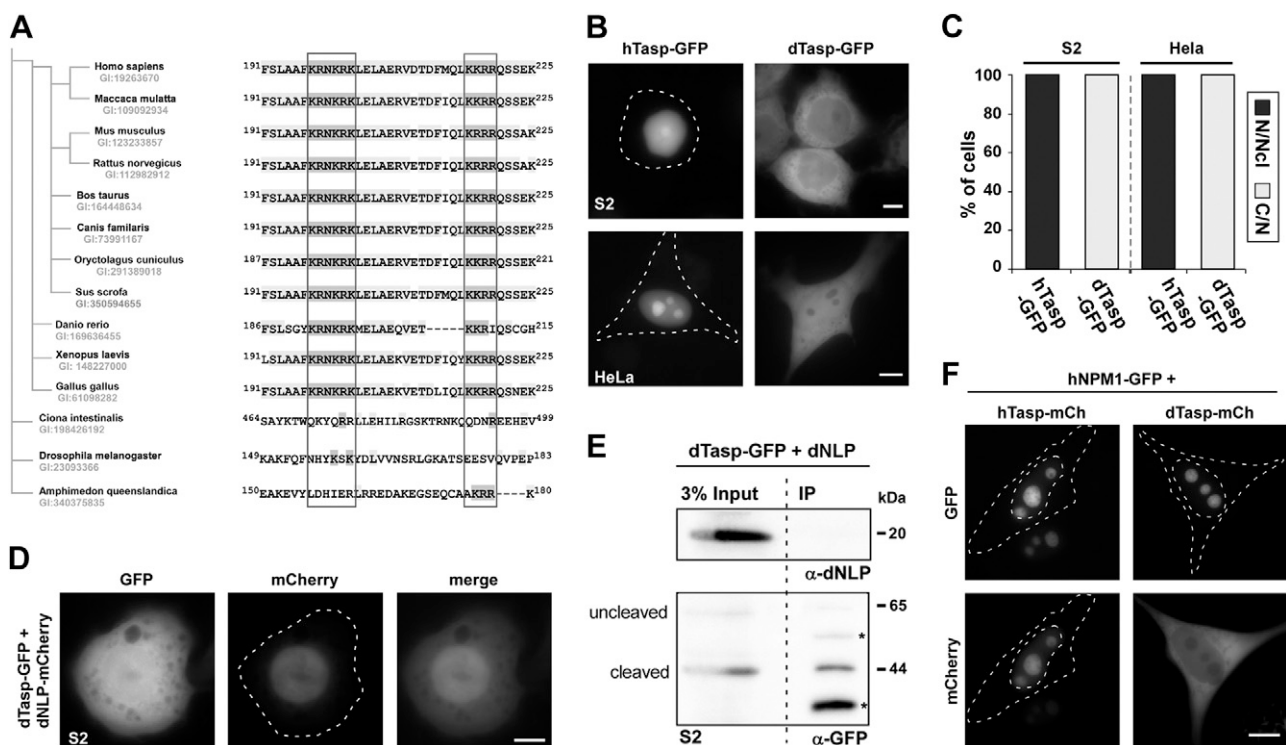


Figure 3. Active nuclear transport and localization of dTaspase1 differ from its human relative. **A**) NoLS of Taspase1 enzymes is conserved in vertebrates but lacking in invertebrates. Alignment of NoLS (boxed) in different Taspase1 homologs. Phylogram constructed on the basis of amino acid sequence homology depicting the evolutionary relationships between Taspase1 proteins of different species. Organisms, GenInfo identifier (GI), and amino acid positions are indicated. **B**) Subcellular localization of dTaspase1 differs from hTaspase1 because of the lack of NoLS. Ectopic expression of hTaspase1- and dTaspase1-GFP in the *Drosophila* S2 cell line (upper) or HeLa cells (lower). In contrast to nuclear/nucleolar localization of hTaspase1, dTaspase1 localized to the cytoplasm and nucleus. **C**) Quantification of protein localization in S2 and HeLa cells confirmed that in contrast to hTaspase1, dTaspase1 was never detectable at the nucleoli. Cells were either transfected with human or *Drosophila* Taspase1-GFP expression constructs and analyzed 24 h later. Nuclear/nucleolar (N/Ncl) or cytoplasmic/ nuclear (C/N) fluorescence was quantified in ≥ 200 transfected living cells by microscopic observation. **D–F**) dTaspase1 neither interacts with the dNLP nor with human NPM1. Scale bars: 5 μ m. Dashed lines mark nuclear/cytoplasmic cell boundaries obtained from the corresponding phase contrast images. **D**) Cotransfection of GFP-tagged dTaspase1 and dNLP-mCherry in S2 cell line revealed that both proteins did not change their subcellular localization upon co-expression. **E**) Co-immunoprecipitation assay confirms the lack of dTaspase1/dNLP protein interaction. Immunoprecipitation of S2 cell extracts cotransfected with the indicated expression constructs was carried out using α -GFP Ab-coated magnetic beads and μ -MACS columns (Materials and Methods). Proteins were identified by immunoblot using the indicated Abs. Input, total amount of cell lysate added to the immunoprecipitation reaction. *GFP-degradation products as reported (12). **F**) dTaspase1 does not colocalize at the nucleolus on overexpression of NPM1. Co-expression of human NPM1-GFP protein with human or *Drosophila* Taspase1-mCherry proteins in HeLa cells. Although hTaspase1 accumulates at the nucleoli, dTaspase1 localizes throughout the cell sparing the nucleolus.

changes in cellular distribution of dTaspase1, indicative of complex formation in living cells, could be observed (Fig. 3D, F; Supplemental Fig. S2B). We independently confirmed the lack of protein interaction biochemically by coimmunoprecipitation assays (Fig. 3E; Supplemental Fig. S2C). As a control, a strong interaction of human Taspase1 with NPM1 was verified under identical experimental conditions (Supplemental Fig. S2C).

Impairment of nuclear/nucleolar targeting affects the proteolytic activity of *Drosophila* Taspase1

These results further supported our hypothesis that *Drosophila*'s Taspase1 proteolytic function is differentially regulated and affected by transport processes. As the NoLS-mediated interaction with Imp- α and the binding to NPM1 promote and maintain rapid and efficient nuclear targeting of human Taspase1, the lack of both interactions prompted us to investigate dTaspase1's proteolytic activity. Based on our findings that the nuclear steady-state concentration of dTaspase1 is reduced compared with the human enzyme, we expected that dTaspase1 should be less active in processing nuclear substrates. As shown in Fig. 4A, we indeed found that dTaspase1 showed reduced proteolytic activity compared with the human homolog for the nuclear substrate USF2. In case our hypothesis was correct, we reasoned that restoration of nuclear import and NPM1 interaction in dTaspase1 should, at least partially, restore dTaspase1's ability to efficiently process nuclear substrates. Hence, we genetically introduced the importin/NPM1 interaction domain into dTaspase1 (Fig. 4B). Indeed, on ectopic expression in *Drosophila* and human cells, this humanized dTaspase1-NoLS protein not only localized predominantly to the nucleus but also revealed an efficient nucleolar targeting (Fig. 4B; Supplemental Fig. S2D). Moreover, we found dTaspase1-NoLS to be more active in processing the nuclear substrate USF2 compared with WT dTaspase1 lacking the efficient nuclear/nucleolar targeting sequence (Fig. 4C; USF forms are marked by asterisks). Collectively, these results strongly support our conclusion that in contrast to invertebrates, the Imp- α /NPM1 axis has evolved in vertebrates as a transport-based evolutionary mechanism to fine-tune the proteolytic cleavage activity of Taspase1 (Fig. 4D).

DISCUSSION

Besides their numerous physiologic functions, protease deregulation often contributes to disease development that could be treated by specific inhibitors (5, 41, 42). However, many protease inhibitors failed in the clinics for multiple reasons (5). One prerequisite to potentially improve clinical success is to deepen our holistic knowledge of a protease's mechanistic function to understand how its activity and degradome are involved in health and disease pathways.

Besides the structure of a protease's catalytic site and its chemical proteolytic mechanism, additional functional and structural domains contribute to the (fine) regulation of the enzyme's biologic activity and impact on cellular homeostasis and/or the survival advantage of tumors as

a micro-organ. In general, it is assumed that changes in the molecular structure have accompanied the evolution of proteolytic enzymes from more primitive organisms, serving relatively primitive functions, to the diverse and more complex functions that they fulfill in humans. Hence, uncovering such structural adaptations during evolution may deepen our understanding of the full repertoire of proteases' functional regulation allowing the development of more potent targeting strategies.

Sequences encoding Taspase1 enzymes have been conserved in vertebrates and insects but not in the worm *Caenorhabditis elegans* (9, 22). As both proteins, MLL and Trx, are developmental regulators in vertebrates and insects, these are also *bona fide* Taspase1 targets, albeit *Drosophila* Taspase1 seems to be more active on its cognate Trx substrate (22). Nevertheless these studies strongly suggested a close coevolution of these enzymes, including their degradomes, as well as their structure-activity relationships (9, 22).

Thus, it was indeed unexpected that when analyzing the function of *Drosophila* Taspase1, we uncovered significant differences in its localization and substrate recognition. For one, we not only verified that the predicted threonine¹⁹⁵ is the essential nucleophile in dTaspase1 for *cis* cleavage, but also found that the target cleavage motif for dTaspase1 ($Q^3[F/I/L/M]^2D^1\downarrow G^1x^2x^3$) is more flexible compared with the human ortholog ($Q^3[F,I,L,V]^2D^1\downarrow G^1x^2x^3D^4/D^3x^4$), implying an enlarged degradome in *Drosophila*. As dTaspase1 is an aspartase, Asp at the P1 position is mandatory for cleavage, and the unique chemical characteristics of Gly at P1' do not tolerate its replacement by Ala. Also, Gln at position P3 is required for substrate recognition, and substitution of this uncharged polar amino acid with the smaller hydrophobic residue Ala or the similar amino acid Asn completely blocks *trans* cleavage. Similar to the human enzyme, position P2 is also critical for function (10, 12). Although Met, present in the Trx cleavage site, can be substituted by hydrophobic residues of similar size (Phe, Ile, or Leu), other amino acids such as the smaller hydrophobic amino acid Ala are not tolerated. Hence, hydrophobicity in combination with size is required for productive cleavage. Whereas in both enzymes, position P2' is highly flexible, specific residues at positions P3' and P4' seem to be only required for human Taspase1 (10, 12), explaining why the human Taspase1 degradome is much more restricted. In contrast to previous predictions (9, 22), the identified cleavage motif for dTaspase1 strongly implies an enlarged degradome containing 70 potential substrates in *Drosophila* in contrast to the rather limited 27 targets predicted for humans (13). As knowledge of a protease's degradome is key to understanding its biologic relevance, our findings suggest that Taspase1 may modulate additional pathways in *Drosophila*. The obtained list of the 70 most likely Taspase1 targets in *Drosophila* not only contains known Taspase1 substrates such as Trx or the transcription factor TFIIA but also several candidates, which thus far have not been considered as potential targets for this protease (Supplemental Table S1). Moreover, our results also provide an explanation for previous findings. It was shown that the host cell factor is cleaved by *Drosophila* Taspase1 but not by the human ortholog (22). Based on the cleavage motif defined here, only the

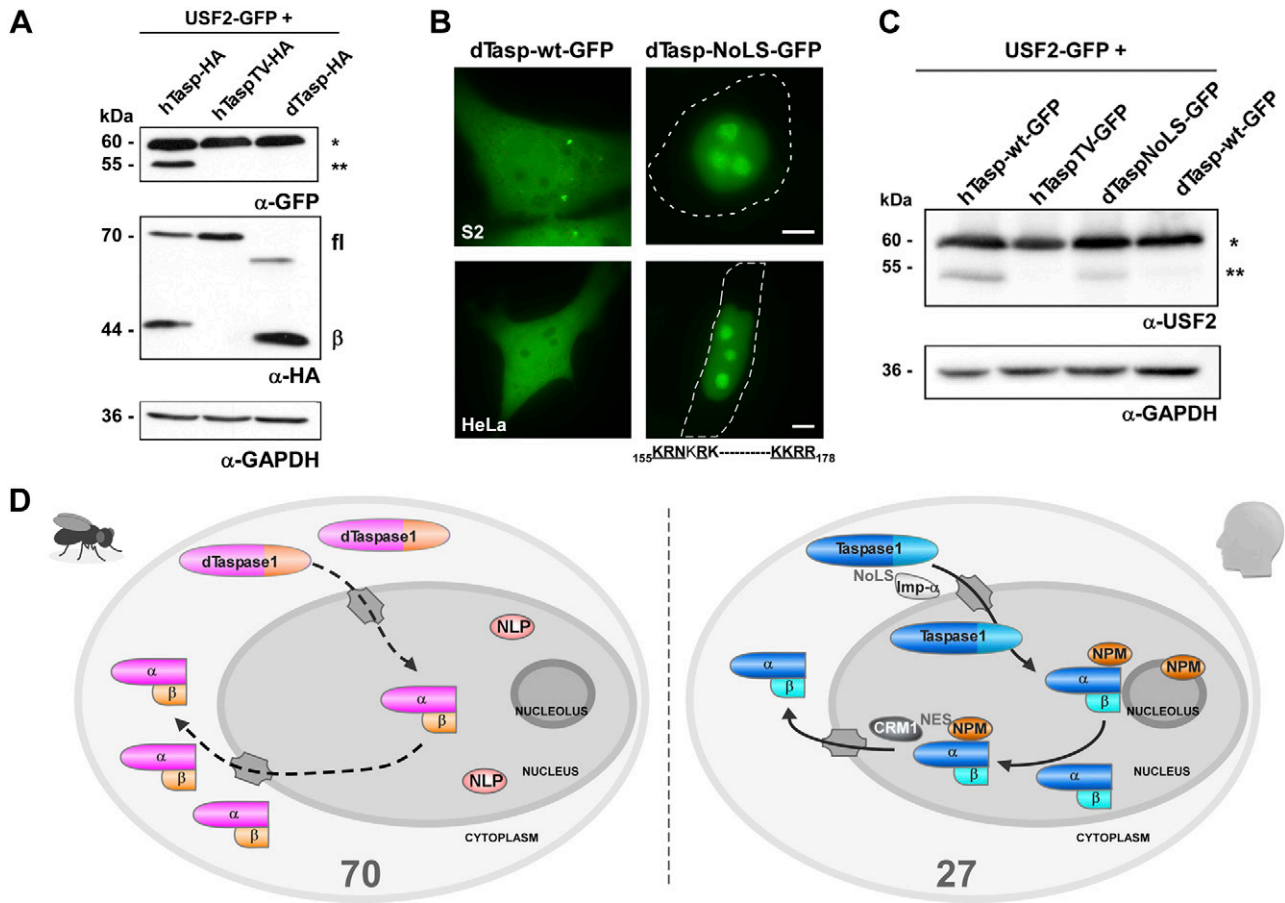


Figure 4. Impairment of nuclear/nucleolar targeting affects the proteolytic activity of *Drosophila* Taspase1. A) Compared with the human homolog, dTaspase1 is less active in cleaving the nuclear substrate USF2. Immunoblot demonstrates that USF2 was inefficiently processed by dTaspase1 compared with hTaspase1. Catalytically inactive hTaspase1^{T234V} mutant (hTaspTV) served as the negative control. 293T cells were transfected with USF2-GFP together with the indicated Taspase1 expression plasmids. Expression of proteins and cleavage products was visualized using α-GFP and -HA Ab. GAPDH served as loading control. *Full-length USF2-GFP protein; **USF2-GFP cleavage fragment; fl, Taspase1-GFP full-length protein; β, Taspase1 β-subunit GFP. Molecular weight of proteins is indicated. B) Introduction of the NoLS restores nucleolar targeting of dTaspase1. Localization in living S2 or HeLa transfectants was analyzed by fluorescence microscopy. Mutation of dTaspase1 amino acids into the NoLS is indicated; critical amino acids are underlined. Scale bars, 5 μm. C) Nuclear/nucleolar targeting of dTaspase1 increases its proteolytic activity against the nuclear substrate USF2. Immunoblot analysis demonstrates that dTaspase1-NoLS was more active in processing USF2 compared with WT dTaspase1. Cells were transfected with USF2-GFP together with the indicated Taspase1 expression plasmids. Expression of proteins and cleavage products was visualized using α-GFP and -HA Ab. GAPDH served as loading control. *Uncleaved USF2-GFP protein; **USF2-GFP cleavage products; fl, Taspase1-GFP full-length protein; β, Taspase1 β-subunit GFP. D) Model illustrating how the importin-α/NPM1 axis was acquired during evolution from invertebrates (left) to vertebrates (right) as a transport-based mechanism to fine-tune the proteolytic activity of Taspase1. In invertebrates, Taspase1's intracellular localization is not actively regulated by transport signals. Hence, not only the proenzyme but also the active protease localizes to the cytoplasm and the nucleus, allowing the processing of an enlarged degradome (70 predicted targets). Lack of the NoLS prevents active nuclear accumulation and interaction with nucleolar proteins, resulting in reduced nuclear concentration of the enzyme and thus reduced proteolytic processing of nuclear substrates. In contrast, all vertebrate Taspase1 proteins acquired the highly conserved NoLS, mediating efficient nuclear transport *via* the importin-α/β-axis. Autoproteolytic *in situ* processing of the proenzyme results in protease activation and binding to the nucleolar NPM1 protein, critical for the efficient cleavage of nuclear targets. Taspase1 exploits the CRM1-mediated nuclear export activity of NPM1 to gain transient access to the cytoplasm to process cytoplasmic substrates. Number of predicted Taspase1 substrates is indicated.

flexibility of *Drosophila* Taspase1 permits recognition and processing of the host cell factor protein, in contrast to the restricted human enzyme. However, *in silico* experiments and predictions of a protease's degradome obtained by systematic biochemical methods, such as proteomics, have to be confirmed in detail for each of the proposed targets. Clearly, future studies need to investigate whether the predicted targets are indeed cleaved by dTaspase1 and what are the biologic consequences thereof.

Overall, the structure of Taspase1 enzymes allowing substrate recognition and *trans* cleavage seem to differ among these ortholog proteases. Because to date no effective active site-directed inhibitors are available for human Taspase1, we suggest that resolving the structure of *Drosophila* Taspase1 may provide additional mechanistic insights, potentially aiding the rational design of inhibitory compounds for the human enzyme. However, our findings also advise caution. Although *Drosophila* is an important

TABLE 2. Overview of proteases in humans and *Drosophila* for which (active) nuclear transport/localization was suggested

Protease		Nuclear transport mechanism	Nuclear transport signal	Reference
Human	<i>Drosophila</i> homologs			
hTaspase1		Imp- α /NPM1 switch	NLS/NoLS	(12)
	dTaspase1	—	—	This work
MMP-12		?	—	(6)
SENPs		Signal-dependent transport	NLS/NoLS	(48)
	DmUlp1	?	?	(49)
Cath-D		Interaction with nuclear proteins?	—	(50)
	cathD (lysosomal/extracellular)	—	—	(51)
GranzymeA		Via perforin	—	(52)
Cath-L (isoform)		Indirect (loss of ER-signal)	—	(53)
	cathL/Cp1 (lysosomal/fusome)	—	—	(54)

model organism, results or targeting strategies obtained for *Drosophila* Taspase1 may not be directly translatable to the human enzyme.

During evolution, eukaryotes have acquired an additional way of controlling a protease's degradome by regulating its (dynamic) localization to specific cellular compartments. Depending on their biological function proteases are thus secreted, found on the outside of the cell membrane (43), in the mitochondria (44), the cytoplasm, in the nucleus as well as at the nucleolus (10, 12, 45–47). However, inspection of the literature reveals that there are only a few examples of proteases in humans, and even less in *Drosophila*, for which active nuclear transport and localization have been unambiguously shown. However, protease signaling may be combined with active nucleo-cytoplasmic transport, allowing an additional level of regulatory complexity (Table 2) (12). Strikingly, for the classic membrane-associated proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases, it was recently shown that even these proteases can execute biologically relevant functions in the nucleus (6). However, with the exception of Taspase1 and SUMO-specific proteases (SENPs) in humans, the detailed mechanisms mediating active nuclear transport and localization are not completely resolved (Table 2). Eukaryotes do have the molecular repertoire to combine protease signaling with active nucleo-cytoplasmic transport. However, previous examples demonstrating that such mechanisms have indeed been acquired or lost during evolution were to our knowledge missing. In addition to the evolutionary protease divergence concerning the enlarged degradome of dTaspase1, we found that, in *Drosophila*, active nuclear transport and regulated localization of Taspase1 differ from its human relative. In fact, protein alignment revealed that the functionally important NoLS, which is highly conserved in all known vertebrate Taspase1 proteins, is absent in *Drosophila* and other species. Such divergence has implications on protease function. For one, dTaspase1 shows no distinct localization to the nucleus/nucleolus and fails to interact with the nucleoplasmin-like protein from *Drosophila* or with human NPM1. Clearly, in contrast to vertebrate Taspase1 enzymes, the subcellular localization of dTaspase1 is the result of passive diffusion rather than being regulated by active transport signals and protein interaction motifs. Second, as the NoLS-mediated interaction with Imp- α and the binding to NPM1 maintains high nuclear concentration of human Taspase1, the lack of both interactions explains why

dTaspase1 is less active in processing nuclear substrates. Here, we wish to emphasize that not all nucleolar localization signals, identified in a variety of regulatory proteins, such as NPM1, ARF, or p53, are capable of mediating both active nuclear import and nucleolar localization.

Based on our findings for Taspase1, we therefore suggest a model of how the Imp- α /NPM1 axis was acquired during evolution from invertebrates to vertebrates as a transport-based mechanism to fine-tune the proteolytic function of Taspase1 enzymes (Fig. 4D). In invertebrates, such as flies, Taspase1's intracellular localization is not actively regulated by transport signals. Hence, not only the proenzyme but also the active protease localizes to the cytoplasm and the nucleus, allowing the processing of an enlarged degradome, potentially required in these species. Lack of the NoLS precludes active nuclear accumulation and interaction with nucleolar proteins, resulting in a lower nuclear protease concentration and thus reduced proteolytic processing of nuclear substrates. In contrast, all vertebrate Taspase1 proteins acquired the highly conserved NoLS, mediating efficient nuclear transport *via* the Imp- α / β axis. Autoproteolytic *cis* processing of the proenzyme results in the active protease and binding to the nucleolar NPM1 protein, which is critical for the efficient cleavage of nuclear targets. Human Taspase1 further exploits the CRM1-mediated nuclear export activity of NPM1 to gain transient access to the cytoplasmic compartment to also process cytoplasmic substrates. However, besides increasing the protease's steady-state concentration in a given subcellular compartment, it is not known whether, particularly for human Taspase1, its nucleolar localization and NPM1 interaction are also fine-tuning the enzyme's proteolytic activity *per se*.

Collectively, our study describes a hitherto unknown evolutionary principle of how a protease exploits a transport-based mechanism to fine-tune its degradome and proteolytic activity in different species. However, we emphasize that both of our findings, the broader substrate specificity and difference in localization of the *Drosophila* enzyme, are interconnected and thus contribute to the protease's biologic functions. Although we are well aware that further experimental confirmation is required, it is suffice to hypothesize that the principle identified here is of general biologic relevance. We propose that divergent transport-based mechanisms have evolved for other regulatory proteins in different species, supporting the adaption of multicellular organisms to master evolutionary challenges. [F]

The authors thank Sandra Friedl for excellent technical assistance. This work was supported by Fritz Thyssen Stiftung, MAIFOR Mainz Support Program, Zeiss Foundation, and Interdisziplinärer Arbeitskreis (IAK) ChemBioMed. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **42**, D503–D509
- Fortelny, N., Cox, J. H., Kappelhoff, R., Starr, A. E., Lange, P. F., Pavlidis, P., and Overall, C. M. (2014) Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS Biol.* **12**, e1001869
- Buller, A. R., and Townsend, C. A. (2013) Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, E653–E661
- Overall, C. M., and Dean, R. A. (2006) Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 69–75
- Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799
- Marchant, D. J., Bellac, C. L., Moraes, T. J., Wadsworth, S. J., Dufour, A., Butler, G. S., Bilawchuk, L. M., Hendry, R. G., Robertson, A. G., Cheung, C. T., Ng, J., Ang, L., Luo, Z., Heilbron, K., Norris, M. J., Duan, W., Bucyk, T., Karpov, A., Devel, L., Georgiadis, D., Hegele, R. G., Luo, H., Granville, D. J., Dive, V., McManus, B. M., and Overall, C. M. (2014) A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nat. Med.* **20**, 493–502
- Beck, P., Dubiella, C., and Groll, M. (2012) Covalent and non-covalent reversible proteasome inhibition. *Biol. Chem.* **393**, 1101–1120
- Knauer, S. K., Fetzer, V., Rabenstein, J., Friedl, S., Hofmann, B., Sabiani, S., Schröder, E., Kunst, L., Proschak, E., Thines, E., Kindler, T., Schneider, G., Marschalek, R., Stauber, R. H., and Bier, C. (2011) Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors. *PLoS ONE* **6**, e18253
- Hsieh, J. J., Cheng, E. H., and Korsmeyer, S. J. (2003) Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**, 293–303
- Bier, C., Hecht, R., Kunst, L., Scheiding, S., Wünsch, D., Goesswein, D., Schneider, G., Krämer, O. H., Knauer, S. K., and Stauber, R. H. (2012) Overexpression of the catalytically impaired Taspase1 T234V or Taspase1 D233A variants does not have a dominant negative effect in T(4;11) leukemia cells. *PLoS ONE* **7**, e34142
- Bier, C., Knauer, S. K., Wünsch, D., Kunst, L., Scheiding, S., Kaiser, M., Ottmann, C., Krämer, O. H., and Stauber, R. H. (2012) Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization in vivo. *FASEB J.* **26**, 3421–3429
- Bier, C., Knauer, S. K., Docter, D., Schneider, G., Krämer, O. H., and Stauber, R. H. (2011) The importin-alpha/nucleophosmin switch controls taspase1 protease function. *Traffic* **12**, 703–714
- Bier, C., Knauer, S. K., Klapthor, A., Schweitzer, A., Reikik, A., Krämer, O. H., Marschalek, R., and Stauber, R. H. (2011) Cell-based analysis of structure-function activity of threonine aspartase 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 3007–3017
- Chen, D. Y., Liu, H., Takeda, S., Tu, H. C., Sasagawa, S., Van Tine, B. A., Lu, D., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2010) Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protein that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res.* **70**, 5358–5367
- Zhou, H., Spicuglia, S., Hsieh, J. J., Mitsiou, D. J., Høiby, T., Veenstra, G. J., Korsmeyer, S. J., and Stunnenberg, H. G. (2006) Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2728–2735
- 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
- Chen, D. Y., Lee, Y., Van Tine, B. A., Searleman, A. C., Westergard, T. D., Liu, H., Tu, H. C., Takeda, S., Dong, Y., Piwnica-Worms, D. R., Oh, K. J., Korsmeyer, S. J., Hermone, A., Gussio, R., Shoemaker, R. H., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2012) A pharmacologic inhibitor of the protease Taspase1 effectively inhibits breast and brain tumor growth. *Cancer Res.* **72**, 736–746
- Wünsch, D., Fetzer, V., Heider, D., Tenzer, S., Bier, C., Kunst, L., Knauer, S., and Stauber, R. (2012) Chemo-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of threonine aspartase-1. *Blood Cancer J* **2**, e7
- Stauber, R. H., Bier, C., and Knauer, S. K. (2012) Targeting Taspase1 for cancer therapy—letter. *Cancer Res.* **72**, 2912, author reply 2913
- Pandey, U. B., and Nichols, C. D. (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **63**, 411–436
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993) A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**, 179–191
- Capotosti, F., Hsieh, J. J., and Herr, W. (2007) Species selectivity of mixed-lineage leukemia/trithorax and HCF proteolytic maturation pathways. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7063–7072
- Knauer, S. K., Heinrich, U. R., Bier, C., Habtemichael, N., Docter, D., Helling, K., Mann, W. J., and Stauber, R. H. (2010) An otoprotective role for the apoptosis inhibitor protein survivin. *Cell Death Dis.* **1**, e51
- Fetzer, V., Knauer, S. K., Bier, C., von Kries, J. P., and Stauber, R. H. (2009) Translocation Biosensors - Cellular System Integrators to Dissect CRM1-Dependent Nuclear Export by Chemicogenomics. *Sensors (Basel)* **9**, 5423–5445
- Padeken, J., Mendiburo, M. J., Chlamydas, S., Schwarz, H. J., Kremmer, E., and Heun, P. (2013) The nucleoplasmic homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleolus. *Mol. Cell* **50**, 236–249
- Habtemichael, N., Heinrich, U. R., Knauer, S. K., Schmidtman, I., Bier, C., Docter, D., Brochhausen, C., Helling, K., Brieger, J., Stauber, R. H., and Mann, W. J. (2010) Expression analysis suggests a potential cytoprotective role of Birc5 in the inner ear. *Mol. Cell. Neurosci.* **45**, 297–305
- Docter, D., Distler, U., Storck, W., Kuharev, J., Wünsch, D., Hahlbrock, A., Knauer, S. K., Tenzer, S., and Stauber, R. H. (2014) Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. *Nat. Protoc.* **9**, 2030–2044
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetzer, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., and Stauber, R. H. (2013) Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 772–781
- Knauer, S. K., Bier, C., Schlag, P., Fritzmann, J., Dietmaier, W., Rödel, F., Klein-Hitpass, L., Kovács, A. F., Döring, C., Hansmann, M. L., Hofmann, W. K., Kunkel, M., Brochhausen, C., Engels, K., Lippert, B. M., Mann, W., and Stauber, R. H. (2007) The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* **6**, 1502–1509
- Knauer, S. K., and Stauber, R. H. (2005) Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells. *Anal. Chem.* **77**, 4815–4820
- Knauer, S. K., Moodt, S., Berg, T., Liebel, U., Pepperkok, R., and Stauber, R. H. (2005) Translocation biosensors to study signal-specific nucleo-cytoplasmic transport, protease activity and protein-protein interactions. *Traffic* **6**, 594–606
- Knauer, S. K., Krämer, O. H., Knösel, T., Engels, K., Rödel, F., Kovács, A. F., Dietmaier, W., Klein-Hitpass, L., Habtemichael, N., Schweitzer, A., Brieger, J., Rödel, C., Mann, W., Petersen, I., Heinzl, T., and Stauber, R. H. (2007) Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB J.* **21**, 207–216
- Jun, L., Frints, S., Duhamel, H., Herold, A., Abad-Rodriguez, J., Dotti, C., Izaurralde, E., Marynen, P., and Froyen, G. (2001) NXF5, a novel member of the nuclear RNA export factor family, is lost in a male patient with a syndromic form of mental retardation. *Curr. Biol.* **11**, 1381–1391

34. van Deursen, D., van Leeuwen, M., Vaulont, S., Jansen, H., and Verhoeven, A. J. (2009) Upstream Stimulatory Factors 1 and 2 activate the human hepatic lipase promoter via E-box dependent and independent mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 229–237
35. Rosorius, O., Heger, P., Stelz, G., Hirschmann, N., Hauber, J., and Stauber, R. H. (1999) Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells. *Biotechniques* **27**, 350–355
36. Schlingemann, J., Habtemichael, N., Itrich, C., Toedt, G., Kramer, H., Hambek, M., Knecht, R., Lichter, P., Stauber, R., and Hahn, M. (2005) Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles. *Lab. Invest.* **85**, 1024–1039
37. Fetz, V., Bier, C., Habtemichael, N., Schuon, R., Schweitzer, A., Kunkel, M., Engels, K., Kovács, A. F., Schneider, S., Mann, W., Stauber, R. H., and Knauer, S. K. (2009) Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin. *Int. J. Cancer* **124**, 2033–2041
38. Krämer, O. H., Knauer, S. K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K. H., Stauber, R. H., Böhmer, F. D., and Heinzel, T. (2009) A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev.* **23**, 223–235
39. Cokol, M., Nair, R., and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* **1**, 411–415
40. Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **284**, 478–485
41. Drag, M., and Salvesen, G. S. (2010) Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701
42. Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., and Ehrmann, M. (2011) HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 152–162
43. Ugalde, A. P., Ordóñez, G. R., Quirós, P. M., Puente, X. S., and López-Otín, C. (2010) Metalloproteases and the degradome. *Methods Mol. Biol.* **622**, 3–29
44. Koppen, M., Bonn, F., Ehses, S., and Langer, T. (2009) Autocatalytic processing of m-AAA protease subunits in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4216–4224
45. Belanger, K. D., Walter, D., Henderson, T. A., Yelton, A. L., O'Brien, T. G., Belanger, K. G., Geier, S. J., and Fahrenkrog, B. (2009) Nuclear localisation is crucial for the proapoptotic activity of the HtrA-like serine protease Nma111p. *J. Cell Sci.* **122**, 3931–3941
46. Blink, E. J., Jiansheng, Z., Hu, W., Calanni, S. T., Trapani, J. A., Bird, P. I., and Jans, D. A. (2005) Interaction of the nuclear localizing cytolitic granule serine protease granzyme B with importin alpha or beta: modulation by the serpin inhibitor PI-9. *J. Cell. Biochem.* **95**, 598–610
47. Yun, C., Wang, Y., Mukhopadhyay, D., Backlund, P., Kolli, N., Yergey, A., Wilkinson, K. D., and Dasso, M. (2008) Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *J. Cell Biol.* **183**, 589–595
48. Yeh, E. T. (2009) SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J. Biol. Chem.* **284**, 8223–8227
49. Smith, M., Bhaskar, V., Fernandez, J., and Courey, A. J. (2004) Drosophila Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates. *J. Biol. Chem.* **279**, 43805–43814
50. Masson, O., Bach, A. S., Derocq, D., Prébois, C., Laurent-Matha, V., Pattingre, S., and Liaudet-Coopman, E. (2010) Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie* **92**, 1635–1643
51. Eissenberg, J. C., Ilvarsson, A. M., Sly, W. S., Waheed, A., Krzyzanek, V., Pohlmann, R., Waschkau, D., Kretzschmar, D., and Dennes, A. C. (2011) Drosophila GGA model: an ultimate gateway to GGA analysis. *Traffic* **12**, 1821–1838
52. Jans, D. A., Briggs, L. J., Jans, P., Froelich, C. J., Parasivam, G., Kumar, S., Sutton, V. R., and Trapani, J. A. (1998) Nuclear targeting of the serine protease granzyme A (fragmentin-1). *J. Cell Sci.* **111**, 2645–2654
53. Goulet, B., Baruch, A., Moon, N. S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogoy, M., and Nepveu, A. (2004) A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell* **14**, 207–219
54. Lighthouse, D. V., Buszczak, M., and Spradling, A. C. (2008) New components of the Drosophila fusome suggest it plays novel roles in signaling and transport. *Dev. Biol.* **317**, 59–71

Received for publication September 9, 2014.
Accepted for publication December 29, 2014.

3.2.2 Evolutionary divergence of Threonine Aspartase1 leads to species-specific substrate recognition

Désirée Wünsch, Angelina Hahlbrock, Christina Heiselmayer, Sandra Bäcker, Christian Schrenk, Franziska Benne, Oliver Schilling, and Shirley K. Knauer. *Biological Chemistry (in press)*; doi: 10.1515/hsz-2014-0318.

Zusammenfassung

In verschiedenen Insekten- und Vertebraten-Klassen bis hin zur Maus und dem Menschen wurden konservierte Taspase1-Orthologe identifiziert. Ihre Rolle für die über die MLL-Spaltung vermittelte *HOX*-Gen-Expressionskontrolle weist auf eine Koevolution von Taspase1 und MLL/Trithorax-Proteinen zum Zeitpunkt der Entstehung komplexer Organismen hin. Detaillierte Untersuchungen zu diesem Thema fehlten jedoch bislang. Im Rahmen dieser Studie konnten wir mit Hilfe aktiver und inaktiver Taspase1-Varianten genauere Erkenntnisse zur Substraterkennung und Spaltung-Spezifität der humanen und *Drosophila* Taspase1 (dTaspase1) erlangen.

Zunächst wurde der von uns entwickelte Biosensor-Assay zur Messung der dTaspase1-Aktivität in Zellmodellen unterschiedlicher Spezies herangezogen. Dabei zeigte die *Drosophila* Taspase1 eine bevorzugte Spaltung von Substraten, welche ein QLDG-Motiv ähnlich der 2. Spaltsequenz von MLL (*CS2-like*) innerhalb der vorhergesagten Spaltungsregion enthalten. Eine Ausnahme bildete dabei lediglich der Transkriptionsfaktor USF2, welcher trotz eines entsprechenden *CS2-like* Spaltungsmotivs nicht von dTaspase1 prozessiert werden konnte. Somit spielen neben der spezifischen Spaltungssequenz noch weitere Faktoren wie Protein-Kontext und Lokalisation bei der Substraterkennung und -Umsetzung eine Rolle. Im Gegensatz zu der sehr stringenten Spaltungssequenz der humanen Taspase1 ($Q^3[FILV]^2D^1\downarrow G^1x^2[x^3D^4/D^3x^4]$) wurde ein weitaus umfassenderes Erkennungsmotiv für die dTaspase1 ($[FILMW]^2D^1\downarrow G^1x^2x^3$) charakterisiert, welches vor allem an Positionen P^3 , P^2 , P^3 and P^4 vom humanen Motiv abweicht.

Zudem konnte eine Spezies-spezifische Substrat-Selektivität beider Enzyme bezüglich des natürlichen Substrates TFIIA nachgewiesen werden. So kann dTaspase1 *Drosophila* TFIIA, nicht jedoch das humane Ortholog spalten und umgekehrt. Da sich beide TFIIA-Orthologe lediglich an Position P^2 des Sequenzmotivs unterscheiden, verdeutlicht dies die Bedeutung des umgebenden strukturellen Protein-Kontextes für eine effektive proteolytische Umsetzung durch Taspase1. Dabei können verschiedene Faktoren wie etwa differentielle post-translationale Modifikationen in angrenzenden Proteinbereichen an der Regulation der Spaltungsselektivität beteiligt sein. So handelt es sich bei TFIIA um ein beispielhaftes Taspase1-Substrat, für welches die Protease trotz geringer Abweichungen innerhalb der

Spaltungssequenz eine stringente Spezies-Spezifität besitzt. Im Gegensatz dazu zeigte die Studie zudem, dass *Drosophila* USF2 weder ein vorhergesagtes, noch ein tatsächliches Zielprotein der dTaspase1 ist. Die Präferenz für unterschiedliche Sequenzmotive scheint dabei unabhängig von einer Heterokomplex-Bildung der dTaspase1 zu sein, da diese analog zu humaner Taspase1 in lebenden Zellen überwiegend als $\alpha\beta$ -Monomer vorliegt.

Zusammenfassend liefert diese Studie neue Einblicke in evolutionäre Gemeinsamkeiten wie auch Divergenzen zwischen verschiedenen Threonin Aspartase1-Homologen. Diese Erkenntnisse können sich schlussendlich als hilfreich für ein besseres Verständnis und somit ein erfolgreiches *Targeting* der Protease in malignen Erkrankungen erweisen.

Désirée Wunsch, Angelina Hahlbrock, Christina Heiselmayer, Sandra Bäcker, Christian Schrenk, Franziska Benne, Oliver Schilling and Shirley K. Knauer*

Evolutionary divergence of Threonine Aspartase1 leads to species-specific substrate recognition

Abstract: Proteases are key regulators of life. Human Threonine Aspartase1 processes substrates, such as the mixed-lineage leukemia (MLL) protein, containing two cleavage sites, CS1 and CS2. Likewise, MLL's *Drosophila* ortholog trithorax is cleaved by *Drosophila* Threonine Aspartase1 (dTasp), suggesting a mechanistic coevolution. However, a detailed analysis of dTasp's function was missing so far. Here, active and inactive dTasp mutants allowed to compare substrate recognition and cleavage site selectivity of human and *Drosophila* enzymes. In contrast to the human protease, our cell-based assay revealed a preferential processing of CS2-like (QLD↓Gx[xD/Dx]) targets for dTasp, whereas cleavage of CS1-like targets (QVD↓Gx[xD/Dx]) was significantly impaired. Systematic mutagenesis of the CS2 sequence defined the motif x[FILMW]D↓Gx[xD/Dx] as the consensus cleavage sequence for dTasp. Substrate species selectivity of the enzymes was uncovered by demonstrating that dTasp cleaves *Drosophila* TFIIA, but not the human ortholog, suggesting evolutionary divergence of TFIIA downstream networks. Also, *Drosophila* USF2 was neither predicted nor cleaved by dTasp. Moreover, we found that dTasp cleavage site selectivity is independent of heterocomplex formation, as dTasp exists predominantly as an $\alpha\beta$ -monomer. Collectively, we provide novel insights into evolutionary similarities and divergence concerning Threonine Aspartase1 function in different species, which may aid to dissect and better target human Threonine Aspartase1 in malignancies.

Keywords: *Drosophila*; fly; MLL; TFIIA; Trx; USF2.

DOI 10.1515/hsz-2014-0318

Received December 20, 2014; accepted February 02, 2015; previously published online February 4, 2015

Introduction

The human *threonine aspartase 1* gene encodes a protein of 420 amino acids (aa), representing the proenzyme of the protease. It belongs to a family of enzymes possessing an asparaginase-2 homology domain. In contrast to the other exclusively *cis*-active type 2 asparaginases, only Threonine Aspartase1 is able to cleave other substrates in *trans* at a conserved peptide motif with an aspartate in position P1 (Hsieh et al., 2003). Thus, the discovery of Threonine Aspartase1 founded a new class of endopeptidases that utilize the N-terminal threonine of its mature β -subunit as the active site. This N-terminal threonine (Thr²³⁴) is generated by autoproteolysis of the Threonine Aspartase1 proenzyme (referred to as *cis*-cleavage) into the two subunits α and β , which initially have been thought to assemble into an asymmetric α_2/β_2 -heterotetramer, representing the active protease (Khan et al., 2005).

Threonine Aspartase1 was first identified as the protease responsible for the cleavage of the mixed lineage leukemia (MLL) protein at conserved (Q³x²D¹G¹) sites (Hsieh et al., 2003). Besides its relevance for proper *Hox* gene expression, MLL is found as a translocation partner in a variety of acute leukemias and hence is considered as a proto-oncogene (Hsieh et al., 2003; Meyer et al., 2006; Takeda et al., 2006; Marschalek, 2010). Thus, proteolytic cleavage of MLL-fusion proteins by Threonine Aspartase1 is considered a critical step for MLL-mediated tumorigenesis, although the molecular details are not yet completely resolved (Hsieh et al., 2003; Takeda et al., 2006; Liu et al., 2007). Notably, Threonine Aspartase1's catalytic activity is not affected by common protease inhibitors. Moreover, neither effective small molecule nor genetic inhibitors such as *trans*-dominant mutants are available for this

*Corresponding author: Shirley K. Knauer, Institute for Molecular Biology II, Centre for Medical Biotechnology (ZMB), Mainz Screening Center UG & Co. KG, University of Duisburg-Essen, D-45141 Essen, Germany, e-mail: shirley.knauer@uni-due.de.
<http://orcid.org/0000-0003-4321-0924>

Désirée Wunsch, Angelina Hahlbrock, Christian Schrenk and Franziska Benne: Molecular and Cellular Oncology, ENT, University Medical Center Mainz, Langenbeckstr. 1, D-55101 Mainz, Germany

Christina Heiselmayer and Sandra Bäcker: Institute for Molecular Biology II, Centre for Medical Biotechnology (ZMB), Mainz Screening Center UG & Co. KG, University of Duisburg-Essen, D-45141 Essen, Germany

Oliver Schilling: Institute for Molecular Medicine and Cell Research, University of Freiburg, D-79104 Freiburg, Germany

protease, counteracting to further dissect Threonine Aspartase1's (patho)biological functions *in vivo* (Hsieh et al., 2003; Khan et al., 2005; Chen et al., 2010; Knauer et al., 2011; Stauber et al., 2012; Wunsch et al., 2012; van den Boom et al., 2014).

The fruit fly *Drosophila melanogaster* has been extensively used as a model organism. Many basic biological functions and pathways are conserved between mammals and *Drosophila*, and human disease-causing genes are believed to have a functional homolog in the fly (Pandey and Nichols, 2011). One of the most important contributions of fly-based research to the study of cancer biology was the elucidation of the Ras signaling cascade >20 years ago in the fly visual system (Simon et al., 1991; Olivier et al., 1993).

After demonstrating that Threonine Aspartase1 is responsible for the catalytic cleavage of the MLL protein, it was hypothesized that the MLL homolog in *Drosophila*, called trithorax (Trx), could be similarly processed by a homolog protease. This idea was also supported by the fact that the trithorax protein sequence contains an MLL-CS2-like recognition site (Trx: $_{aa2232}QMD\downarrow GVDD_{2238}$) for Threonine Aspartase1 cleavage. Actually, it could be shown that Trx is proteolytically cleaved by the homolog *Drosophila* Threonine Aspartase1 protease (dTasp) (Capotosti et al., 2007). Hence, an identical coevolution of molecular mechanisms among these taxa was postulated, including cleavage site specificity regulating Threonine Aspartase1's proteolytic activity (Hsieh et al., 2003; Capotosti et al., 2007). However, comprehensive experimental data supporting this hypothesis were missing so far. Of note, Threonine Aspartase1 homolog enzymes have been conserved in vertebrates and insects, but not in the worm *Caenorhabditis elegans*, suggesting a species-specific importance of Threonine Aspartase1's proteolytic activity among various taxons (Hsieh et al., 2003). In contrast to detailed studies of mammalian Threonine Aspartase1 enzymes (Chen et al., 2010; Bier et al., 2012a,b; Stauber et al., 2012; Wunsch et al., 2012; Oyama et al., 2013; Dong et al., 2014), our general knowledge of Threonine Aspartase1's biology, especially of homolog proteases in other species, is currently rather fragmentary.

Thus, the aim of the study was the detailed *in vivo* characterization and functional analysis of *Drosophila* Threonine Aspartase1 in order to dissect the evolutionary development of protease function. Altogether, our study provides novel insights into the cellular functionality of *Drosophila* Threonine Aspartase1, helping to understand not only Threonine Aspartase1 biology but also the complexity of protease evolution in general.

Results

Evolutionary divergence: *Drosophila* Threonine Aspartase1 preferentially processes CS2-like target sequences

Besides the first identified substrate of human Threonine Aspartase1, the MLL protein, various other potential targets have been suggested (Bier et al., 2011a,b, 2012a,b), underlining not only the complexity but also potential relevance of Threonine Aspartase1-regulated networks. Notably, the degradome includes several general transcription regulators, such as transcription factor IIA (TFIIA) or the upstream stimulatory factor 2 (USF2) (Zhou et al., 2006; Bier et al., 2011a,b). To provide further insights into Threonine Aspartase1 biology, we here analyzed dTasp *trans*-cleavage activity in living cells, testing our translocation biosensor assay (BioTasp) (Bier et al., 2011a,b). BioTasp is continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm, but predominantly localizes to the cytoplasm due to the presence of a weak nuclear localization (NLS) and a strong nuclear export signal (NES) (Supplementary Figure S1). Notably, coexpression of BioTasp with a biologically active dTasp-mCherry fusion protein indeed results in the proteolytic cleavage of the C-terminal NES, causing nuclear accumulation of the green fluorescent sensor triggered by the N-terminal NLS (Figure 1A). Hence, these data demonstrate that the *Drosophila* protease is also active in human cells and that our biosensor assay is applicable to visualize dTasp's activity *in vivo*. Importantly, expression of dTasp-mCherry and BioTasp sensors containing either the MLL-cleavage site 1 (BioTasp_{CS1}) or 2 (BioTasp_{CS2}) revealed differences in its *trans*-cleavage activity (Figure 1B). Whereas BioTasp_{CS2} was found to completely translocate to the nucleus, indicating efficient cleavage by dTasp, BioTasp_{CS1} was only moderately processed under identical experimental conditions and, thus, displayed a homogenous cellular distribution (Figure 1B). Of note, in contrast to the nuclear/nucleolar localization of human Threonine Aspartase1 (Figure 1A), ectopic expression of mCherry- or GFP-tagged dTasp showed a predominantly cytoplasmic and only partial nuclear localization (Figure 1B–D). To experimentally demonstrate the specificity of our assay, Thr¹⁹⁵ of dTasp was mutated into Val, in analogy to the catalytically inactive human Threonine Aspartase1^{T234V} mutant (Bier et al., 2011a,b, 2012a,b). The Thr¹⁹⁵Val mutation also completely abolished the CS2- and CS1-cleavage activity of dTasp (Figure 1B, right panel, and data not shown), indicating a conserved mechanism between human and *Drosophila* Threonine Aspartase1.

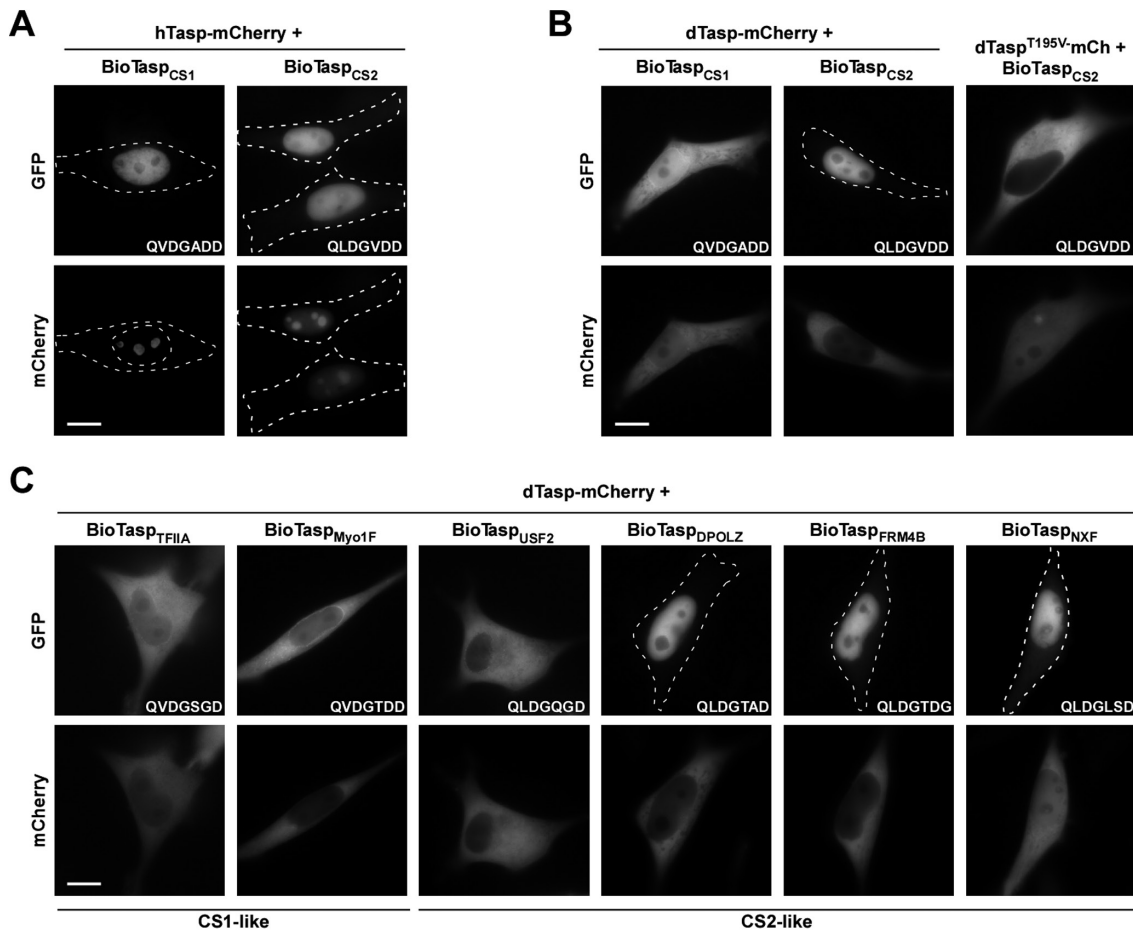


Figure 1: *Drosophila* Threonine Aspartase1 preferentially cleaves CS2-like target proteins.

Trans-cleavage activity of dTasp was analyzed using the translocation biosensor assay, BioTasp. (A) Coexpression of the BioTasp sensor containing CS1 or CS2 of MLL protein together with human Threonine Aspartase1-mCherry expression construct resulted in cleavage and nuclear localization after 48 h. (B) BioTasp_{CS1} and BioTasp_{CS2} were cotransfected with indicated dTasp-mCherry expression plasmids. Whereas dTasp1 was able to cleave CS2, CS1 cleavage was impaired. In contrast to wild-type dTasp, the dTasp^{T195V} mutant showed no proteolytic cleavage of BioTasp_{CS2}. (C) Specificity of dTasp's *trans*-cleavage activity was analyzed using biosensor proteins containing the predicted cleavage sites of different CS1-like (QVDGx[xD/Dx]) and CS2-like (QLDGx[xD/Dx]) human Threonine Aspartase1 target proteins. Sequences of cleavage sites are indicated. Scale bars: 10 μ m. Dashed lines mark cytoplasmic cell boundaries obtained from the corresponding phase-contrast images.

Based on our previous *in silico* prediction of the human Threonine Aspartase1 degradome (Bier et al., 2011a,b), we tested the cleavage sites of additional potential human target proteins, such as the transcription factors TFIIA and USF2, Myosin1F, the RNA export factor NXF5, DNA-polymerase zeta (DPOLZ), and FRM4B (FERM domain-containing protein 4B). As shown in Figure 1C, proteolytic cleavage of BioTasp sensor-containing CS1-like substrate sequences (QVD↓Gx[xD/Dx]) was impaired (Figure 1C, left panel), whereas CS2-like cleavage motifs (QLD↓Gx[xD/Dx]) with the exception of USF2 were efficiently processed, resulting in complete nuclear translocation of the biosensor (Figure 1C, right panel). Taken together, our results demonstrate that the *Drosophila* protease has

evolutionarily evolved to preferentially cleave substrates containing CS2-like motifs (QLD↓Gx[xD/Dx]). However, as USF2 (QLD↓GQGD) was not processed (Figure 1C, right panel), this result implies that for this distinct substrate, Gln as an aa with a polar, uncharged but bulky side chain is not allowed in position P².

To provide further evidence supporting our hypothesis, we additionally performed an *in vivo* mapping of residues critical for the *trans*-cleavage activity of dTasp. Again, using our translocation biosensor assay, alanine-scanning mutagenesis of the cleavage site motif (KISQLD↓GVDD) was performed in HeLa cells (Figure 2). The experiments were performed in human cells in order to exclude the possibility that cleavage site specificity of

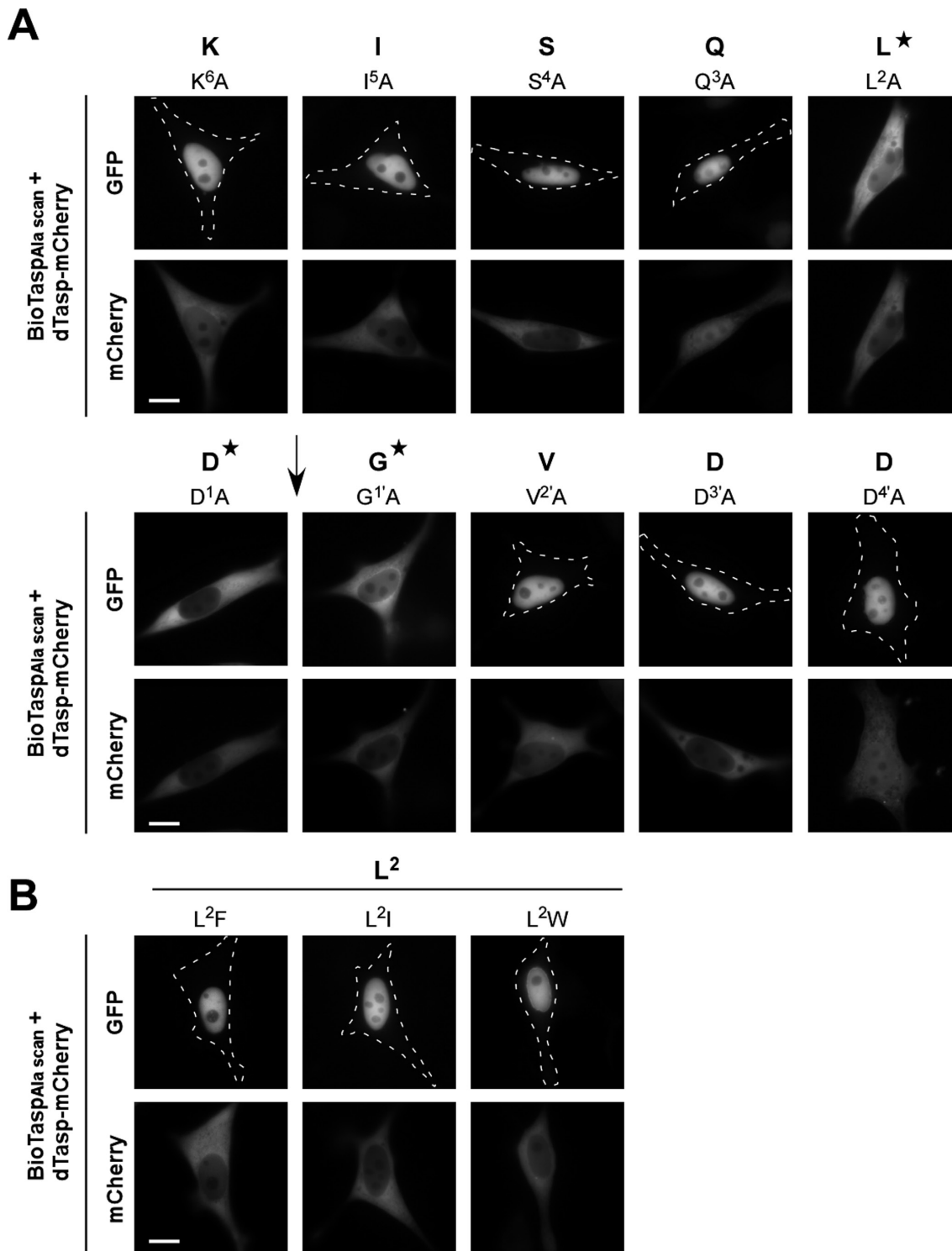


Figure 2: *In vivo* characterization of residues critical for the *trans*-cleavage activity of *Drosophila* Threonine Aspartase1. (A, B) HeLa cells were transfected with the indicated cleavage site mutants (BioTasp Ala_{scan}) together with the active dTasp-mCherry expression plasmid. Localization of the BioTasp Ala_{scan} variants was analyzed 48 h later in at least 200 fluorescent living cells. Representative images are shown. Scale bars: 10 μm. (A) Analysis of transfectants revealed that mutagenesis of Leu, Asp, and Gly (P²-P¹) inhibits cleavage of the BioTasp sensor proteins. *: residues essential for dTasp cleavage, ↓: position of dTasp *trans*-cleavage. (B) Exchange of Leu² with the non-polar aa Phe, Ile, or Trp restored cleavage activity of dTasp.

dTasp was influenced by *Drosophila*-encoded cofactors. Coexpression of the indicated BioTasp mutants with dTasp-mCherry resulted in cleavage and, thus, nuclear accumulation of those biosensors in which non-essential residues were exchanged. In contrast, mutation of critical residues completely prevented cleavage and nuclear accumulation of the fluorescent sensor proteins. Interestingly, cytoplasmic localization of the biosensor was found for Leu², Asp¹, and Gly^{1'}, but not for Gln³. Also, conservative substitution of the critical Leu² residue by the chemically similar aa Phe, Ile, or Trp could rescue cleavage (Figure 2B). These results could be independently confirmed by immunoblot analysis (data not shown). The specificity of the assay was further verified by cotransfection of the inactive dTasp^{T195V}-mCherry, which did not result in nuclear accumulation of the biosensors. Also, nuclear accumulation of all variants upon treatment with the export inhibitor Leptomycin B (LMB) further excluded the formal possibility that mutagenesis had affected the shuttling capability of the biosensor proteins (data not shown). Collectively, our analysis identified the CS2-like *trans*-cleavage site consensus sequence x[FILMW]D↓Gx[xD/Dx] for the *Drosophila* Threonine Aspartase1.

Substrate species-selectivity: *Drosophila* but not human TFIIA is a target for *Drosophila* Threonine Aspartase1

In humans, the general transcription factor TFIIA has been shown to be a native substrate for the human enzyme (Zhou et al., 2006; Bier et al., 2011a,b). In contrast, our cell-based assay results indicated that human TFIIA could not be cleaved by dTasp, and vice versa dTFIIA not by the human enzyme (Figures 1C and 3A), uncovering a species selectivity of the respective protease. To further investigate whether this selectivity also applies for *Drosophila* TFIIA (dTFIIA), we tested whether dTFIIA represents a target protein for the *Drosophila* and/or the human protease. Therefore, the putative cleavage site sequence of dTFIIA (QLD↓GALD) was cloned into our fluorescent biosensor (BioTasp_{dTFIIA}) in order to analyze dTasp's cleavage activity in living cells. As depicted in Figure 3, coexpression of the biosensor containing the cleavage site sequence of dTFIIA (BioTasp_{dTFIIA}) together with dTasp-mCherry resulted in its cleavage and nuclear translocation. In contrast, neither the inactive dTasp^{T195V} mutant nor human Threonine Aspartase1 showed proteolytic activity. To independently verify these results, cleavage activity was studied by immunoblot analysis (Figure 3B).

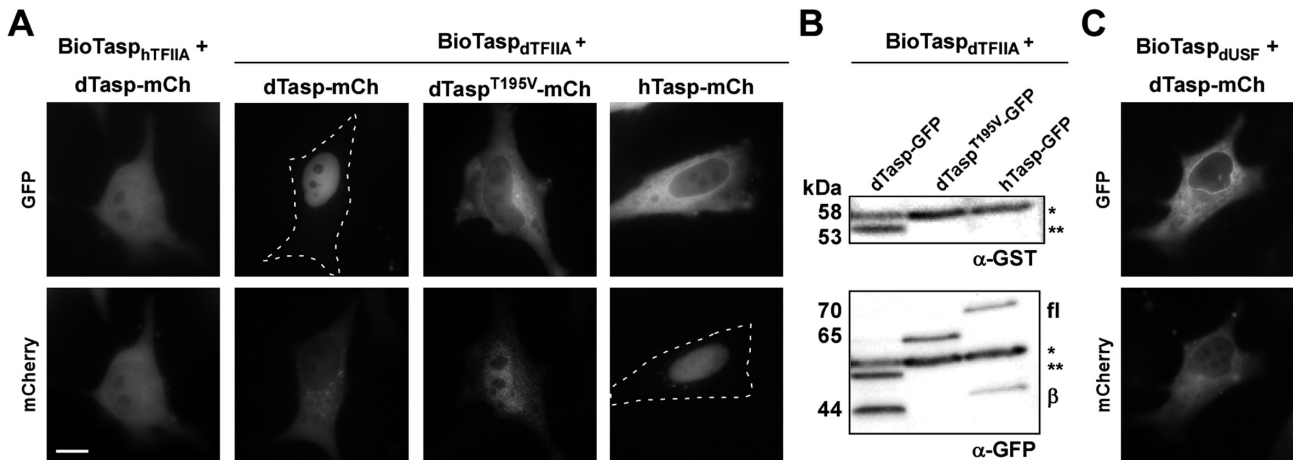


Figure 3: dTFIIA, but not dUSF, is an *in vivo* target of *Drosophila* Threonine Aspartase1.

(A) Wild-type dTasp but not the catalytically inactive dTasp^{T195V} mutant (dTaspTV) is able to cleave BioTasp_{dTFIIA} in living cells. The green fluorescent sensor is predominantly cytoplasmic, whereas coexpression of biologically active dTasp-GFP, but not of inactive dTasp^{T195V}, or of human Tasp-GFP, results in the proteolytic cleavage of the NES and nuclear accumulation of BioTasp_{dTFIIA} in HeLa cells. In contrast, the human TFIIA ortholog could not be cleaved by dTasp (left). (B) Proteolytic cleavage of BioTasp_{dTFIIA} as shown by immunoblot analysis of whole-cell lysates. 293T cells were transfected with BioTasp_{dTFIIA} together with the indicated Threonine Aspartase1 expression plasmids. In contrast to dTasp, neither the dTasp^{T195V} mutant nor human Threonine Aspartase1 showed dTFIIA *trans*-cleavage activity. Expression of proteins and cleavage products in cell lysates was visualized using α-GST and α-GFP Abs. *: uncleaved BioTasp_{dTFIIA}, **: cleaved BioTasp_{dTFIIA}, fl: Threonine Aspartase1-GFP full-length protein, β: Threonine Aspartase1 β-subunit-GFP. (C) In contrast to human USF2, dUSF2 does not represent a target protein of *Drosophila* Threonine Aspartase1. BioTasp_{dUSF2} containing the aa at corresponding cleavage site was cotransfected with dTasp-mCherry expression plasmids. Localization of the BioTasp variants was analyzed after 48 h in at least 200 fluorescent living cells. Representative images are shown. Scale bars: 10 μm. Dashed lines mark cytoplasmic cell boundaries obtained from the corresponding phase contrast images.

Besides TFIIA, the human transcription factor USF2 is another validated substrate of human Threonine Aspartase1 (Bier et al., 2011a,b). Again, our BioTasp data indicated that human USF2 represents the only QLD↓G-containing target protein not cleaved by dTasp (Figure 1D). *In silico* analyses revealed that although a USF2 ortholog exists in *Drosophila*, dUSF2, its aa similarity to the human protein is very low (12% overall aa similarity). Notably, particularly the cleavage site consensus sequence was not conserved between human USF2 (QLD↓GQGGD) and the *Drosophila* ortholog dUSF2 (DLDIHSL). Nevertheless, we experimentally tested whether dUSF2 could be proteolytically processed by dTasp. Again, the putative dUSF2 cleavage site sequence was cloned into the biosensor (BioTasp_{dUSF}). As predicted, coexpression of active dTasp-mCherry did not result in BioTasp_{dUSF} cleavage and thus nuclear translocation (Figure 3C). Hence, in contrast to the human system, *Drosophila* USF2 is not a natural target for *Drosophila* Threonine Aspartase1, indicative of species-specific differences in USF2-regulated pathways.

***Drosophila* Threonine Aspartase1's cleavage site selectivity is independent of heterocomplex formation**

Human Threonine Aspartase1 was suggested to assemble into an active $\alpha\beta\alpha$ -heterodimer (Khan et al., 2005). As heterodimerization may (co)regulate substrate recognition and cleavage activity, we next investigated heterocomplex formation of the *Drosophila* enzyme.

First, we employed our biosensor cleavage assay to study the functional consequences of overexpressing an inactive dTasp mutant. Assuming heterodimerization, overexpression of such a mutant should result in the formation of inactive heterodimers and, thus, has a strong dominant-negative effect on the *trans*-cleavage activity of the wild-type (wt) enzyme. Interestingly, we found that even cotransfection of a ninefold excess of the inactive dTasp^{T195V} mutant to wt Threonine Aspartase1 expression plasmid did not affect dTasp's processing of the MLL-CS2-containing biosensor (Figure 4A and B).

As inefficient heterodimerization appears to be the reason why the inactive dTasp^{T195V} variant fails to inhibit wt Threonine Aspartase1's activity in *trans*, we feel that protease multimerization is unlikely to be a decisive mechanism regulating cleavage site selectivity.

To experimentally further verify this hypothesis, we analyzed dTasp's (hetero)multimerization by a modified dual-color protein interaction assay that has been successfully employed in several studies to assess efficient

protein complex formation in living cells (Knauer et al., 2007a,b; Pless et al., 2011). In contrast to the nuclear/nucleolar localization of the human protease, ectopic expression of mCherry-tagged dTasp rather showed a predominantly cytoplasmic and only partial nuclear localization (Figure 4C). Assuming efficient heterocomplex formation, dTasp-mCherry is expected to translocate and colocalize with the GFP-tagged human protease at the nucleus/nucleolus upon coexpression. Therefore, nucleolar translocation would serve as a reliable indicator for efficient protein-protein interaction for Threonine Aspartase1 in living cells. However, coexpression of human and *Drosophila* Threonine Aspartase1 did not result in its nucleolar translocation, indicative of efficient complex formation of both orthologs in living cells (Figure 4C). Of note, also for hTasp-GFP, no alteration in cellular localization could be observed by coexpression of the more cytoplasmic to evenly distributed *Drosophila* enzyme.

Finally, to engineer a nuclear/nucleolar *Drosophila* Threonine Aspartase1, we successively introduced the human bipartite NLS domain into dTasp, which we interestingly found to be absent in the fly's protease (Figure 4D and E). Interestingly, albeit introduction of one of the basic aa clusters in the human bipartite NLS was sufficient to trigger dTasp's nuclear localization, nucleolar targeting required the presence of both motifs (Figure 4E and F, and Supplementary Figure S3A). Hence, the human bipartite NLS domain is not only a transferable active nuclear import but also a nucleolar localization signal. Subsequently, the 'humanized' dTasp-NLS protein was employed to test whether wt and NLS-chimerized dTasp molecules are able to form heterodimers. These cotransfection studies showed no changes of wt or NLS-chimera specific localization (Figure 4E), suggesting that dTasp exists predominantly as a monomer. Our hypothesis was further supported by the fact that coexpression of wt and NLS-chimeric dTasp mutants did not alter the preferential cleavage of CS2-like motifs we characterized before (Supplementary Figure S3B).

Discussion

The existence of conserved Threonine Aspartase1 orthologs has been demonstrated for different taxa ranging from arthropods to highly developed vertebrates (Hsieh et al., 2003; Capotosti et al., 2007). Thereby, their specific *in vivo* functions correlate with their particular substrates, e.g., human Threonine Aspartase1's role for development and segment identity depends on its cleavage activity against

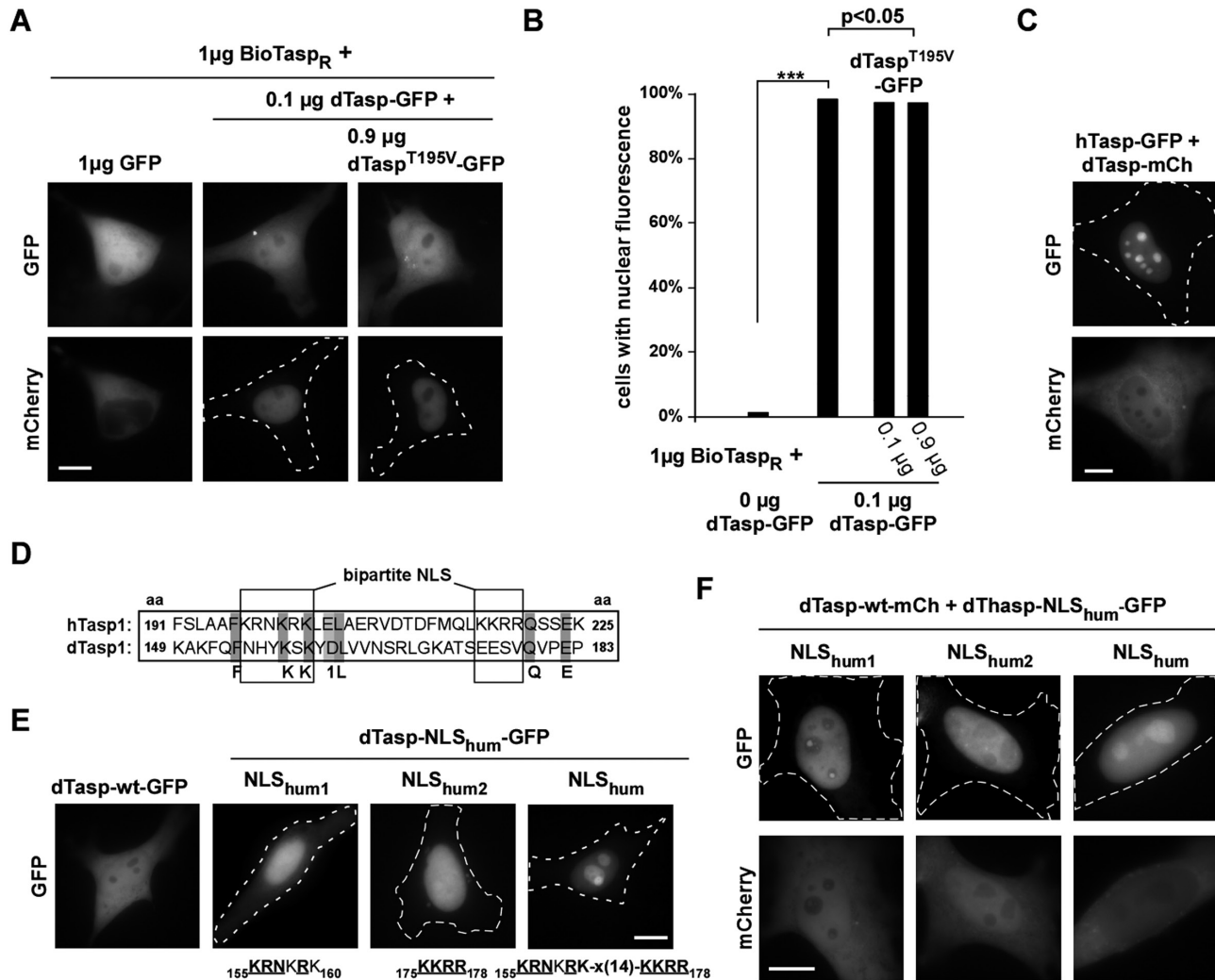


Figure 4: *Drosophila* Threonine Aspartase1's cleavage site selectivity is independent of heterocomplex formation.

(A) HeLa cells were transfected with 1 μg BioTasp_R, 0.1 μg dTasp-GFP, together with the indicated amounts of inactive dTasp^{T195V} mutant or GFP expression plasmid (control), and analyzed 24 h later. Even cotransfection of a ninefold excess of plasmids encoding the inactive dTasp variant did not prevent BioTasp_R cleavage and nuclear translocation of the indicator protein (** $p < 0.0001$). (B) The number of cells showing nuclear fluorescence was counted in at least 200 BioTasp_R-expressing cells. Results from one representative experiment are shown. The number of cells displaying nuclear fluorescence significantly increased by *trans*-cleavage upon cotransfection of 0.1 μg dTasp-GFP expression plasmid (** $p < 0.0001$). In contrast, no significant *trans*-dominant-negative effect was evident for the dTasp^{T195V} mutant. (C) Cotransfection of human and dTasp expression plasmids in HeLa cells illustrating the differing cellular localization of both orthologs, which is not influenced upon coexpression in either way. (D) Bipartite nuclear localization signal (NLS) of human Threonine Aspartase1 is not conserved in *Drosophila*, as an alignment of the aa region around the bipartite NLS (boxed) in human and *Drosophila* homolog demonstrates; aa positions are indicated. (E) Successive humanization of dTasp NLS region restores nucleolar targeting of dTasp. Mutation of the respective dTasp aa sequence into the NLS is indicated; critical aa are underlined. (F) The 'humanized' dTasp-NLS chimeras and wild-type dTasp protein are not able to form heterodimers. Cells were cotransfected with indicated dTasp expression constructs. Localization in living HeLa transfectants was analyzed by fluorescence microscopy. Scale bars: 10 μm .

the MLL protein (Takeda et al., 2006). The MLL homolog trithorax (*trx*) fulfill similar functions in *Drosophila* and has been characterized as a native substrate of dTasp1 (Capotosti et al., 2007). However, a detailed analysis of dTasp's function was missing so far. Based on the conservation of

structure and function between Threonine Aspartase1's substrates MLL and *trx*, the *Drosophila* system seems to be suitable for evolutionary studies helping to understand not only Threonine Aspartase1 biology but also the complexity of protease evolution in general.

As knowledge of a protease's substrates is key to understand its biological relevance, we analyzed dTasp *trans*-cleavage activity against different potential target proteins of human Threonine Aspartase1. Taken together, our results demonstrate that the *Drosophila* protease has evolutionarily evolved to preferentially cleave substrates containing CS2-like motifs (QLD↓GXdd). However, as USF2 (QLD↓GQGD) was not processed, the QLD↓G motif alone is essential, but not sufficient, for *trans*-cleavage activity. A database search for homolog proteins in *Drosophila* reveals that there is no correlation between cleavage activity and the existence of a conserved protein (Table 1).

Further evidence supporting our hypothesis was provided by alanine scanning mutagenesis of the CS2 cleavage site motif suggesting [FILMW]²D¹↓G¹x²x³ as species-specific *trans*-cleavage consensus sequence for *Drosophila* Threonine Aspartase1. Compared to the consensus sequence defined for human Threonine Aspartase1 (Q³[FILV]²D¹↓G¹x² [x³D⁴/D³x⁴]) (Bier et al., 2011a,b), we characterized a significantly broader recognition motif for the *Drosophila* protease. This especially differs at positions P³, P², P^{3'}, and P^{4'}, entailing functional consequences for substrate recognition as described for dTFIIA below.

Detailed analysis of homolog proteins shown in Table 1 additionally pointed out that conservation is often restricted to specific protein domains, and in many cases the potential cleavage site of Threonine Aspartase1 is not conserved between corresponding homologs. Although the protein alignment of human and *Drosophila* TFIIA with 37% overall aa identity revealed a high protein similarity (Supplementary Figure S2), the region required for cleavage recognition slightly differs in position P². Instead of the QVDG motif, the *Drosophila* ortholog contains the QLDG at the critical cleavage site of

TFIIA. The fact that dTFIIA but not the human ortholog is specifically cleaved by dTaspase1 emphasizes the importance of position P² for cleavage activity. Although the alanine-scanning mutagenesis analysis identified a broader *trans*-cleavage site consensus sequence for dTaspase1, especially at P², Val at this position prevented efficient substrate cleavage. Interestingly, human Threonine Aspartase1 is not able to cleave dTFIIA although its predicted cleavage site fits into the characterized consensus motif for human Threonine Aspartase1 (Bier et al., 2011a,b). Conclusively, TFIIA represents a paradigm for a Threonine Aspartase1 substrate for which the protease exhibits stringent species specificity despite little variations in the cleavage recognition site.

Besides dTFIIA, analyses of dUSF-specific cleavage activity indeed confirmed our previous results: as dUSF (DLDIHSL) does not match our identified cleavage site consensus sequence, it represents neither a predicted nor a verified native substrate of dTasp1.

Based on the structure obtained from bacterially expressed Taspase1, it was concluded that Taspase1 assembles into a αβα-heterodimer, representing the biologically active protease. Assuming that inactive Taspase1 variants are capable of interacting efficiently with the wt enzyme, such a heterodimerization model implies that overexpression of inactive Threonine Aspartase1 mutants would strongly shift the equilibrium toward the formation of catalytically impaired heterodimers and, thus, have a strong dominant-negative effect. Our results, however, suggest that Threonine Aspartase1 is active already as an αβ-monomer, as we have already proved for the human Threonine Aspartase1 (Bier et al., 2012a,b).

Materials and methods

Antibodies (Ab), reagents, and compounds

The Abs used were α-GFP (sc-8334; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and α-GST (sc-57753; Santa Cruz Biotechnology). Reagents were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

Cell culture, microscopy, and fluorescence imaging of cells

Mammalian (HeLa, 293T) and *Drosophila* Schneider 2 (S2) cell lines used in the study were maintained and transfected as described (Fetz et al., 2009a,b; Bier et al., 2011a,b; Padeken et al., 2013). Observation, quantitation, image analysis, and presentation were performed as described (Habtemichael et al., 2010; Bier et al., 2011a,b; Padeken et al., 2013).

Table 1: Homolog proteins of potential Threonine Aspartase1 target proteins in humans and *Drosophila*.

<i>Homo sapiens</i>	<i>Drosophila</i>
MLL	Trx/Trithorax
TFIIA	TfIIa-l
DPOLZ	Mus205
USF2	Usf
FRM4B	No homolog
Myo1F	No homolog
NXF2/5	Sbr, nxf2, nxf3

Database analysis has been performed using the *Drosophila* database at <http://flybase.org/>. Putative Threonine Aspartase1 substrates referring to Bier et al. (2011a,b).

Plasmids

Drosophila Threonine Aspartase1 (dTasp) coding sequence was cloned from the *Drosophila* cell line S2 as described (Bier et al., 2011a,b). Cloning of the dTasp coding sequence into expression vectors pc3-GFP, pc3-mCherry, pc3-HA, and the *Drosophila* expression vector pAc5.1V5/HisA (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using *KpnI/NheI* or *KpnI/EcoRI* restriction sites (primers 5'-TTT GGT ACC ATG GCA GGC TTC GTC GCA GTG-3' and 5'-TTT GCT AGC AAT GCG CAG GTG GAA GTT GTG G-3'), respectively, allowed the expression of dTasp, alone or in fusion with fluorescent proteins as described (Knauer and Stauber, 2005; Knauer et al., 2007a,b). Plasmid p_dTaspTV-GFP encoding the catalytically inactive Threonine Aspartase1 mutant, dTaspT195V, was generated by splice overlap extension polymerase chain reaction as reported (Knauer et al., 2005, 2007a,b). Expression constructs encoding Threonine Aspartase1 (hTasp) and hTaspTV as fusions with green or red fluorescent proteins (GFP, mCherry) or HA-tag were described (Bier et al., 2011a,b). Generation of plasmids p_NLS-GFP/GST-CS2-NES_{Rev} (BioTasp) and biosensors containing cleavage sites of TFIIA, USF2, and other putative Threonine Aspartase1 substrates (Myo1F, DPOLZ, FRM4B, NXF) was as described in Bier et al. (2011a,b). Analogous *BioTasp* vectors containing predicted cleavage sites of dTFIIA and dUSF2 were cloned. p_*BioTasp_R* encodes a red fluorescent biosensor (NLS-mCherry/GST-CS2-NES_{Rev}), in which GFP was replaced by mCherry (Knauer et al., 2005). Expression plasmids for BioTasp variants, in which CS2 was mutated (Ala scan), were previously described (Bier et al., 2011a,b). For cloning of the dTasp-NLS chimeric mutant, the aa sequence_{aa155} NHYKSK-x(14)-EESV₁₇₈ was changed into_{aa155} KRNRK-x(14)-KKRR₁₇₈ by splice overlap extension polymerase chain reaction as reported (Knauer et al., 2005; Engels et al., 2007). Plasmids were verified by sequence analysis as described (Schlingemann et al., 2005).

Protein extraction and immunoblot analysis

Preparation of whole-cell lysates was carried out as described using a lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, Complete EDTA-free from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Fetz et al., 2009a,b). Equal loading of lysates was controlled by reprobing blots for GAPDH as described (Krämer et al., 2009).

Acknowledgments: We thank Sandra Friedl for her excellent technical assistance.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Grant support: Fritz Thyssen Stiftung.

References

Bier, C., Knauer, S.K., Docter, D., Schneider, G., Kramer, O.H., and Stauber, R.H. (2011a). The importin- α /nucleophosmin switch

controls taspase1 protease function. *Traffic (Copenhagen)* 12, 703–714.

Bier, C., Knauer, S.K., Klaphor, A., Schweitzer, A., Reik, A., Kramer, O.H., Marschalek, R., and Stauber, R.H. (2011b).

Cell-based analysis of structure-function activity of threonine aspartase 1. *J. Biol. Chem.* 286, 3007–3017.

Bier, C., Hecht, R., Kunst, L., Scheiding, S., Wunsch, D., Goesswein, D., Schneider, G., Kramer, O.H., Knauer, S.K., and Stauber, R.H. (2012a). Overexpression of the catalytically impaired Taspase1 T234V or Taspase1 D233A variants does not have a dominant negative effect in T(4;11) leukemia cells. *PLoS One* 7, e34142.

Bier, C., Knauer, S.K., Wunsch, D., Kunst, L., Scheiding, S., Kaiser, M., Ottmann, C., Kramer, O.H., and Stauber, R.H. (2012b).

Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization *in vivo*. *FASEB J.* 26, 3421–3429.

Capotosti, F., Hsieh, J.J., and Herr, W. (2007). Species selectivity of mixed-lineage leukemia/trithorax and HCF proteolytic maturation pathways. *Mol. Cell Biol.* 27, 7063–7072.

Chen, D.Y., Liu, H., Takeda, S., Tu, H.C., Sasagawa, S., Van Tine, B.A., Lu, D., Cheng, E.H., and Hsieh, J.J. (2010). Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res.* 70, 5358–5367.

Dong, Y., Van Tine, B.A., Oyama, T., Wang, P.I., Cheng, E.H., and Hsieh, J.J. (2014). Taspase1 cleaves MLL1 to activate cyclin E for HER2/neu breast tumorigenesis. *Cell Res.* 24, 1354–1366.

Engels, K., Knauer, S.K., Metzler, D., Simf, C., Struschka, O., Bier, C., Mann, W., Kovacs, A.F., and Stauber, R.H. (2007). Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J. Pathol.* 211, 532–540.

Fetz, V., Bier, C., Habtemichael, N., Schuon, R., Schweitzer, A., Kunkel, M., Engels, K., Kovacs, A.F., Schneider, S., Mann, W., et al. (2009a). Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin. *Int. J. Cancer* 124, 2033–2041.

Fetz, V., Knauer, S.K., Bier, C., von Kries, J.P., and Stauber, R.H. (2009b). Translocation biosensors – cellular system integrators to dissect CRM1-dependent nuclear export by chemico-genomics. *Sensors (Basel)* 9, 5423–5445.

Habtemichael, N., Heinrich, U.R., Knauer, S.K., Schmidtman, I., Bier, C., Docter, D., Brochhausen, C., Helling, K., Brieger, J., Stauber, R.H., et al. (2010). Expression analysis suggests a potential cytoprotective role of Birc5 in the inner ear. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 297–305.

Hsieh, J.J., Cheng, E.H., and Korsmeyer, S.J. (2003). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* 115, 293–303.

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.

Knauer, S.K. and Stauber, R.H. (2005). Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells. *Anal. Chem.* 77, 4815–4820.

Knauer, S.K., Moodt, S., Berg, T., Liebel, U., Pepperkok, R., and Stauber, R.H. (2005). Translocation biosensors to study signal-specific nucleo-cytoplasmic transport, protease activity and protein-protein interactions. *Traffic (Copenhagen)* 6, 594–606.

Knauer, S.K., Bier, C., Schlag, P., Fritzmann, J., Dietmaier, W., Rodel, F., Klein-Hitpass, L., Kovacs, A.F., Doring, C., Hansmann, M.L.,

- et al. (2007a). The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* 6, 1502–1509.
- Knauer, S.K., Kramer, O.H., Knosel, T., Engels, K., Rodel, F., Kovacs, A.F., Dietmaier, W., Klein-Hitpass, L., Habtemichael, N., Schweitzer, A., et al. (2007b). Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *FASEB J.* 21, 207–216.
- Knauer, S.K., Fetz, V., Rabenstein, J., Friedl, S., Hofmann, B., Sabiani, S., Schroder, E., Kunst, L., Proschak, E., Thines, E., et al. (2011). Bioassays to monitor taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors. *PLoS One* 6, e18253.
- Krämer, O.H., Knauer, S.K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K.H., Stauber, R.H., Böhmer, F.D., and Heinzel, T. (2009). A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev.* 23, 223–235.
- 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.
- Marschalek, R. (2010). Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J.* 277, 1822–1831.
- Meyer, C., Schneider, B., Jakob, S., Strehl, S., Attarbaschi, A., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M.W., van Dongen, J.J., den Boer, M.L., et al. (2006). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 20, 777–784.
- Olivier, J.P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* 73, 179–191.
- Oyama, T., Sasagawa, S., Takeda, S., Hess, R.A., Lieberman, P.M., Cheng, E.H., and Hsieh, J.J. (2013). Cleavage of TFIIA by Taspase1 activates TRF2-specified mammalian male germ cell programs. *Dev. Cell* 27, 188–200.
- Padeken, J., Mendiburo, M.J., Chlamydas, S., Schwarz, H.J., Kremer, E., and Heun, P. (2013). The nucleoplasmin homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleus. *Mol. Cell* 50, 236–249.
- Pandey, U.B. and Nichols, C.D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, 411–436.
- Pless, B., Oehm, C., Knauer, S., Stauber, R.H., Dinger, T., and Marschalek, R. (2011). The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC are potential target structures in t(4;11) leukemia. *Leukemia* 25, 663–670.
- Schlingemann, J., Habtemichael, N., Ittrich, C., Toedt, G., Kramer, H., Hambek, M., Knecht, R., Lichter, P., Stauber, R.H., and Hahn, M. (2005). Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles. *Lab. Invest.* 85, 1024–1039.
- Simon, M.A., Bowtell, D.D., Dodson, G.S., Laverty, T.R., and Rubin, G.M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67, 701–716.
- Stauber, R.H., Bier, C., and Knauer, S.K. (2012). Targeting taspase1 for cancer therapy. *Cancer Res.* 72, 2912.
- 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. (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev.* 20, 2397–2409.
- van den Boom, J., Mamic, M., Baccelliere, D., Zweerink, S., Kaschani, F., Knauer, S., Bayer, P., and Kaiser, M. (2014). Peptidyl succinimidyl peptides as taspase 1 inhibitors. *ChemBiochem* 15, 2233–2237.
- Wunsch, D., Fetz, V., Heider, D., Tenzer, S., Bier, C., Kunst, L., Knauer, S., and Stauber, R. (2012). Chemico-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of threonine aspartase-1. *Blood Cancer J.* 2, e77.
- Zhou, H., Spicuglia, S., Hsieh, J.J., Mitsiou, D.J., Hoiby, T., Veenstra, G.J., Korsmeyer, S.J., and Stunnenberg, H.G. (2006). Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol. Cell Biol.* 26, 2728–2735.

Supplemental Material: The online version of this article (DOI: 10.1515/hsz-2014-0318) offers supplementary material, available to authorized users.

3.3 Untersuchungen der post-translationalen Acetylierung von Taspase1

Aufgrund der weitreichenden Bedeutung post-translationaler Modifikationen für die Struktur und Funktion von Proteinen ist deren Identifikation ein wichtiger Bestandteil von Protein-Analysen. Bezüglich der Regulation ihrer enzymatischen Aktivität ist bislang wenig über die Taspase1 bekannt. Zwar konnten einige *in vivo*-Zielproteine vorhergesagt und zum Teil experimentell verifiziert werden, jedoch ist die genaue Koordination der Substratbindung und -Prozessierung durch Taspase1 unverstanden. Neben der Phosphorylierung gehört die Acetylierung zu den häufigsten in Eukaryoten vorkommenden PTMs und ist maßgeblich an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt. Zu Beginn wurde lediglich die Acetylierung und Deacetylierung von Histon-Proteinen beschrieben, mit zunehmender Erforschung wird die Bedeutung dieser Modifikation jedoch für eine Vielzahl von Nicht-Histon-Proteinen deutlich. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Taspase1 durch Acetylierung modifiziert werden kann und wie sich dies wiederum auf die enzymatische Aktivität und möglicherweise auch auf die Substratspezifität auswirken kann.

3.3.1 Dynamische Acetylierung/ Deacetylierung von Taspase1

Um erste Hinweise auf eine mögliche Acetylierung von Taspase1 zu erhalten, wurden zunächst Immunblot-Analysen durchgeführt unter Verwendung eines gegen acetylierte Lysinreste gerichteten Antikörpers, welcher diese unabhängig von der restlichen Proteinsequenz erkennt. Die Acetylierung von Proteinen ist ein reversibler Prozess, und *in vivo* liegt nur ein geringer Anteil des Gesamtproteins in der jeweils modifizierten Form vor. Um eine mögliche Acetylierung von Taspase1 untersuchen zu können, wurden spezielle Versuchsbedingungen geschaffen. Dazu wurde der Taspase1-GFP-Vektor zusammen mit Expressionskonstrukten, die für Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) codieren, in 293T-Zellen transfiziert. Durch die Überexpression der HATs wird das Gleichgewicht in Richtung der Acetylierung verschoben. Bei der Herstellung der Gesamtzelllysate und der Immunpräzipitation wurde zudem der Histon-Deacetylasen (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zugegeben. Dadurch sollte ein möglicher Verlust der Modifikation durch im Lysat aktive HDACs verhindert werden. Nach Ko-Transfektion von Taspase1-GFP mit verschiedenen HATs und anschließender Immunpräzipitation wurde die Protease spezifisch auf das Vorhandensein von acetylierten Lysinen hin untersucht. So konnte im Immunblot nach Ko-Expression mit GCN5, PCAF, p300 und CBP, nicht jedoch mit TIP60 eine Acetylierung der Taspase1 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3 a). Das dabei entstehende spezifische Bandenmuster deutet auf acetylierte Lysine im Volllänge-Protein sowie der β -Untereinheit hin. Das in den einzelnen Taspase1-Fractionen nachweisbare Acetylierungssignal unterscheidet sich hierbei je nach ko-transfizierter HAT, was auf

unterschiedliche Acetylierungsspezifität der HATs schließen lässt. Der Nachweis einzelner HATs im Eluat verdeutlichte eine Ko-Präzipitation von Taspase1 vor allem mit GCN5 und PCAF, aber nicht mit den HATs CBP/p300 und TIP60.

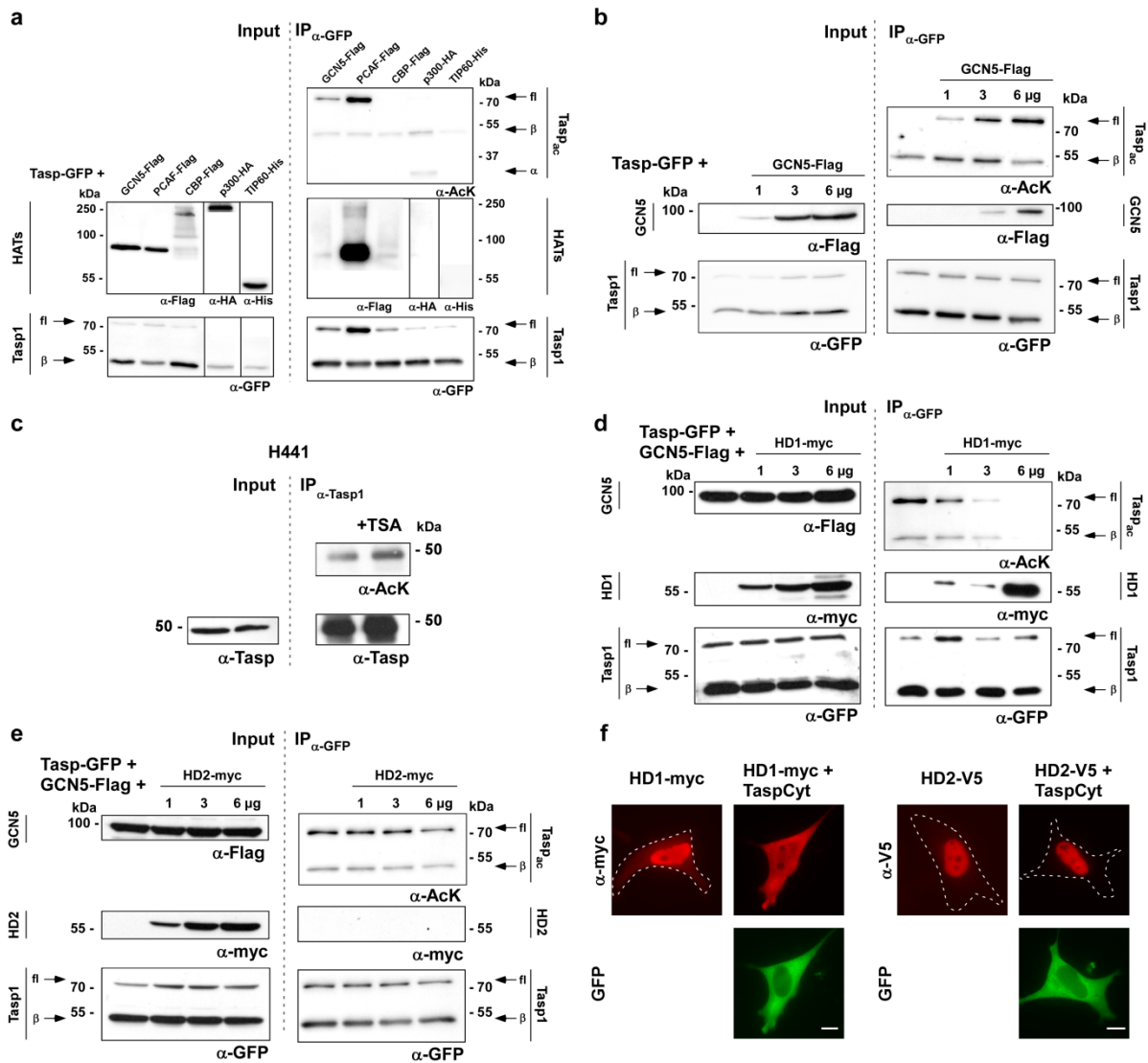


Abbildung 3.3: Die Acetylierung und Deacetylierung von Taspase1 über HATs und HDACs.

a. Taspase1 wird durch verschiedene HATs acetyliert. Tasp1-GFP wurde mit den angegebenen HAT-Expressionsplasmiden ko-exprimiert und anschließend eine Immunpräzipitation mittels α -GFP durchgeführt. Der Input (3% des Gesamtlysats) wurde auf Expression der HATs, die Eluate auf Ko-Präzipitation mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Die Acetylierung von Lysinresten wurde mittels α -AcK-Antikörper im Eluat analysiert, die IP-Effizienz mittels α -GFP-Antikörper bestimmt. fl: Taspase1-GFP-Volllänge, β : Tasp1- β -Untereinheit-GFP. **b.** Acetylierung von Taspase1 in Abhängigkeit der GCN5-Konzentration. Ko-Expression von Taspase-GFP und ansteigender Menge GCN5-Flag (0-1-3-6 μ g) in 293T-Zellen. **c.** Acetylierung endogener Taspase1. Der Acetylierungsstatus von Taspase1 wurde in H441- Zellen mittels IP untersucht. Die Expression endogener Taspase1 wurde mit Hilfe des α -Taspase-Antikörpers im Input analysiert. Endogenes Protein wurde mit dem α -Tasp1-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Im Eluat wurde mit Hilfe des α -AcK-Antikörpers die Acetylierung der immunpräzipitierten Tasp1 nachgewiesen. TSA-Behandlung 100nM, 12h. **d.** und **e.**

Ko-Expression von Taspase-GFP, GCN5-Flag und ansteigender Menge HDAC1-myc/ HDAC2-V5-Expressionsplasmid (0-1-3-6 μ g) in 293T-Zellen. Das mit dem jeweiligen Antikörper detektierte Protein ist nochmals am Bildrand angegeben. Tasp_{ac}: acetylierte Taspase1-Fraktion. f. Mikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Taspase1 und HDAC1 (links) bzw. HDAC2 (rechts). HDAC1-myc und HDAC2-V5-Expressionsplasmide wurden alleine und zusammen mit GFP-TaspaseCyt in HeLa-Zellen exprimiert. Bei Tasp_{Cyt} handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus GFP, Taspase1 und dem nukleären Exportsignal (NES) des Rev-Proteins, was zu einer zytoplasmatische Akkumulation von Taspase1 führt. Die Detektion der HDACs erfolgte mittels IF-Färbung mit α -myc bzw. α -V5-Antikörpern und Cy3-Sekundärantikörper. Maßstabsbalken: 10 μ m, die gestrichelte Linien zeigen im Durchlicht ermittelte Zellgrenzen.

Weitere Analysen konzentrieren sich vor allem auf die Taspase1-Acetylierung durch GCN5, da dieses als wichtiger Vertreter der GNAT-HAT-Familie gilt und sich einige experimentelle Vorteile gegenüber beispielsweise PCAF ergaben. So zeigten sich bei der Immunblot-Analyse von PCAF sehr hohe Proteinmengen, was womöglich nicht dem physiologischen Zustand entspricht. Mit GCN5 hingegen konnte ein gleichbleibendes Expressionsniveau, sowie eine Anreicherung von Taspase1 erreicht werden. Es wurde zunächst untersucht, ob die nachweisbare Acetylierung von Taspase1 in Abhängigkeit der ko-transfizierten Menge an GCN5 veränderbar ist. Tatsächlich konnte mit ansteigender Konzentration an GCN5-Flag-Expressionskonstrukt ein zunehmendes Acetylierungssignal detektiert werden (siehe Abb. 3.3 b). Zudem war in Korrelation zur transfizierten Menge an GCN5 auch entsprechend mehr Transferase im Eluat nachweisbar.

Um die Relevanz dieser Ergebnisse auch für endogene Taspase1 zu untersuchen, wurde eine Taspase1-exprimierende Zelllinie (H441) für weitere Analysen herangezogen. So wurde endogene Taspase1 mittels eines α -Taspase1-Antikörpers aus Gesamtzelllysaten immunpräzipitiert. Im Eluat konnte mittels Western-Blot-Analyse mit dem α -AcK-spezifischen Antikörper ein Acetylierungssignal für die endogene Taspase1 detektiert werden, welcher nach vorheriger Inkubation der Zellen mit TSA noch verstärkt wurde (siehe Abb. 3.3 c).

Da es sich bei der Acetylierung um eine höchst dynamische und reversible Protein-Modifikation handelt, interagieren die meisten acetylierten Proteine mit einer spezifischen Deacetylase, welche Acetylreste wieder vom Protein entfernt. Um Taspase1 auf eine spezifische, durch HDACs katalysierte Deacetylierung hin zu untersuchen, wurde Taspase1-GFP zusammen mit HDAC1 in humanen Zellen exprimiert und diese auf eine mögliche Interaktion bzw. den Acetylierungsstatus überprüft (siehe Abb. 3.3 d). Es zeigte sich, dass mit zunehmender HDAC1-Menge das zu detektierende Acetylierungssignal abnahm, gleichzeitig aber eine starke Ko-Präzipitation beider Proteine zu beobachten war. Als Vertreter der Klasse I-Histondeacetylasen zeigen HDAC1 und HDAC2 große Übereinstimmungen in Proteinsequenz und Funktion (vgl. Abschnitt 2.9.1). Um eine mögliche funktionelle Redundanz bezüglich Taspase1 zu untersuchen, wurde daher ein analoges Experiment mit ansteigender Menge HDAC2 durchgeführt (siehe Abb. 3.3 e).

Interessanterweise konnten weder eine Abnahme des Acetylierungssignals durch HDAC2 noch eine Ko-Präzipitation mit Taspase1 nachgewiesen werden.

Um diese unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich HDAC1 und HDAC2 auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde ein Interaktions-Assay in HeLa-Zellen durchgeführt (siehe Abb. 3.3 f). Dazu wurden HDAC1 und HDAC2 alleine und zusammen mit einer zytoplasmatischen Variante der Taspase1 (Tasp_{Cyt}-GFP) exprimiert und die Lokalisation beider Proteine 48h später mikroskopisch überprüft. Bei Tasp_{Cyt} handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus GFP, Taspase1 und dem nukleären Exportsignal (NES) des Rev-Proteins. Da dieses NES hinsichtlich seiner Aktivität stärker zum Tragen kommt als das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) der Taspase1, akkumuliert das Fusionsprotein im Zytoplasma. Eine ausreichend starke Interaktion zwischen Taspase1 und den untersuchten HDACs hätte somit eine Translokation der nukleären HDACs ins Zytoplasma zur Folge. Im Einklang mit zuvor beobachteten Unterschieden zeigte HDAC1 alleine eine nukleäre Lokalisation, nach Ko-Transfektion mit Tasp_{Cyt} kam es zu einer deutlichen Translokation von HDAC1 ins Zytoplasma. Diese veränderte Lokalisation war bei Kotransfektion von Taspase1 mit HDAC2 nicht zu beobachten. HDAC2 lokalisierte in beiden Fällen ausschließlich im Zellkern. Diese Ergebnisse deuten auf eine selektive Interaktion zwischen Taspase1 und HDAC1, nicht jedoch mit HDAC2 hin.

3.3.2 Spezifische Interaktion von Taspase1 und HDAC1

Aufgrund der erzielten Ergebnisse sollten die Besonderheiten der spezifischen Wechselwirkungen von Taspase1 und HDAC1 untersucht werden. Die beiden Enzyme HDAC1 und HDAC2 zeigen eine hohe Sequenzidentität, innerhalb der katalytisch aktiven Deacetylase-Domäne sogar bis zu 92% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Die als am wenigsten konservierte Region befindet sich im C-terminalen Bereich beider Proteine, welcher insbesondere durch post-translationale Modifikationen veränderte Aminosäuren beinhaltet und regulatorische Funktionen ausübt (Segre et al. 2011). Daher wurde eine mögliche Taspase1-Interaktionsdomäne zunächst in diesem Proteinbereich (HD1aa325-482) vermutet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden C-terminale Deletionsmutanten von HDAC1 (HDAC1-CTD-Mut) generiert und auf eine Interaktion mit der Taspase1 hin analysiert. Die Deletionen wurden dabei so gewählt, dass HDAC1 um bereits charakterisierte funktionelle Domänen verkürzt wurde (siehe Abb. 3.4 a). Dies ist zum einen das die nukleäre Lokalisation von HDAC1 vermittelnde NLS. Zum anderen handelt es sich um zwei Domänen, Chfr und IACEE, welche spezifische Interaktionen mit einer Ubiquitin-Ligase und mit *pocket*-Proteinen, wie dem Tumorsuppressor-Protein pRb vermitteln (Brunmeir et al. 2009). Als

Negativ-Kontrolle wurde weiterhin eine stark verkürzte HDAC1-Mutante (Δ Deac) hergestellt, welche ausschließlich den C-Terminus umfasst (Abb. 3.4 a).

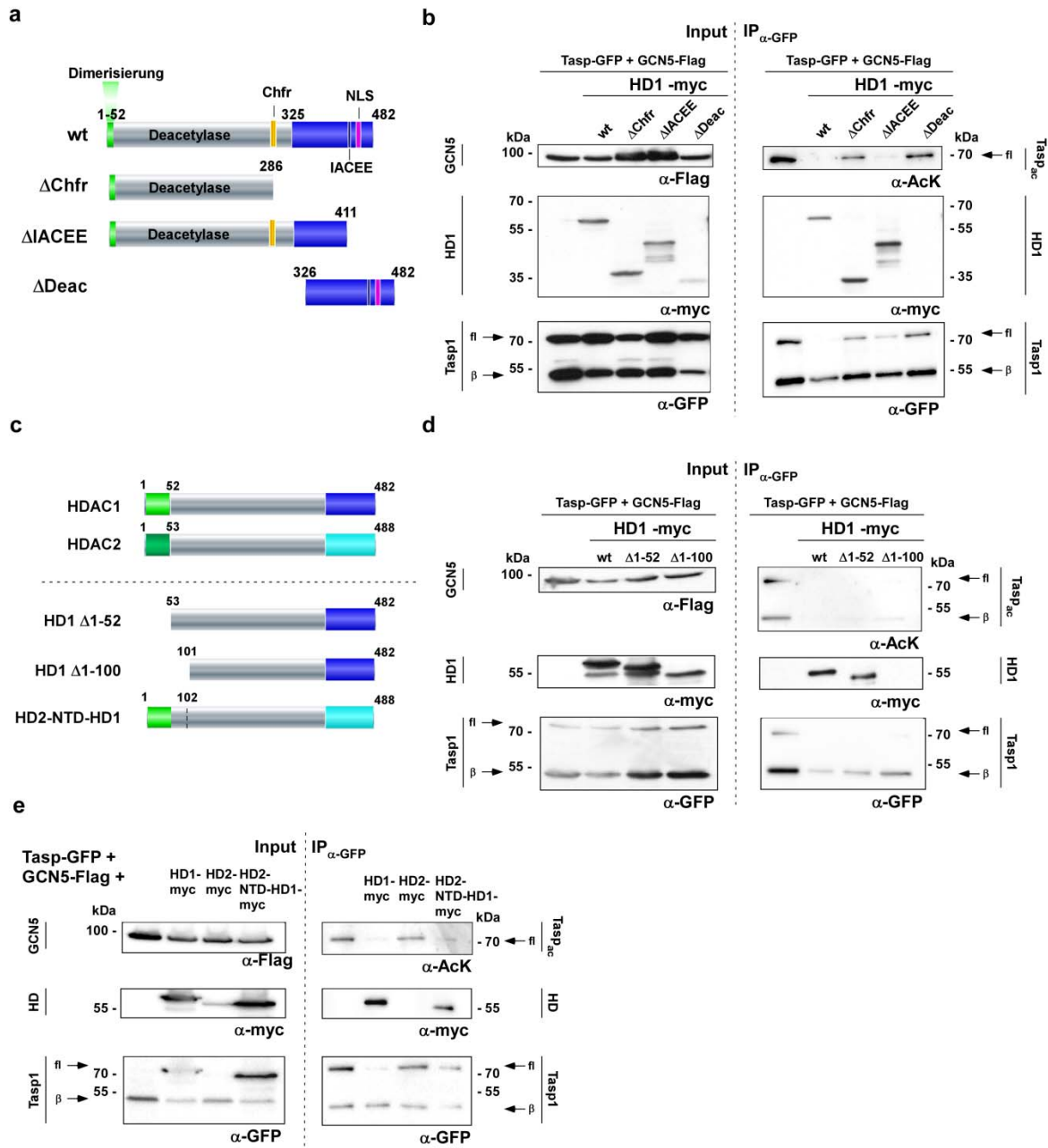


Abbildung 3.4: Identifizierung der Interaktionsdomäne von Taspase1 und HDAC1.

a. Schematische Darstellung von HDAC1 und C-terminal verkürzter HDAC1-Mutanten.
b. Immunblot-Analyse nach Ko-Expression von Taspase-GFP, GCN5-Flag und den angegebenen HDAC1-myc-Expressionsplasmiden in 293T-Zellen. Die Expression von GCN5 und der HDAC1-Varianten wurde mittels angegebener Antikörper (α -Flag, α -myc) im Input (links) überprüft. Die Acetylierung von Tasp1-GFP, sowie Ko-Präzipitation mit den verschiedenen HDAC1-Mutanten wurde mit α -AcK bzw. α -myc-Antikörper im Eluat (rechts) untersucht. Die IP-Effizienz wurde anschließend mit Hilfe des α -GFP-Antikörpers bestimmt. fl: Taspase1-GFP-Volllänge, β : Tasp1- β -Untereinheit-GFP.
c. Schematische Darstellung N-terminal verkürzter HDAC-Deletionsmutanten **d.** und **e.** Immunblot-

Analyse nach Ko-Expression von Taspase-GFP, GCN5-Flag und den angegebenen N-terminalen HDAC1-myc-Expressionsplasmiden in 293T-Zellen. IPs und Western-Blot-Analysen wie in b. beschrieben. Das mit dem jeweiligen Antikörper detektierte Protein ist nochmals am Bildrand angegeben. Tasp_{ac}: acetylierte Taspase1-Fraktion. Weitere Erläuterungen im Text.

In Ko-Immunpräzipitation-Experimenten konnte eine deutliche Ko-Präzipitation von Taspase1 mit allen untersuchten HDAC1-CTD-Mutanten ausgenommen der katalytisch inaktiven Δ Deacetyl-Mutante nachgewiesen werden (s. Abb. 3.4 b).

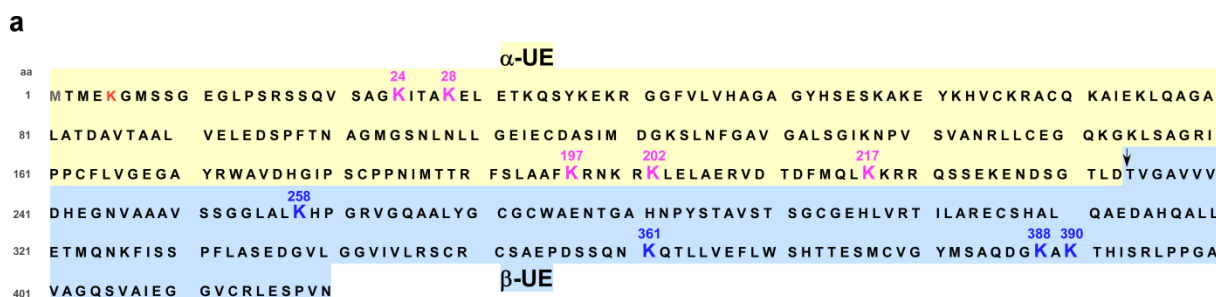
Da sich die Deletionen im C-terminalen Bereich von HDAC1 nicht negativ auf die Ko-Präzipitation mit Taspase1 auswirkten, wurden zusätzlich zwei weitere Mutanten generiert. Diesen fehlt die innerhalb der ersten 52 Aminosäuren befindliche N-terminale Homo-/Heterodimerisierungsdomäne (HDAC1 Δ 1-52), bzw. noch weitere knapp 50 aa (HDAC1 Δ 1-100, vgl. Abb. 3.4 c). Während die Deletion der Dimerisierungsdomäne keinen Einfluss auf die Interaktion hatte, konnte keine Ko-Präzipitation von Taspase1 mit HDAC1 Δ 1-100 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4 d). Um die Spezifität dieses Effektes zu verifizieren, wurde ein chimäres HDAC2-Protein hergestellt, in welchem die N-terminale Region gegen den analogen Bereich (aa1-101) von HDAC1 ausgetauscht wurden (HD2-NTD-HD1, vgl. Abb. 3.4 c). Während HDAC2-wt nicht mit Taspase1 präzipitiert, konnte das chimäre HD2-NTD-HD1-Protein im Eluat nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4 e).

3.3.3 Charakterisierung möglicher Taspase1-Acetylierungsstellen

In der Proteinsequenz der Taspase1 finden sich mehrere Lysinreste, welche als Ziel für die HAT-katalysierte Acetylierung in Frage kommen. Zur Identifizierung modifizierter Lysinreste wurde daher zunächst eine massenspektrometrische (MS-) Analyse durchgeführt (Kooperation mit K.-H. Gührs, Jena). Einzelheiten bezüglich der genauen methodischen Durchführung kann einem von unserer Arbeitsgruppe konzipierten und in *Nature Protocols* erschienenem Artikel entnommen werden (Docter et al. 2014). Wie bereits beschrieben wurde die Taspase1 in 293T-Zellen mit HATs ko-exprimiert und anschließend immunpräzipitiert. Das resultierende Eluat bzw. entsprechende Gel-Banden wurden zur Analyse an das Leibniz-Institut in Jena geschickt. Wiederholte Analysen ergaben eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Acetylierung folgender Lysinreste in der α -Untereinheit: K24, K28, K197, K202, sowie K217 (siehe Abb. 3.5 a). In der β -Untereinheit der Protease wäre eine Modifikation von K258, K361, K388 und K390 möglich, die Analyse ergab hierfür jedoch keine gesicherten Ergebnisse. So konnte auch nach mehreren Analysen keine ausreichende Peptidabdeckung für den Sequenzbereich der β -Untereinheit erreicht werden, was beispielsweise auf stabile Sekundärstrukturen innerhalb der β -Kette wie Disulfidbrücken

zurückzuführen sein könnte. Dies verhindert eine effektive Beschleunigung des verdampften Analyt-Moleküls im TOF-Analysator. Somit können keine gesicherten Aussagen über acetylierte Lysinreste innerhalb der β -Untereinheit anhand der vorliegenden Untersuchungen getroffen werden.

Die MS-Untersuchungen deuteten zudem auf ein konstitutiv acetylierten N-Terminus des Proteins (K5), sowie das Fehlen des Methionins an Position 1 hin. Hinsichtlich einer möglichen Acetylierung innerhalb der α -Untereinheit wurde die Spezifität der modifizierenden HATs gegenüber einzelner Lysinreste analysiert. Hierbei zeigten GCN5 und PCAF ein unterschiedliches Acetylierungsmuster, wohingegen p300 und CBP die gleichen Lysinreste innerhalb der Taspase1-Sequenz modifizieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 3.5 b zusammengefasst.



b

HAT \ AcK	K24	K28	K197	K202	K217
GCN5					
PCAF					
p300/ CBP					

Abbildung 3.5: Massenspektrometrische Analyse potentieller Taspase1-Acetylierungsstellen.

a. Proteinsequenz des Taspase1-Volllänge Proteins mit potentiell acetylierten Lysinresten (violett und blau). Die intramolekulare Spaltung von Taspase1 in die beiden Untereinheiten α (gelb) und β (blau) erfolgt zwischen D233 und T234 (Pfeil). **b.** Die untersuchten HATs acetylieren spezifisch die Lysine K24, K28, K197, K202 und K217 in der α -UE (grau). AcK: acetylierter Lysinrest innerhalb der α -UE.

3.3.4 Funktionelle Auswirkungen der Taspase1-Acetylierung

Um die spezifische Acetylierung und Deacetylierung von Taspase1 in einen funktionellen Kontext einordnen zu können, wurden mögliche Auswirkungen der Modifikationen auf die *cis*- und *trans*-Aktivität der Protease untersucht. Dazu wurde die Taspase1-Aktivität bezüglich des natürlichen Substrates MLL untersucht. MLL besitzt zwei hoch-konservierte Taspase1-Schnittstellen (CS1 und CS2), wobei die Spaltung von CS2 effizienter erfolgt (vgl. Abschnitt 2.5.1). Zunächst wurde Taspase1 mit den Biosensoren (BioTasp_{CS1} und BioTasp_{CS2}) und GCN5 bzw. HDAC1 ko-exprimiert und die katalytischen Aktivität hinsichtlich der CS1- und CS2-Spaltung mittels Western-Blot-Analysen untersucht (vgl. Abb. 3.6 a und b). In den Kontrollen konnten nach Expression wildtypischer Taspase1 jeweils zwei Biosensor-Fragmente nachgewiesen werden. Die Ko-Expression der inaktiven TaspaseTV-Mutante hingegen induzierte keine Spaltung von BioTasp. Eine zusätzliche Expression von GCN5 zur wildtypischen Taspase1 veränderte das proteolytische Bandenmuster nicht, auch hier wurden zwei BioTasp-Fragmente nachgewiesen. Nach Ko-Expression von GCN5 und HDAC1 zeigte sich jedoch eine Verschiebung des Verhältnisses hin zum ungespaltenen Biosensor-Protein, wobei die Spaltung der wildtypischen Taspase1 in ihre Untereinheiten nicht beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse konnten durch fluoreszenzmikroskopische Analysen der Lokalisation von BioTaspCS1 (Abb. 3.6 c) und BioTaspCS2 (Abb. 3.6 d) bestätigt werden. Die nach Ko-Expression von GCN5 durch proteolytische Spaltung induzierte nukleäre Akkumulation des Biosensors war nach zusätzlicher Expression von HDAC1 kaum mehr nachweisbar.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse für ein physiologisches Ziel-Protein der Taspase1 wurde die Prozessierung des Transkriptionsfaktors USF2 nach Ko-Expression von GCN5 bzw. HDAC1 untersucht. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus Volllänge-USF2 und GFP mit Taspase1, GCN5 und HDAC1 in 293T-Zellen ko-exprimiert. Auch hier konnte eine Spaltung von USF2 in zwei Fragmente durch wildtypische Taspase1, nicht jedoch durch die katalytisch inaktive TaspTV-Mutante induziert werden (siehe Abb. 3.7 a). Nach Ko-Expression von GCN5 waren weiterhin beide USF2-Fragmente nachweisbar, nicht aber nach zusätzlicher Expression von HDAC1. Unter Verwendung des HDAC-Inhibitors TSA und damit der spezifischen Hemmung von HDAC1 konnte die Spaltung von USF2 wiederhergestellt werden (siehe Abb. 3.7 b).

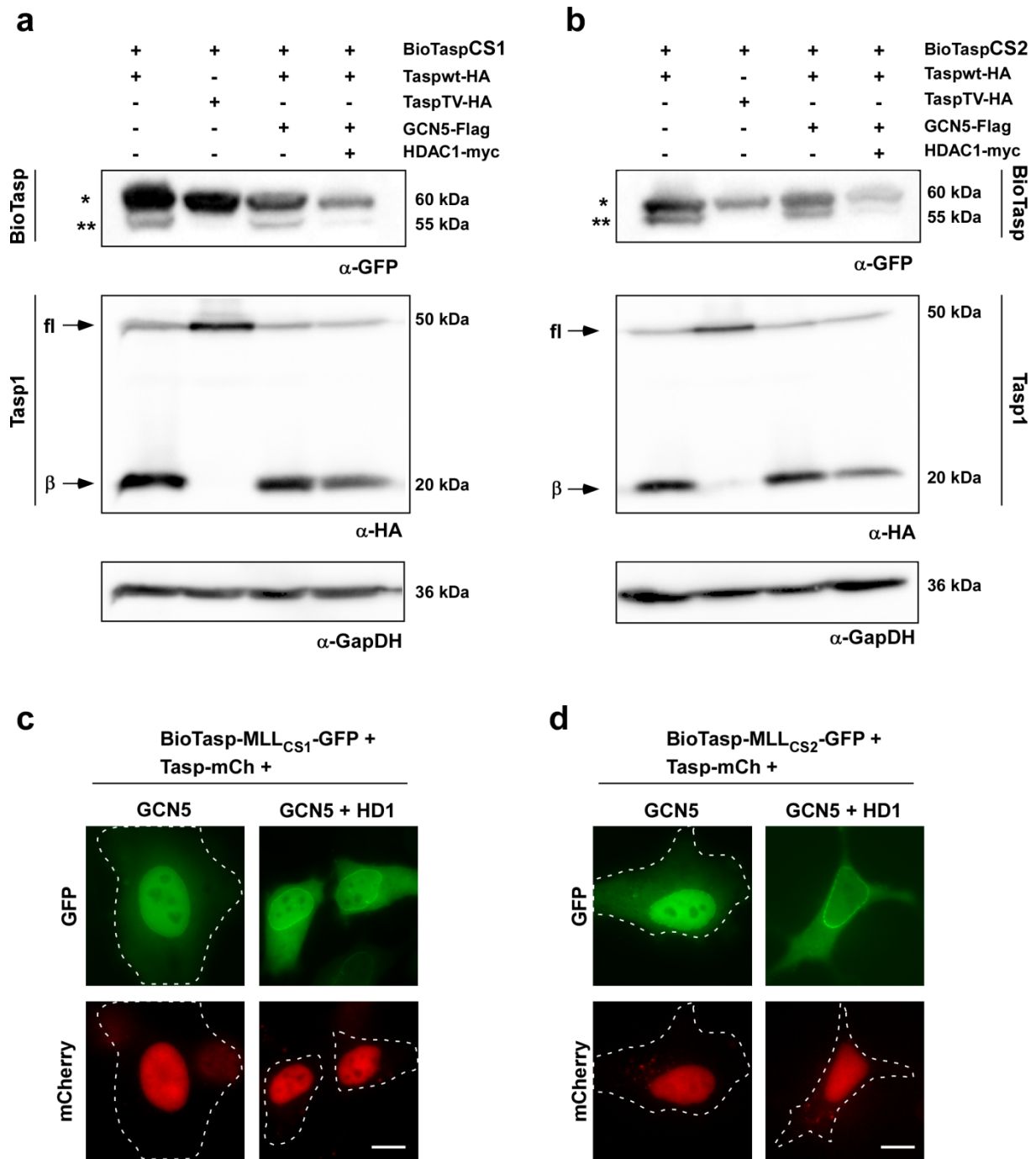


Abbildung 3.6: Einfluss der Taspase1-Acetylierung auf die Prozessierung der MLL-Spaltstellen.

a. und **b.** Ko-Expression des Taspase-Biosensors CS1 (**a**) und CS2 (**b**) mit angegebenen Expressionsplasmiden in 293T-Zellen. Die Spaltung des BioTasp (* ungeschnitten, ** geschnitten) wurde mittels α -GFP-Antikörper, die autokatalytische Tasp1-Spaltung mit α -HA-Antikörper analysiert. α -GapDH diente als Ladekontrolle. Das mit dem jeweiligen Antikörper detektierte Protein ist nochmals am Bildrand angegeben. fl: Taspase1-HA-Volllänge, β : Tasp1- β -Untereinheit-HA.

c. und **d.** Mikroskopische Analyse der CS1/ CS2-Prozessierung mittels BioTasp in HeLa-Zellen. Maßstabsbalken: 10 μ m, gestrichelte Linien zeigen im Durchlicht ermittelte Zellgrenzen.

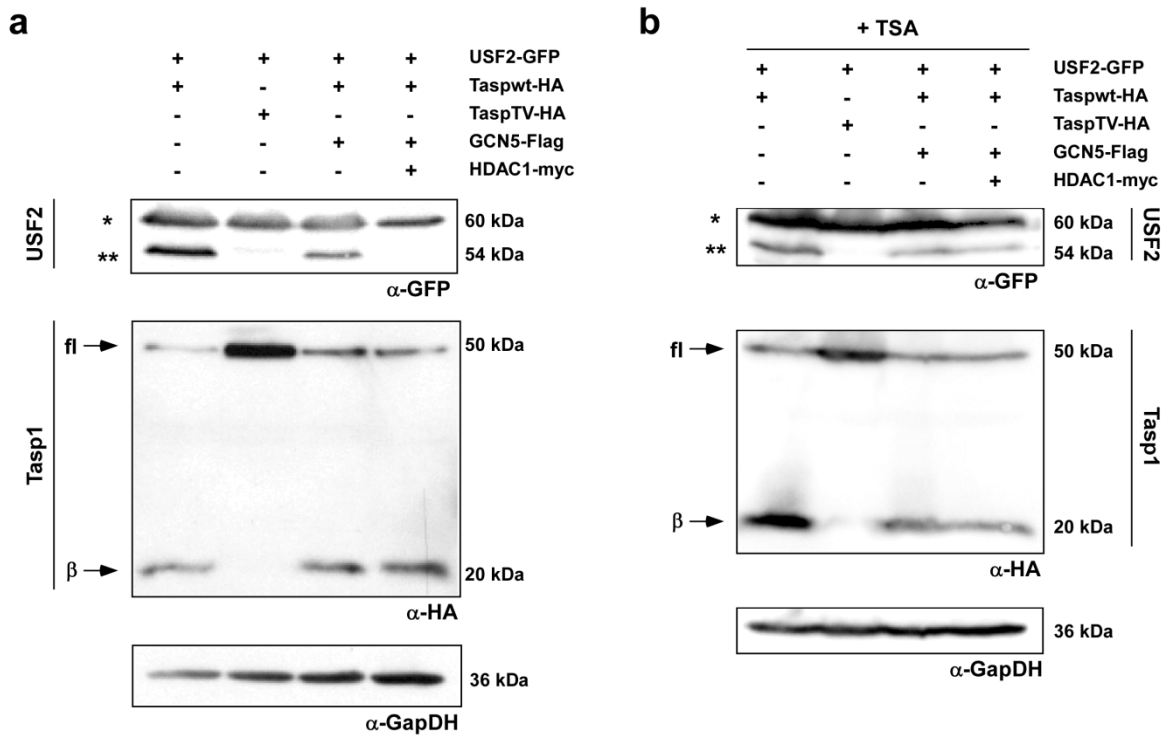


Abbildung 3.7: Einfluss des Taspase1-Acetylierungsstatus auf die USF2-Prozessierung.

a. und **b.** Western-Blot-Analyse der USF2-Spaltung durch Taspase1. USF2-GFP wurde mit angegebenen Expressionsplasmiden in 293T-Zellen ohne (**a.**) und mit (**b.**) Zugabe des HDAC-Inhibitors TSA (500nM, 16h) ko-exprimiert. Die Spaltung von USF2 (* ungeschnitten, ** geschnitten) wurde mittels α -GFP-Antikörper, die autokatalytische Tasp1-Spaltung mit α -HA-Antikörper analysiert. α -GapDH diente als Ladekontrolle. Das mit dem jeweiligen Antikörper detektierte Protein ist nochmals am Bildrand angegeben. fl: Taspase1-HA-Volllänge, β : Tasp1- β -Untereinheit-HA.

Vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe und die Analyse verschiedener Taspase1-Mutanten weisen darauf hin, dass der Lysinrest an Position 258 (K258) essentiell an der Regulation der proteolytischen Aktivität beteiligt ist. So wurde in der Dissertation von C. Bier eine mögliche Sumoylierung an K258 untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Mutation K258 keinen Einfluss auf die Sumoylierung der Taspase1 hat, es jedoch zur Hemmung der *trans*-Aktivität kommt (Bier, 2010). Da es sich bei K258 um ein potentielles Ziel für die Acetylierung handelt, wurden spezielle Acetylierungsmutanten hergestellt. Zum einen wurde der Lysinrest an Position 258 in ein Arginin mutiert (K258R-Mutante), wodurch die Ladungen innerhalb der Proteinkette unverändert bleiben, die Acetylierung an dieser Stelle jedoch verhindert wird. Der Austausch zu Glutamin (K258Q-Mutante) täuscht hingegen eine Acetylierung an dieser Position vor. Die Aktivität beider Mutanten im Vergleich zum wildtypischen Protein und der inaktiven TaspaseTV-Mutante wurde mittels des Biosensor-Assays (BioTaspCS2) bestimmt. Während Taspase1-wt über ihre proteolytische Aktivität eine Translokation des BioTaspCS2 in den Zellkern induzierte, führte die Ko-Expression der

Acetylierungsmutanten nicht zur Spaltung und somit Umlagerung des Biosensors (Abb. 3.8 a). Dies konnte mittels Immunblot-Analysen bestätigt werden: bei Ko-Expression der Mutanten war keine Fragmentierung des Biosensor-Proteins nachweisbar. Im Unterschied zu einem bei Ko-Expression von TaspaseK258R detektierten Fragment von etwa 20 kDa, konnte für TaspaseK258Q lediglich das Volllänge-Protein und somit keine Autoprozessierung nachgewiesen werden analog zur inaktiven TaspaseTV-Mutante (siehe Abb. 3.8 c). Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Analyse der USF2-Spaltung durch TaspaseK258R und K258Q (Abb. 3.8 d). Während für die Tasp258R-Mutante das USF2-Fragment zumindest schwach detektierbar war, induzierte die Ko-Expression der Tasp258Q-Mutante keine Spaltung des Zielproteins. Auch in entsprechenden mikroskopischen Untersuchungen induzierten beide Mutanten keine Spaltung und damit einhergehend keine nukleäre Akkumulation des USF2-Biosensors (Abb. 3.8 b). Es fiel zudem eine vom Wildtyp abweichende zelluläre Lokalisation der Mutanten TaspaseK258R und K258Q auf: vergleichbar mit der katalytisch inaktiven TV-Mutante zeigten beide Acetylierungsmutanten eine nukleäre Lokalisation jedoch ohne die charakteristische Akkumulation an den Nukleoli (Abb. 3.8 a und b).

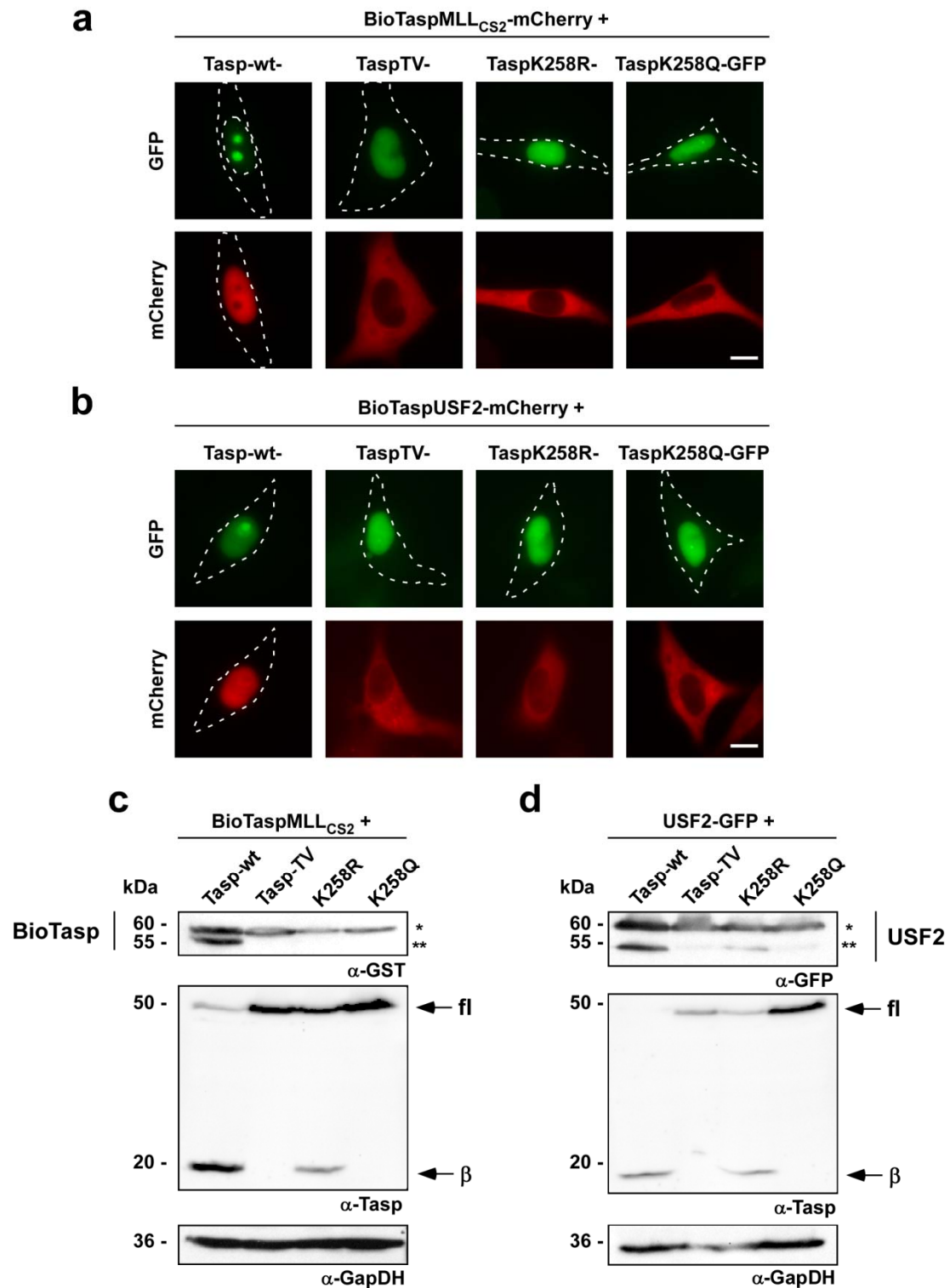


Abbildung 3.8: Differentielle Aktivität der TaspaseK258-Acetylierungsmutanten bezüglich MLL- und USF2-Spaltung.

a. und **b.** Mikroskopische Analyse der Tasp1-Aktivität mit Hilfe des BioTasp. Ko-Expression von BioTaspCS2- (**a**) bzw. BioTaspUSF2-mCherry (**b**) mit angegebenen Tasp1-GFP-Expressionsplasmiden in HeLa-Zellen. Maßstabsbalken: 10 µm, die gestrichelten Linien zeigen im Durchlicht ermittelte Zellgrenzen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

c. und **d.** Immunblot-Untersuchung der MLL- und USF2-Prozessierung durch Taspase1-Acetylierungsmutanten. BioTaspCS2- (**c**) bzw. USF2-GFP (**d**) wurden mit angegebenen Tasp1-Expressions-

plasmiden in 293T-Zellen ko-exprimiert. Die Bildung von Protein-Fragmenten (* Volllänge, ** Spaltprodukt) wurde mittels α -GST- bzw. α -GFP-Antikörper, die autokatalytische Tasp1-Spaltung mit α -Tasp1-Antikörper analysiert. α -GapDH diente als Ladekontrolle.

4. Diskussion und Ausblick

Bei der evolutionär hoch konservierten Threonin Aspartase1 (Taspase1) handelt es sich um eine Protease mit onkologischer Relevanz, welche sowohl in zahlreichen Leukämien als auch in soliden Tumoren überexprimiert wird (Chen et al. 2010; Bier et al. 2011a; Bier et al. 2011b; Bier et al. 2012b). Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass Taspase1 durch die Spaltung von MLL-Fusionsproteinen und anderen regulatorischen Proteinen an der Leukämie-Entstehung direkt beteiligt ist (Hsieh et al. 2003a; Takeda et al. 2006; Liu et al. 2009; Pless et al. 2011), ist unser Verständnis der zugrunde liegenden pathobiologischen Funktionen der Taspase1 nach wie vor begrenzt (Bier et al. 2011a; Oyama et al. 2013). Trotz intensiver Anstrengungen seitens unterschiedlicher Forschungsgruppen ist es bislang nicht gelungen, effektive genetische oder chemische Inhibitoren zu identifizieren, was eine genaue Bewertung der klinischen und kommerziellen Relevanz von Taspase1-Inhibitionsstrategien nahezu unmöglich macht (Stauber et al. 2012a; Wünsch et al. 2012b). Zukünftige experimentelle wie auch *in silico* Ansätze sollten sich vor allem auf die Identifizierung eines spezifischen chemischen Inhibitors konzentrieren. Die Analysen von chemischen Datenbanken mittels Hochdurchsatz-Screening-Methoden waren dabei bislang nicht erfolgreich, so dass andere Versuchsansätze herangezogen werden sollten. Eine vielversprechende Methode zur Identifizierung neuartiger Wirkstoffe stellt die Erschließung anderer chemischer Strukturräume wie beispielsweise die Analyse von Naturstoff-Datenbanken dar (Overall und Lopez-Otin 2002; Koehn und Carter 2005; Pratheeshkumar et al. 2012). Es wird bereits eine Vielzahl an Naturstoffen als Protease-Inhibitoren eingesetzt, wie beispielsweise Curcumin und Resveratrol als Matrix-Metalloproteinasen-Hemmer oder Bowman-Birk-Inhibitoren aus der Sojabohne zur Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin (Birk 1985; Wan et al. 1998; Cao et al. 2005; Su et al. 2006; Hatcher et al. 2008; Ravindran et al. 2009; Souza Lda et al. 2014). Zum Teil zeigen diese Substanzen *in vitro* anti-tumorigene und anti-angiogene Wirkung, weshalb sie auch in klinischen Studien für den Einsatz in der Krebstherapie getestet wurden und werden (Kennedy 1998; Wan et al. 1998; Menon et al. 1999; Coussens et al. 2002; Singh et al. 2002; Pozo-Guisado et al. 2005; Su et al. 2006; Sun et al. 2006; Patel et al. 2007; Hatcher et al. 2008; Ravindran et al. 2009; Park und Contreas 2010; Pratheeshkumar et al. 2012; Souza Lda et al. 2014).

Zur erfolgreichen Identifizierung eines effizienten Protease-Inhibitors ist zudem ein besseres Verständnis der Funktionsweise unerlässlich. Dies erlaubt die Entwicklung von Hypothesengetriebenen Inhibitionsstrategien basierend auf Funktionsstudien. Solche Studien umfassen neben der Aufklärung der Struktur des katalytisch aktiven Zentrums und dem dort ablaufenden biochemischen Mechanismus zudem die Untersuchung von Regulationsmechanismen durch weitere funktionelle und strukturelle Domänen. Es wird generell

angenommen, dass während der evolutionären Entwicklung einer Protease strukturelle Veränderungen stattfinden, um dadurch eine Anpassung an komplexere Aufgaben zu ermöglichen. Die Aufklärung derartiger Modifikationen erlaubt uns einen genaueren Einblick in die Regulation der Protease-Aktivität und somit die Entwicklung effizienter Inhibitionsstrategien.

Die Existenz konservierter Taspase1-Orthologer konnte bereits für viele Insekten- und Vertebraten-Klassen bis hin zur Maus nachgewiesen werden (Hsieh et al. 2003a; Capotosti et al. 2007). Ihre spezifischen *in vivo* Funktionen sind dabei eng mit den jeweiligen Substraten der Taspase1 verknüpft. Das humane Ortholog wurde dabei vorrangig über ihr Zielprotein MLL definiert und charakterisiert. Daraus wurde unter anderem ihre Bedeutung für Entwicklung und Ausbildung der Segmentidentität abgeleitet (Takeda et al. 2006). Das MLL-Ortholog Trithorax (Trx) übernimmt in *Drosophila* ähnliche Funktionen und konnte zudem als Zielprotein der *Drosophila*-Taspase1 (dTaspase1) identifiziert werden (Capotosti et al. 2007). Weitere Einzelheiten zur Struktur und Funktion der dTaspase1 sind dabei nicht näher charakterisiert. Aufgrund der Konservierung von Struktur und Funktion zwischen den Substraten MLL und Trx eignet sich eine vergleichende Analyse von humaner und *Drosophila* Taspase1, um die evolutionäre Entwicklung der Taspase1 besser zu verstehen und daraus Rückschlüsse auf die Protease-Aktivität im Allgemeinen ziehen zu können.

Erste Expressions- und Mutationsstudien konnten zeigen, dass es sich bei dem vorhergesagten Threonin¹⁹⁵ tatsächlich um das essentielle Nukleophil für die *cis*-Spaltung der dTaspase1 handelt (Wünsch et al. 2015a). Im Gegensatz zu im Vorfeld gewonnenen Erkenntnissen, welche eine enge Ko-Evolution von *Drosophila* und humaner Taspase1 nahe legen (Hsieh et al. 2003a; Capotosti et al. 2007), zeigten sich in unseren Studien erstmals signifikante Unterschiede zwischen beiden Proteasen (siehe Abb. 4.1). So weicht die Konsensus-Sequenz für die Substratspaltung durch dTaspase1 ($Q^3(F/I/L/M)^2D^1G^1X^2X^3$) maßgeblich von dem für die humane Taspase1 charakterisierten Motiv ($Q^3(F/I/L/V)^2D^1G^1X^2D^3D^4$) ab. Im Unterschied zur humanen Taspase1 mit lediglich 27 potentielle Zielproteine (Bier et al. 2011b) wurden daher für dTaspase1 in der vorliegenden Studie 70 mögliche Substrate vorhergesagt. Führt man diese *in silico*-Analyse mit dem humanen Spaltungs-Motiv im *Drosophila*-Proteom durch, so erhält man lediglich 13 vorhergesagte Proteine. Somit würde sich bei einer solchen Vorhersage der Großteil potentieller Substrate einer Identifizierung entziehen, was die Bedeutung der Charakterisierung einer Spezies-spezifischen Spaltungs-Konsensus-Sequenz unterstreicht. Erwartungsgemäß umfasst die Liste der potentiellen dTaspase1-Substrate die bereits verifizierten Zielproteine Trithorax (Trx) und *host cell factor* (HCF). Zudem befinden sich unter den vorhergesagten dTaspase1-Substraten der allgemeine Transkriptionsfaktor TFIIA

und eine regulatorische Untereinheit der 26S Protease (PRS4), deren Orthologe bereits als mögliche Zielproteine der humanen Taspase1 vorgeschlagen wurden (Bier et al. 2011b). Eine weiterführende Studie konnte in der Tat *Drosophila* TFIIA als natürliches Substrat der dTaspase1 verifizieren (Wünsch et al. 2015c). Interessanterweise spalten sowohl hTaspase1, als auch ihr *Drosophila*-Ortholog nur das arteigene TFIIA Homolog, nicht jedoch das artfremde. Für dTaspase1 steht diese Beobachtung in Einklang mit dem postulierten Spaltungs-Motiv, gemäß der Konsensus-Sequenz der humanen Taspase1 sollte hingegen eine Spaltung von dTFIIA erfolgen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass nicht alleine die Existenz einer vorhergesagten Spaltungssequenz ausreichend ist, um auf eine proteolytische Spaltung durch Taspase1 zu schließen, sondern in jedem Fall eine experimentelle Verifizierung unabdingbar ist. TFIIA dient somit als Beispiel für ein Taspase1-Substrat, für welches trotz geringer Unterschiede innerhalb der Spaltungssequenz eine strikte Spezies-Spezifität existiert. Zusammenfassend hat sich während der Evolution der dTaspase1 eine präferentielle Spaltung des QLDG-Motivs herausgebildet. Die Existenz dieses Motivs allein ist jedoch nicht ausreichend für die Spaltung durch dTaspase1. Vielmehr scheint die übrige Proteinstruktur des potentiellen Substrates einen erheblichen Anteil an der Spaltbarkeit durch Taspase1 zu haben. Es ist nicht nur die Zugänglichkeit der Spaltungsstelle zu gewährleisten, sondern auch eine molekulare Umgebung, welche die Substratbindung und Proteolyse erlauben.

Eukaryoten haben während der Evolution unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um die enzymatische Aktivität von Proteasen und das zugehörige Degradom zu kontrollieren. Dies kann zum einen durch eine spezifische Lokalisation in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten erfolgen. Abhängig von ihren jeweiligen Funktionen werden Proteasen sekretiert oder befinden sich auf der Außenseite der Plasmamembran (Ugalde et al. 2010), in Mitochondrien (Koppen et al. 2009), im Zytoplasma, im Zellkern oder dem Nukleolus (Blink et al. 2005; Yun et al. 2008; Belanger et al. 2009; Bier et al. 2011a). Ungeachtet der Tatsache, dass sich nur wenige Studien mit der dynamischen Lokalisation und dem aktiven nukleären Transport von Proteasen beschäftigen, könnte dies einen weiteren Regulationsmechanismus der Protease-Aktivität darstellen. Kürzlich konnte für einen Vertreter der typischerweise Membran-assoziierten Matrix-Metalloproteinasen eine biologisch relevante Funktion im Zellkern nachgewiesen werden (Marchant et al. 2014). Schlussendlich fehlten jedoch bislang Beispiele für Proteasen, deren enzymatische Aktivität über einen aktiven Transport-basierten Mechanismus reguliert werden kann. Unsere Studie konnte nun dieses evolutionäre Prinzip erstmalig für eine Protease beschreiben (Wünsch et al. 2015a). Dieser Transport-abhängige Regulationsmechanismus hängt dabei maßgeblich von der Existenz aktiver Lokalisationssignale (NLS/ NoLS, NES) ab, welche in der

Drosophila Taspase1 fehlen. Der nukleäre Export humaner Taspase1 durch ein NES wird dabei indirekt über den Interaktionspartner NPM1 vermittelt.

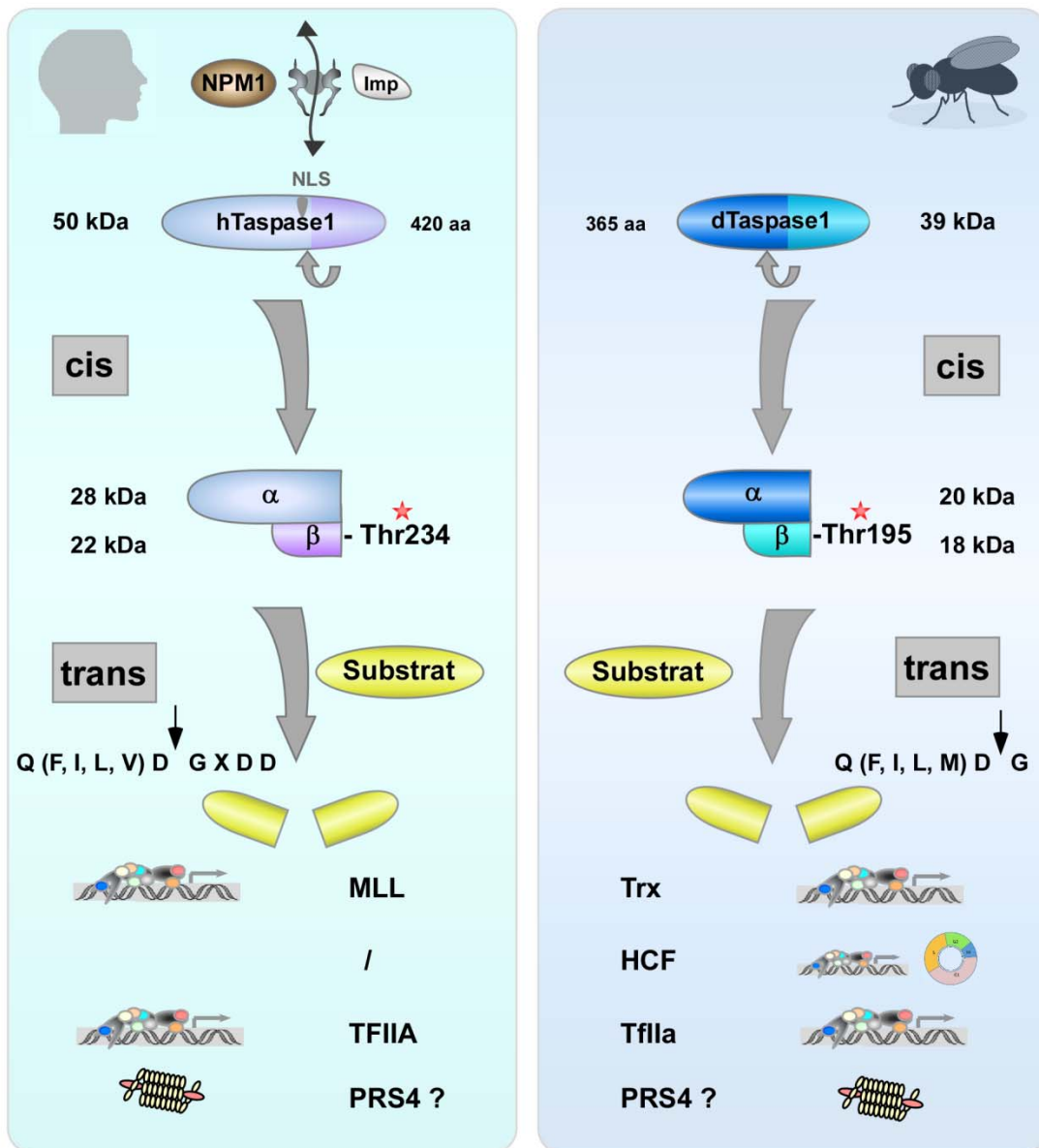


Abbildung 4.1: Vergleich der Regulation von humaner und *Drosophila* Taspase1

Während die Lokalisation und Funktion der humanen Taspase1 (links) maßgeblich durch ihre Interaktion mit Importin- α und dem NPM1-vermittelten Export bestimmt wird, konnte in *Drosophila* (rechts) kein gezielter Transportmechanismus identifiziert werden. Die Orthologen zeigen eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation. Der Mechanismus der intramolekularen Spaltung (*cis*-Aktivität) hingegen ist hoch konserviert und führt in der β -Untereinheit zur Exposition des katalytisch aktiven Nucleophils Threonin (Stern). Die darauf folgende Prozessierung der Substrate (*trans*-Aktivität) erfolgt an einer spezifischen Erkennungssequenz, welche in *Drosophila* von der für die humane Taspase1 charakterisierten Sequenz abweicht. Unter den bestätigten und vorhergesagten (?) Substraten finden sich zum Teil homologe Proteine, wie MLL/Trx und TFIIA (hier nur eine Auswahl potentieller Zielproteine gezeigt). Diese übernehmen dabei verschiedene Funktionen, wie beispielsweise

Genregulation (MLL/Trx, TFIIA), Zellzyklus-Kontrolle (HCF) und Regulation der proteasomalen Aktivität (PRS4).

Bioinformatische Analysen konservierter Proteine und ihrer NLS haben gezeigt, dass Homologe trotz ähnlicher Struktur und Funktion unterschiedliche Lokalisationssignale nutzen können (Cokol et al. 2000). Dem Sequenzvergleich zwischen humaner und *Drosophila* Taspase1 ist zu entnehmen, dass lediglich zwei der 9 basischen für die NLS-Funktionalität essentiellen Aminosäuren (**KRNKRK---KKRR**, konservierte unterstrichen) konserviert sind. In der Sequenz der dTaspase1 konnte zudem experimentell kein NLS nachgewiesen werden. Da das NLS maßgeblich an der subzellulären Verteilung und auch Funktionalität humaner Taspase1 beteiligt ist, lassen sich über das Fehlen eines funktionellen NLS in dTaspase1 Rückschlüsse auf dessen Lokalisation und Aktivität ziehen. Die für die humane Taspase1 beschriebene Regulation von Lokalisation und Aktivität über eine Importin- α /NPM1-Achse ist somit erst im Laufe der Entwicklung höherer Organismen entstanden. Dies geschah womöglich als Anpassung der Taspase1 an die wachsende Komplexität der zellulären Umgebung und der zu prozessierenden Substrate.

Evolutionäre Anpassungsmechanismen können die Struktur und Funktion von Proteasen nicht nur direkt auf genetischer Ebene modulieren, sondern beeinflussen womöglich damit auch weitere komplexe Regulationsmechanismen wie beispielsweise post-translationale Modifikationen (PTMs). Diese können bildlich als ein „Entkommen der Natur aus genetischer Gefangenschaft“ beschrieben werden (Prabakaran et al. 2012). Trotz unveränderlicher genetischer Information und der dadurch festgelegten dreidimensionalen Struktur eines Proteins erlauben PTMs eine nachträgliche Veränderung von Aminosäure-Eigenschaften und können somit die Struktur und Funktion von Proteinen post-translational beeinflussen. Die durchgeführten Analysen zur Identifikation des Modifikationsmusters der Taspase1 tragen somit zum weiteren Verständnis ihrer molekularen Wirkmechanismen bei. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Taspase1 durch verschiedene Histon-Acetyltransferasen (HATs) acetyliert werden kann. Die Relevanz der erzielten Ergebnisse konnte für endogen exprimierte Taspase1 in einer Tumorzelllinie gezeigt werden. Verschiedene Untersuchungen wie MS-Analysen zeigten, dass ein gewisser Anteil des Taspase1-Gesamtproteins nachweislich in acetylierter Form vorliegt. Bei dieser Acetylierung handelt es sich um eine dynamische Modifikation, die durch den entgegengerichteten Vorgang der Deacetylierung wieder rückgängig gemacht werden kann, im Falle der Taspase1 spezifisch durch die Histon-Deacetylase HDAC1 katalysiert. Ähnlich der Acetylierung durch GCN5 ist die Deacetylierung über HDAC1 ein konzentrationsabhängiger Prozess und geht wie in Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt mit einer starken Interaktion zwischen Taspase1 und HDAC1 einher.

Interessanterweise konnten bei der Untersuchung des homologen Enzyms HDAC2 signifikante Unterschiede bezüglich der Taspase1-Deacetylierung und Interaktion festgestellt werden. Trotz einer Protein-Sequenzhomologie von nahezu 80% war HDAC2 weder in der Lage mit Taspase1 zu interagieren noch eine Deacetylierung der Protease zu bewirken. Diese Ergebnisse waren insofern unerwartet, da HDAC1 und HDAC2 über eine N-terminale Dimerisierungsdomäne Heterodimere bilden, welche innerhalb größerer Proteinkomplexe die Deacetylierung gleicher Substrate katalysieren. Dadurch ist ein kompensatorischer Effekt zu beobachten, bei welchem die Inaktivierung einer der beiden Deacetylasen zur Hochregulierung der anderen führt (Segre et al. 2011). Dennoch sind in der Literatur einige Beispiele beschrieben, bei welchen trotz der hohen Redundanz Unterschiede in der Substrat-Spezifität bestehen. So führt eine differentielle Histon-Deacetylierung durch HDAC1 und HDAC2 in Chondrozyten zu einer unterschiedlichen Expression bestimmter Gene (Hong et al. 2009). Der Phänotyp von *Knockout*-Mäusen weist zudem auf spezifische, nicht-kompensatorische Funktionen von HDAC1 und HDAC2 hin. Während ein HDAC1-*knockout* in der frühen Embryogenese letal ist, überleben HDAC2-defiziente Tiere bis zur postnatalen Phase (Lagger et al. 2002; Montgomery et al. 2007). Dabei ist bislang unklar, wie und warum HDAC1 und HDAC2 in unterschiedlichen Kontexten überlappende oder spezifische Funktionen erfüllen. Eine Hypothese schlägt einen fein-regulatorischen Mechanismus der HDAC-Kontrolle vor, bei dem PTMs innerhalb des divergenten C-Terminus die Deacetylase-Funktion steuern (Brunmeir et al. 2009; Segre et al. 2011). Diese Region war aufgrund der erhöhten Divergenz Ziel erster Interaktionsstudien, welche die genaue Interaktionsdomäne von Taspase1 innerhalb der HDAC1-Sequenz bestimmen sollten. Interessanterweise wurde die Bindungsdomäne von Taspase1 nicht im C-Terminus, sondern innerhalb der ersten 100 Aminosäuren von HDAC1, folglich am N-Terminus lokalisiert. Dabei war diese N-terminale Domäne von HDAC1 ausreichend, um eine Interaktion von HDAC2 und Taspase1 zu vermitteln. HDAC1 und HDAC2 unterscheiden sich innerhalb dieses Bereiches in acht Aminosäuren, worunter sich drei ähnliche Aminosäuren befinden. Somit reichen diese geringen Abweichungen zwischen beiden Deacetylasen scheinbar aus, um ein unterschiedliches Interaktionsverhalten zu verursachen. Dies kann durch geringe Unterschiede in der Tertiärstruktur der Proteine bedingt sein, welche die Zugänglichkeit zum Substrat, in diesem Fall der Taspase1 bestimmen. Zudem spielen bei den unterschiedlichen Funktionen von HDAC1 und HDAC2, wie bereits erwähnt, ebenfalls post-translationale Modifikationen eine Rolle. So ist eine Acetylierung des Lysin74 und Lysin89 in HDAC1 beschrieben, welche nicht in HDAC2 vorzukommen scheint (Choudhary et al. 2009). Somit könnte diese Modifikation für ein unterschiedliches Interaktionsverhalten von HDAC1 mit Taspase1 verantwortlich sein. Hervorgehoben werden sollte die Tatsache, dass abgesehen von HDAC2, welches innerhalb der N-terminalen Region mit HDAC1 Heterodimere bildet,

die Taspase1 nach jetzigem Kenntnisstand das einzige Protein ist, mit dem HDAC1 über den N-Terminus interagiert. Neben HDAC1 und HDAC2 gehören noch zwei weitere HDACs in die Klasse I der Deacetylasen und kommen zusammen mit den zahlreichen weiteren in humanen Zellen vorkommenden Deacetylasen (HDAC3-11, Sirtuine) als mögliche Interaktionspartner der Taspase1 in Frage. In Zukunft sollten diese möglichen Kandidaten analysiert werden, um somit die Einzigartigkeit der HDAC1-Taspase1-Interaktion bewerten zu können.

Mittels massenspektrometrischer Analysen konnten anschließend acetylierte Lysinreste innerhalb des Taspase1-Proteins nachgewiesen werden. Dabei wurden für die modifizierenden HATs Präferenzen für spezifische Lysinreste innerhalb der α -Untereinheit identifiziert. Die Aussagen bezüglich der Acetylierung innerhalb der β -Untereinheit von Taspase1 gelten als unsicher, da die durchgeführten MS-Analysen keine gesicherte Peptidabdeckung für diesen Proteinbereich erbrachte. Die hängt vermutlich mit dessen dreidimensionaler Struktur zusammen. Die Ausbildung besonders starker Wechselwirkungen innerhalb der β -Kette (z.B. Disulfidbrücken) kann eine effektive Analyse mittels Massenspektrometrie erschweren. Um eine verbesserte Peptidabdeckung zu erreichen, könnten zudem neben Trypsin weitere Enzyme zum proteolytischen Verdau des Analyt-Proteins verwendet werden. Zudem lässt sich nicht jede modifizierte Position innerhalb eines Proteins mit der gleichen Wahrscheinlichkeit und Effizienz detektieren. So besteht durchaus die Möglichkeit, dass innerhalb der β -Untereinheit weitere Acetylierungsstellen vorhanden sind. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Analysen der TaspaseK258-Mutanten, die im Folgenden diskutiert werden. Die erzielten Ergebnisse bezüglich acetylierter Lysinreste können in Zukunft für die Generierung und Analyse von Taspase1-Acetylierungsmutanten genutzt werden und somit genauen Aufschluss über die Bedeutung einzelner Modifikationsstellen für die Aktivität der Protease geben.

Die spezifische Acetylierung und Deacetylierung der Taspase1, die ebenso mit spezifischen Interaktionen mit den daran beteiligten Enzymen einhergeht, spricht für einen regulatorischen Effekt hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität. Mit Hilfe des zellbasierten Biosensor-Assays konnte die Aktivität der Taspase1 im acetylierten sowie deacetylierten Zustand analysiert werden. Während eine GCN5-vermittelte Acetylierung keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität der Taspase1 hatte, verhinderte die Deacetylierung durch HDAC1 eine effiziente Prozessierung von MLL und USF2. Die *cis*-Aktivität der wildtypischen Taspase1 blieb unabhängig von ihrem Acetylierungsstatus erhalten. Durch Inhibition der HDAC1-Aktivität konnte die proteolytische Aktivität wiederhergestellt werden. Dies beweist, dass die Deacetylierung der Taspase1 durch HDAC1 für den Verlust der *trans*-Aktivität verantwortlich ist, und dies keinen unspezifischen Effekt darstellt, beispielsweise durch die

erhöhte Menge an transfizierter DNA in diesem Ansatz. Die Funktion endogener HDAC1 für die Taspase1-Aktivität bleibt bei diesen Untersuchungen unklar. HDAC1 ist als ubiquitär vorkommende Deacetylase beschrieben und sollte somit auch in den verwendeten Zelllinien vorkommen und aktiv sein. Eine Deacetylierung von Taspase1 durch endogene HDAC1 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Vermutlich ist sowohl die Expressionsmenge, als auch die Aktivität der endogenen HDAC1 streng reguliert, so dass in dem verwendeten System kein messbarer Effekt feststellbar ist. Dieser stellt sich erst nach Überexpression von Taspase1 und HDAC1 ein. Um diese Ergebnisse weitergehend zu sichern, sollte in Zukunft eine genetische Inhibition der HDAC1-Aktivität durch RNA-Interferenz und der Effekt auf die Taspase1-Funktion untersucht werden.

Einen Einfluss der Acetylierung auf die Aktivität der Taspase1 konnte auch durch die Untersuchung von Acetylierungsmutanten festgestellt werden. So zeigten sich nach Mutation des Lysin258 gravierende Effekte auf die *cis*- und *trans*-Aktivität. Während die Tasp258K-Mutante, bei der keine Acetylierung an Position 258 mehr möglich ist, eine normale intramolekulare Spaltung in die Taspase-Untereinheiten aufwies, zeigte die Tasp258Q-Mutante keinerlei Aktivität mehr. Somit führt die Simulation einer Acetylierung an dieser Position zu einer Hemmung der intramolekularen Spaltung, was mit einer Inhibition der *trans*-Aktivität einhergeht. Zwar ist die Tasp258R-Mutante noch autokatalytisch aktiv, jedoch in ihrer Substrat-Spaltung in *trans* eingeschränkt. Dieser Effekt konnte für die 2. Schnittstelle des MLL-Proteins wie auch für das Volllänge-Substrat USF2 nachgewiesen werden. Dies wirft eine Reihe neuer, interessanter Fragen auf. So wurde erstmals festgestellt, dass die Bildung von Taspase1-Untereinheiten nicht zwangsläufig mit dessen Aktivierung einhergeht. Sowohl aufgrund von HDAC1-Überexpression deacetylierte Taspase1 als auch die äquivalente Tasp258R-Mutante sind autokatalytisch aktiv, zeigen jedoch keine Aktivität bezüglich ihrer Substrate. Die intramolekulare Spaltung gilt bekanntermaßen als Aktivierungsmechanismus der Taspase1, welcher absolut essentiell für die Entstehung des katalytisch aktiven Nucleophils Thr234 ist (Hsieh et al. 2003a). Umgekehrt scheint die Bildung der Taspase1-Untereinheiten alleine nicht ausreichend für eine vollständige Aktivität zu sein. Dabei sind vermutlich Veränderungen in der Tertiärstruktur der Protease entscheidend, welche die Bindung und Zugänglichkeit zu den Substraten steuern. Eine gezielte Acetylierung und Deacetylierung von spezifischen Taspase1-Lysinresten könnte hier eine wichtige Rolle spielen. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Taspase1 in ihrer aktiven Form acetyliert vorliegt. Eine Deacetylierung hingegen ist mit einer Inaktivierung verbunden. Dabei liegt die Taspase1 selbst gespalten in ihre Untereinheiten vor. Die negative Beeinflussung der Protease-Aktivität durch Imitation einer konstitutiven Acetylierung an Position 258 in der Tasp258Q-Mutante steht dabei in Widerspruch zu der

erstellten Hypothese. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Mutation von Lys nach Gln mit einer sterischen Veränderung innerhalb des Taspase1-Moleküls verbunden ist, was eine Acetylierung imitieren soll, in diesem Fall jedoch mit einer Störung der aktiven Konformation einhergeht. Zum anderen kann eine dynamische Modifikation am Lysin258 erforderlich sein, um die Regulation der Taspase1-Aktivität zu gewährleisten. Alle erzielten Daten weisen darauf hin, dass das Lysin an Position 258 essentiell für die proteolytische Aktivität der Taspase1 zu sein scheint. Die Mutation dieses Lysinrestes führt daher zu starken funktionellen Einschränkungen bis hin zur vollständigen Inaktivität. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mit völliger Sicherheit geklärt werden, ob das Lysin258 in Taspase1 acetyliert vorliegt und somit für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Da Lysinreste auch potentielle Ziele für andere post-translationale Modifikationen wie Ubiquitinierung oder Sumoylierung darstellen, könnten auch diese Modifikationen für die differentielle Aktivität verantwortlich sein. Unveröffentlichte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die Taspase1 sumoyliert wird, nicht jedoch an Position K258 (Bier 2010). Eine Ubiquitinierung von Taspase1 wurde bislang nicht beschrieben oder untersucht. Um die funktionelle Bedeutung dieses Lysinrestes eindeutig klären zu können, sollte daher auch eine potentielle Ubiquitinierung von Taspase1 im Detail analysiert werden. Diese Modifikation kann zum einen die Protein-Stabilität und den proteolytischen Abbau von Proteinen, zum anderen jedoch auch die Lokalisation und Interaktion zwischen Proteinen steuern (Polo et al. 2002). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Taspase1-Mutanten eine von der wildtypischen Protease abweichende subzelluläre Lokalisation aufweisen. Um einen möglichen Einfluss der fehlenden nukleolären Akkumulation auf die Taspase1-Aktivität näher zu untersuchen, sollten Aktivitäts-Messungen von rekombinanten Taspase1-Varianten *in vitro* durchgeführt werden. Zusammenfassend ist ein koordinierter Ablauf von Acetylierung und Deacetylierung zur autokatalytischen Aktivierung und Substrat-Spaltung durch Taspase1 notwendig (siehe Abb. 4.2). Dabei spielen neben Lysin258 vermutlich noch weitere modifizierte Lysinreste eine Rolle. Für die GCN5-abhängige Acetylierung konnte die Modifikation für vier Lysine innerhalb der α -Untereinheit gezeigt werden. In ihrer acetylierten Form ist Taspase1 aktiv und spaltet ihre spezifischen Substrate, wodurch verschiedene *downstream*-Effekte, wie veränderte Genexpression und Proliferation, gesteuert werden können. Die Analyse dieser Effekte ist wichtiger Gegenstand zukünftiger Analysen. Die Interaktion mit HDAC1 resultiert in einer Deacetylierung der Taspase1 einhergehend mit dessen Inaktivierung. Einige Immunblot-Analysen zeigten nach HDAC1-Expression einen verminderten Anteil an Volllänge-Taspase1. Somit könnte die Deacetylierung zur vermehrten Dissoziation der Taspase1-Untereinheiten führen, was mit einem Verlust der katalytischen Aktivität einhergeht. Die Protease liegt zwar in Form ihrer Untereinheiten vor, diese können sich jedoch nicht mehr

zum aktiven Enzym zusammenlagern. Diese Hypothese würde die funktionelle Bedeutung der Acetylierung für die Taspase1-Aktivität stützen. Die dissoziierten Untereinheiten könnten anschließend dem System durch proteolytischen Abbau entzogen werden. Eigene Vorarbeiten weisen jedoch auf eine relativ hohe Proteinstabilität der Taspase1-Untereinheiten hin, so dass der Aspekt des proteasomalen Abbaus weiterer Untersuchungen bedarf.

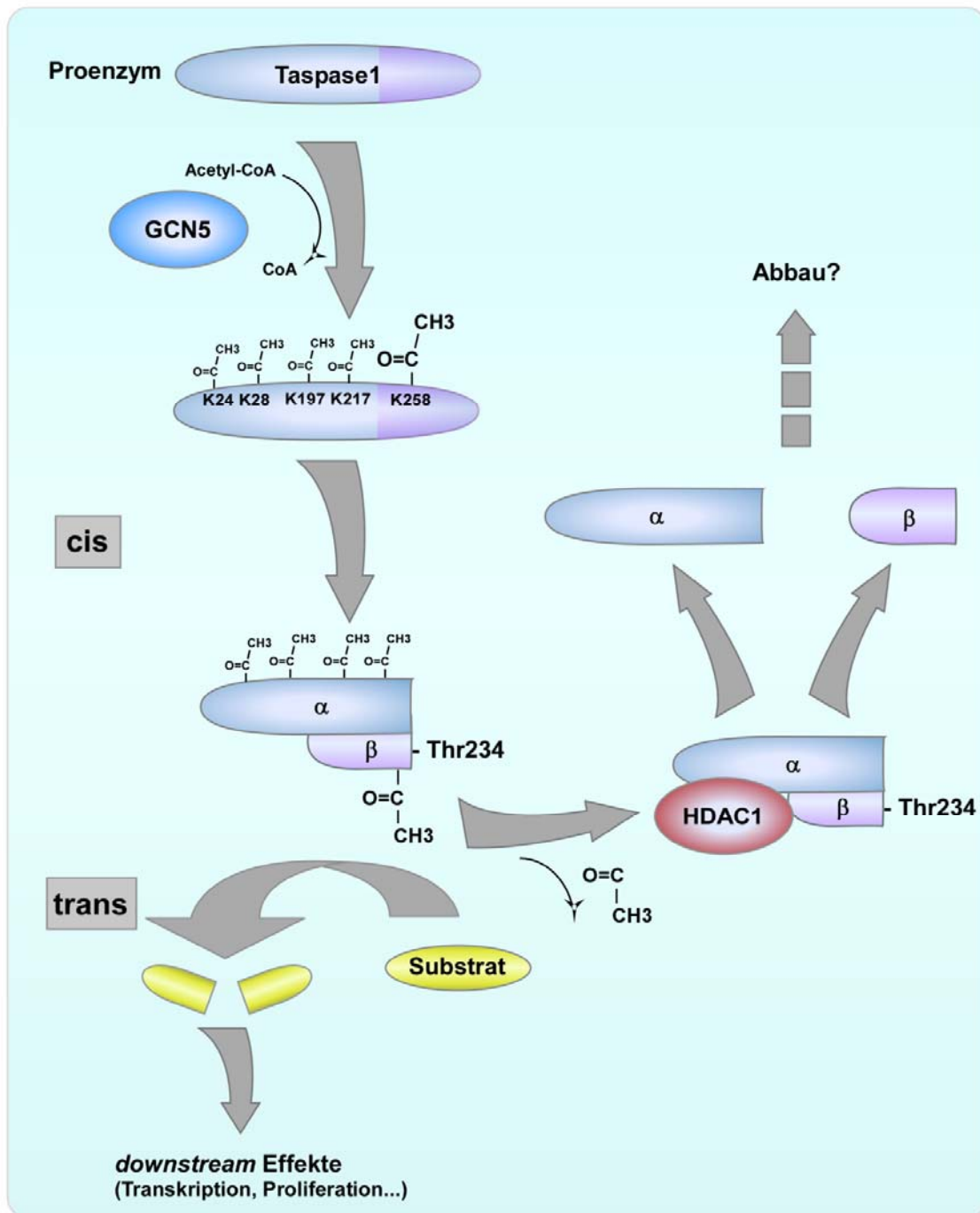


Abbildung 4.2: Modell der Acetylierungs-/Deacetylierungs-gesteuerten Regulation der Taspase1-Aktivität. Das Taspase1-Proenzym (blau/violett) wird durch GCN5 (dunkelblau) am

K258 acetyliert. Nach erfolgter *cis*-Spaltung lagern sich die α - (blau) und β -Untereinheit (violett) zur aktiven, acetylierten Protease zusammen, welche durch Substratspaltung (gelb) verschiedene *downstream*-Effekte auslöst. Deacetylierung durch HDAC1 (rot) hingegen führt zur Inaktivierung der Protease. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Schlussendlich ergibt sich durch die gezielte Aktivität von HATs und HDACs eine neue Möglichkeit zur Regulation der proteolytischen Taspase1-Aktivität. Der zugrunde liegende funktionelle Kontext bedarf dabei weiterer *in vivo* Untersuchungen, wobei die hier erlangten, auf Überexpression-basierenden Erkenntnisse auf die physiologische Situation übertragen werden sollten. Dies eröffnet eine neue therapeutisch zugängliche Regulationsebene, möglicherweise sogar über die Verwendung bereits klinisch eingesetzter HDAC-Modulatoren. Hilfreich bei diesen weiterführenden Analysen könnte die Etablierung einer Taspase1-defizienten Zelllinie beispielsweise Taspase1-*knockout*-Zellen aus Mäusen (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) sein. Eine neuartige Methode zur Herstellung von einer solchen Zelllinie stellt die Cas9/CRISPR-Technologie dar (Cong et al. 2013). Dieses ursprünglich bakterielle System macht sich eine Sequenz-spezifische Nuklease (Cas9) zunutze, welche durch eine spezifische, kurze RNA-Sequenz (guide oder gRNA) an die Zielsequenz innerhalb der genomischen DNA dirigiert werden kann. Dort erfolgt eine gezielte Spaltung des DNA-Doppel- oder Einzelstranges durch die Cas9-Nuklease. Der entstehende DNA-Strangbruch wird anschließend mittels *Non-homologous End-Joining* durch die zellinterne DNA-Reparaturmaschinerie repariert, wobei jedoch Deletionen entstehen. Dies wiederum hat die Transkription eines fehlerhaften Proteins zur Folge. Mit Hilfe der CRISPR-Methode lassen sich somit durch Design einer geeigneten gRNA auf genomischer Ebene gewünschte Mutationen erzeugen. Mit Hilfe dieser neuartigen Methode, die gegenüber bisherigen sh/siRNA-basierten *Knockout*-Methoden als vorteilhaft angesehen werden kann, soll in nächster Zukunft eine Taspase1-defiziente Zelllinie hergestellt werden. Verschiedene Vorarbeiten haben gezeigt, dass die kommerziell erhältlichen siRNAs, welche auf einen Abbau der Taspase1-spezifischen mRNA abzielen, keinen effizienten *Knock-down* der Taspase1-Proteinmenge bewirken (unveröffentlichte Daten). Somit erlaubt die Anwendung der Cas9/CRISPR-Technologie die Analyse verschiedener Fragestellungen in einem Taspase1-freien Zellsystem.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Bereiche der Protease-Forschung bearbeitet, die zur vollständigen Charakterisierung eines proteolytisch aktiven Enzyms erforderlich sind. Neben der Evaluation unterschiedlicher Inhibitionsstrategien zur Hemmung der Taspase1-Aktivität, konnten detaillierte Erkenntnisse zur evolutionären Entwicklung der Protease gewonnen werden. Des Weiteren liefern die Ergebnisse zu post-translationalen

Modifikationen und der eingehenden Beeinflussung der proteolytischen Aktivität wichtige Puzzlestücke zur angestrebten Entschlüsselung der Taspase1-Biologie in ihrer Gesamtheit.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Gibco/Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) und BD Bioscience Europe (Heidelberg) bezogen. Zellkultur-Schälchen für die Fluoreszenzmikroskopie stammten von der Firma MatTek (Ashland, MA, USA).

5.1.2 Chemikalien

Tabelle 5.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Acrylamid (Rotiphorese 30)	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Agarose	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH	Darmstadt
Ampicillin	AppliChem GmbH	Darmstadt
Biotherm Taq-DNA-Polymerase	Genecraft GmbH	Lüdinghausen
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Bovines Serumalbumin	AppliChem GmbH	Darmstadt
BSA 100x	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Coomassie-Brilliant Blau	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
3,3'-Diaminobenzidin	Dako GmbH	Glostrup
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
ECL, ECL-Plus	Amersham Bioscience	Buckinghamshire
Ethylendiamintetracetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Entwickler-Lösung	Imagine Medical	Sierra Blanca
Essigsäure, 100%	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Ethanol	AppliChem GmbH	Darmstadt
Enthelan	Merck KG aA	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Fetales Kälberserum	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Fixierer	Imagine Medical	Sierra Blanca
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH	Darmstadt
Giensa	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Größenstandard, Protein	peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Größenstandard, 100bp	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Größenstandard, 1kb	New England Biolabs Inc.	Ipswich
HCl, rauchend	Merck KG aA	Darmstadt
Hoechst 33342	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Hydroxurea	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Isopropanol	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
KCl	Merck KG aA	Darmstadt
KH ₂ PO ₄	AppliChem GmbH	Darmstadt

Leptomycin B	Axxora Dtl. GmbH	Lörrach
Lipofektamin 2000	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem GmbH	Darmstadt
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Natriumazid	Merck KG aA	Darmstadt
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Nucleotide-Mix	New England Biolabs Inc.	Ipswich
Paraformaldehyd	Serva Elektrophoresis GmbH	Heidelberg
PBS, steril	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Polyethylenimin PEI	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
PCR-Puffer, 10x	Genecraft GmbH	Lüdinghausen
Ponceau S	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Protease-Inhibitor-Mix	Roche Diagnostics	Mannheim
Rotiblock	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe
<i>ReBlotplus strong 10x Stripping</i>	Chemicon International	Hofheim
Takara	Cambrex Bioscience	Lonza
Tetramethylethyldiamin TEMED	Serva Elektrophoresis GmbH	Heidelberg
Tris	Neolab	Heidelberg
Triton-X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Trypan-Blau	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Trypsin/EDTA	Gibco, Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Tween20	AppliChem GmbH	Darmstadt
Valproinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH	München
Xylol	Merck KG aA	Darmstadt
Zitronensäure	Carl Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe

5.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 5.2: Übersicht der verwendeten Puffer

PBS	(„Phosphate buffered saline“) 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 7,4
DPBS	Dulbecco's PBS, entspricht PBS + 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
EDTA	0,5 M, pH 8,0

Weitere verwendete Puffer und Lösungen sind den Beschreibungen in den jeweiligen Abschnitten zu entnehmen.

5.1.4 Geräte

Tabelle 5.3: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav	5050 ELV	Tuttnauer	Breda
Bakterienbrutschrank	Gasboy C 40	Labotec	Midrand
Einfrierhilfe	„Mr. Frosty“	Nalgene Labware	Neerijse
Elektrophorese-kammer DNA	PerfectBlue Gelsystem Mini S	peqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Elektrophorese-kammer Protein	Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa Healthcare GmbH	Köln
Falkonzentrifuge	Universal 16R	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen
Gefrierschrank -80°C	Hera freeze	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Geldokumentation DNA	Multigenius Bioimagine	Syngene	Cambridge
Gelgießstand	Gießschiene PerfectBlue Mini S	peqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorff GmbH	Wesseling
Luminometer	Luminiskan Ascent	Thermo Labsystems	Darmstadt
Kühlzentrifuge	Biofuge firesco	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika	Staufen
Fluoreszenz-mikroskope	Nikon Eclipse TE2000-U AxioVert 200M	Nikon GmbH Zeiss	Düsseldorf Jena
Mikroskop-Zellkultur	Nikon TMS	Nikon GmbH	Düsseldorf
Mini-Tischzentrifuge	C13000-RT	Fisherbrand	Schwerte
Mikrotiterplatten-Photometer	Multiskan Ascent	Thermo Labsystems	Darmstadt
PCR-Thermocycler	Tpersonal	Biometra biomedizinische Analytik GmbH	Göttingen
PCR-Thermocycler	ThermalUno	VWR	Darmstadt
Photometer	Ultraspec 3100pro	Amersam Bioscience	Backinghamshire
Rollmixer	RollerMixer SRT6	Stuart Scientific	Asbach
Schüttelinkubator	Certomat H	B.Braun Biotech Int. GmbH	Melsungen
Schüttler	WS 10	Edmund Bühler GmbH	Hechingen
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Stickstoff-Tank	GT 38	Omnilab AG	Mettmenstetten
Stromgeber	Power Pac	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Tank-Blotter	PerfectBlue Tank Elektro Blotter Web S	peqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen

Tischzentrifuge	Mikro 120	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen
Trockenschrank	Function Line	Heraeus Holding GmbH	Hanau
UV-C-Strahler	UVC-Strahler Spot 30 Zubehör Hera Safe	Heraeus Holding GmbH	Hanau
UV-Tisch	TFX-35I	Biometra biomedizinische Analytik GmbH	Göttingen
Vortexer	VWR VV3	VWR Int. GmbH	Darmstadt
Waage	ABT 120-SDM	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Wasserbad	Polystat CC3	P.Huber Kältemaschinenbau GmbH	Offenburg
Zellkulturbrutschrank	Hera Cell	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Zentrifuge	Avanti JE-30-I	Beckman Coulter GmbH	Krefeld

5.1.5 Verwendete Antikörper

Für den Proteinnachweis mittels Western Blotting und die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die in den Tabellen 5.4 und 5.5 angegebenen Antikörper verwendet.

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Organismus	Eigenschaft	Hersteller	Verwendung	
				Western Blot	Immunfluoreszenz
Acetyl-Lysin (AcK)	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:1000 (in Roti-Block); üN 4°C	
<i>Drosophila</i> NLP	Kaninchen		Labor Patrick Heun, MPI	1:1000; ü.N. 4°C	
Flag-tag	Maus	monoklonal	Sigma	1:1000; ü.N. 4°C	1:200; 1h RT
HA-tag	Maus	monoklonal	Covance	1:1000; ü.N. 4°C	1:300; 1h RT
HDAC1 (C-19)	Maus	polyklonal	Santa Cruz	1:1000; ü.N. 4°C	
HDAC2 (C-8)	Maus	monoklonal	Santa Cruz	1:1000; 1 h RT	
His-tag	Maus	monoklonal	Sigma	1:1000; ü.N. 4°C	
GAPDH	Maus	monoklonal	Santa Cruz	1:3000; 1 h RT	
GFP (FL)	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz	1:5000; ü.N. 4°C	
GST (3D4)	Maus	monoklonal	Santa Cruz	1:1000; ü.N. 4°C	
mCherry	Ziege	polyklonal	Antibodies online	1:1000; ü.N. 4°C	

Myc-Tag	Maus	monoklonal	Cell Signaling	1:3000; ü.N. 4°C	1:400; 1h RT
NPM1	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:5000; ü.N. 4°C	
Taspase1 (D-20)	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz	1:3000; ü.N. 4°C	
Taspase1 (C-term)	Kaninchen	polyklonal	Abgent	1:1000; ü.N. 4°C	
TF2A- α (T-20)	Ziege	polyklonal	Santa Cruz	1:500; ü.N. 4°C	
TF2A- β (C-15)	Ziege	polyklonal	Santa Cruz	1:500; ü.N. 4°C	
TF2A- β (A-15)	Ziege	polyklonal	Santa Cruz	1:500; ü.N. 4°C	
V5-tag	Maus	monoklonal	Invitrogen	1:1000; ü.N. 4°C	1:300; 1h RT

Tabelle 5.5: Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Organismus	Fluorochrom/ Enzymatische Aktivität	Hersteller	Verwendung	
				Western Blot	Immun- fluoreszenz
Anti-Kaninchen	Ziege	Cy3	Dianova		1:400
Anti-Maus	Ziege	Cy3	Dianova		1:400
Anti-Ziege	Esel	Cy3	Mobitec		1:300
IgG Maus	Ziege	HRP	Santa Cruz	1:5000	
IgG Kaninchen	Ziege	HRP	Santa Cruz	1:5000	
IgG Ziege	Esel	HRP	Santa Cruz	1:10000	

5.1.6 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon und Sigma-Aldrich bezogen. Alle in dieser Arbeit für DNA-Sequenzierung, für Oligoannealing bzw. als Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind in folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 5.6: Primer zur Sequenzanalyse

Name	Sequenz
5'-pc3_seq	5'-GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC-3'
3'-pc3_seq	5'-CAACTAGAAGGCACAGTCGAG-3'
3'-GST_seq	5'-GCCTTTGCAGGGCTGGCAAG-3'
5'-GFP_seq	5'-GTGGCATCGCCCTCGCCCTC-3'
3'-GFP_seq	5'-GTGCTGCTGCCCGACAACCAC-3'
5'-mCherry_seq	5'-CTCCATGTGCACCTTGAAGC-3'
3'-mCherry_seq	5'-CACCATCGTGGAACAGTACG-3'
5'-T7_seq	5'-TAATACGACTCACTATAG-3'
3'-SP6_seq	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
3'-Tasp1_seq	5'-GAGCAGTTGGAGCACTGAGTG-3'
3'-TF2A_seq	5'-CAAACATGAGTGCTGCTGCT-3'

Tabelle 5.7: Oligonukleotide für Oligoannealing

Name	Sequenz
dTF2A-CS-for	5'-GGCCGCAGCCAAGCAATTGGACGGTGCCCTGGACTCCTCCGC-3'
dTF2A-CS-rev	5'-TCGAGCGGAGGAGTCCAGGGCACCGTCCAATTGCTTGGCTGC-3'
Myc-tag-Kpn-for	5'-CATGGAGCAGAAGCTTATCTCTGAAGAAGACCTTGGTAC-3'
Myc-tag-Kpn-rev	5'-CAAGGTCTTCTTCAGAGATAAGCTTCTGCTCCATGGTAC-3'

Tabelle 5.8: PCR-Primer

Name	Sequenz
5'-Bam-Taspase1	5'-TTTGGATCCACATGACCATGGAGAAGGGGATG-3'
3'-Nhe-Taspase1	5'-AAAGCTAGCGTTCAGTGGGCTCTCCAGGCGG-3'
5'-Bam-HDAC1	5'-TTTGGATCCATGGCGCAGACGCAG-3'
3'-Nhe-HDAC1	5'-TTTGCTAGCTCAGGCCAACTTGACCT-3'
5'-Bam-HDAC2	5'-TTTGGATCCATGGCGTACAGTCAAGGA-3'
3'-Nhe-HDAC2	5'-TTTGCTAGCTCAGGGTTGCTGAG-3'
3'-Nhe-HDAC1-dChfr	5'-TTTGCTAGCTTCCACACACTTGGCGTG-3'
3'-Nhe-HDAC1-dIACEE	5'-TTTGCTAGCGTCAGAGGAGCAGATCGA-3'
5'-Bam-HDAC1-dDeacetyl	5'-AAAGGATCCAATGAGCTTCCATACAATGAC-3'
5'-Bam-HDAC1-dNTD 1-52	5'-AAAGGATCCATGATCTATCGCCCTCACAAAGCC-3'
5'-Bam-HDAC1-dNTD 1-100	5'-AAAGGATCCATGCCAGTATTCGATGGCCTGTTGA-3'
3'-Nhe-HDAC1-long	5'-AAAGCTAGCGGCCAACTTGACCTCCTCCTT-3'
5'-Bam-HDAC2-dNTD 1-101	5'-TTTGGATCCATGCCAGTGTGATGGACTCTTTG-3'
3'-Nhe-HDAC2-long	5'-TTTGCTAGCGGGTTGCTGAGCTGTTCTG-3'
3'-Bam-HDAC1 aa1-100	5'-TTTGGATCCACAGTCCACCAACGTT-3'
5'-KpnI-dTasp	5'-TTTGGTACCATGGCAGGCTTCGTCGCAGTG-3'
3'-NheI-dTasp	5'-TTTGCTAGCAATGCGCAGGTGGAAGTTGTGG-3'

5'KpnI-dUSF	5'-TTTGGTACCATGAATGTTTACAAGCGGC-3'
3'Nhe-dUSF	5'-AAAGCTAGCCTCATCAAATCGCTGATCAG-3'
5'NotI-dUSF	5'-TTTGCGGCCGCAATGAATGTTTACAAGC-3'
3'Xho-dUSF	5'-TTTCTCGAGCCTCATCAAATCGCTGATCA-3'
5'KpnI-dTF2A	5'-TTTGGTACCATGGCGCTATGCCAGACA-3'
3'Nhe-dTF2A	5'-TTTGCTAGCCACTCGGCGTCGCCATT-3'

Tabelle 5.9: Primer für SOE-PCR

Name	Sequenz
dTaspase1-T195V-for	5'-GCTTTGGACGTAGTGGGAGCG-3'
dTaspase1-T195V-rev	5'-CGCTCCCACTACGTCCAAAGC-3'
dTF2A-Nhemut-for	5'-AACAAGTTGCTTGCAAGTAAGGCCGTC-3'
dTF2A-Nhemut-rev	5'-GACGGCCTTACTTGCAAGCAACTTGTT-3'

5.1.6 Vektoren

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klonierungs-Vektoren und die konstruierten bzw. erhaltenen Expressions-Vektoren aufgeführt.

Tabelle 5.10: Klonierungs-/Ausgangs-/Kontroll-Vektoren

Plasmid	Relevante Merkmale	Quelle
pGEM Teasy	amp ^r , Klonierungs-Vektor	Promega, Mannheim
pCDNA3 (+)	amp ^r , eukaryontischer Expressions-Vektor; neo ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pC3_GFP	amp ^r , eukaryontischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (<i>Rosorius et al. 1999</i>)
pC3_BFP	amp ^r , eukaryontischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (<i>Rosorius et al. 1999</i>)
pC3_mCherry	amp ^r , eukaryontischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (<i>Rosorius et al. 1999</i>)
pC3_GST/GFP	amp ^r , eukaryontischer Expressions-Vektor, neo ^r , zur Klonierung N-terminaler GST- und C-terminaler GFP-Fusionsproteine	ehemaliges Labor Prof. Stauber (<i>Rosorius et al. 1999</i>)
pAC 5.1/ V5 His-A	amp ^r , Expressions-Vektor für <i>Drosophila</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pIB/V5-His	amp ^r , Expressions-Vektor für <i>Drosophila</i>	Life technologies

Tabelle 5.11 Humane Expressionsvektoren

Plasmid	Kodiert für	Referenz
pc3-Tasp-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-Tasp-mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-TaspTV-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)

	von Thr234 nach Val	al. 2011b)
pc3-TaspTV-mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry mit einer Mutation von Thr234 nach Val	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-Tasp-HA	Volllänge Taspase1 in Fusion mit <i>HA-tag</i>	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-TaspTV-HA	Volllänge Taspase1 in Fusion mit <i>HA-tag</i> mit einer Mutation von Thr234 nach Val	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-TaspK258R-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Lys258 nach Arg	Dissertation Carolin Bier
pc3-TaspK258Q-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP mit einer Mutation von Lys258 nach Asn	Dissertation Carolin Bier
pc3-BioTasp _{CS2}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CS1}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle1 des MLL-Proteins-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(K1A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von K6 nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(I2A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von I5 nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(S3A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von S4 nach Ala -myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(Q4A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von Q3 nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(L5A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(L5I)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Iso-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(L5F)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Phe-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(L5W)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Trp-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(D6A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D1 nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(G7A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von G1' nach	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)

	Ala-myc-RevNES	
pc3-BioTasp _{CSmut(V8A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von V2' nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(D9A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D3' nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{CSmut(D10A)}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D4' nach Ala-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{TF2A}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-TFIIA-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{Myo1F}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-AS 152-268 von Myo1F-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-BioTasp _{USF2}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-USF2-myc-RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-Tasp _{Cyt}	wanderndes Taspase1 Volllänge Protein in Fusion mit GFP und RevNES	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-TFIIA-GFP	Volllänge TFIIA in Fusion mit GFP	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-USF2-GFP	Volllänge USF2 in Fusion mit GFP	Dissertation Carolin Bier (Bier et al. 2011b)
pc3-SV40NLS-GFP-GST-RevNES	SV40NLS in Fusion mit GFP, GST und RevNES	Labor Prof. Stauber, Mainz (Knauer und Stauber 2005)
PF143	pCDNA3.1-Vektor, der für GFP kodiert	ehemaliges Labor Prof. Stauber (<i>Rosorius et al. 1999</i>)
pc3-TIP60-His	Volllänge TIP60 in Fusion eines His- <i>Tags</i>	Labor Prof. Heinzel / Dr. Krämer, Jena
pCMV-CBP-Flag	Volllänge CBP in Fusion eines Flag- <i>Tags</i>	Labor Prof. Blobel, Philadelphia (USA) (Deng et al. 2003)
pc3-Flag-GCN5	Volllänge GCN5 in Fusion eines Flag- <i>Tags</i>	Labor Dr. Yang, Royal Victoria Hospital, Montreal (Cdn)
pcX-Flag-pCAF	Volllänge pCAF in Fusion eines Flag- <i>Tags</i>	Labor Dr. Kouzarides, Cambridge (UK) (Martinez-Balbas et al. 2000)
pc3-HA-p300	Volllänge p300 in Fusion eines HA- <i>Tags</i>	Labor Prof. Eckner, Zürich (Ch) (Eckner et al. 1994)
pc3-HDAC1-myc	Volllänge HDAC1 in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Labor Prof. Heinzel / Dr. Krämer, Jena
pc3-HDAC2-V5	Volllänge HDAC2 in Fusion eines V5- <i>Tags</i>	Labor Prof. Heinzel / Dr. Krämer, Jena
pc3-HDAC2-myc	Volllänge HDAC2 in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Diese Arbeit
pc3-HDAC1-ΔChfr-	HDAC1 Deletionsmutante (Δ aa 287-482) in Fusion eines	Diese Arbeit

myc	myc- <i>Tags</i>	
pc3-HDAC1- Δ IACEE- myc	HDAC1 Deletionsmutante (Δ aa 412-482) in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Diese Arbeit
pc3-HDAC1- Δ Deacetyl-myc	HDAC1 Deletionsmutante (Δ aa 1-325) in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Diese Arbeit
pc3-HDAC1- Δ 1-52- myc	HDAC1 Deletionsmutante (Δ aa 1-52) in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Diese Arbeit
pc3-HDAC1- Δ 1-100- myc	HDAC1 Deletionsmutante (Δ aa 1-100) in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Diese Arbeit
pc3-HDAC2-NTD- HDAC1-myc	Chimäres Protein bestehend aus HDAC1 aa1-100 und HDAC2 aa102-488 in Fusion eines myc- <i>Tags</i>	Diese Arbeit
pc3-dTasp-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pc3-dTasp-mCherry	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pc3-myc-dTasp-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit myc- <i>tag</i> (N- terminal) und GFP (C-terminal)	Diese Arbeit
pc3-dTaspTV-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit GFP mit Mutation von Thr195 nach Val	Diese Arbeit
pc3-dTasp-HA	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit <i>HA-tag</i>	Diese Arbeit
pc3-dTaspTV-HA	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit <i>HA-tag</i> mit Mutation von Thr195 nach Val	Diese Arbeit
pc3-dUSF2-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> USF2 in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pc3-BioTasp _{dUSF}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-dUSF-myc- RevNES	Diese Arbeit
pc3-dTF2A-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> TF2A in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pc3-BioTasp _{dTF2A}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-dTF2A-CS-myc- RevNES	Diese Arbeit

Tabelle 5.12: *Drosophila* Expressionsvektoren

Plasmid	Kodiert für	Referenz
pAC-dTasp-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pAC-dTasp-mCherry	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit mCherry	Diese Arbeit
pIB-dNLP-mCherry	Volllänge <i>Drosophila</i> Nukleoplasmin-like Protein in Fusion mit mCherry	Labor Patrick Heun, MPI Freiburg
pIB-dNLP	Volllänge <i>Drosophila</i> Nukleoplasmin-like Protein ohne <i>tag</i>	Labor Patrick Heun, MPI Freiburg
dBioTasp _{CS2}	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase- Schnittstelle2 des MLL-Proteins-myc-RevNES im pAC- Vektor	Diese Arbeit
pAC-hTasp-GFP	Volllänge humane Taspase1 in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pAC-dTaspTV-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> Taspase1 in Fusion mit GFP mit Mutation von Thr195 nach Val	Diese Arbeit
pAC-dTF2A-GFP	Volllänge <i>Drosophila</i> TF2A in Fusion mit GFP	Diese Arbeit

pAC-dBioTaspdTf2A	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-dTF2A-CS-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(K1A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von K6 nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(I2A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von I5 nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(S3A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von S4 nach Ala -myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(Q4A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von Q3 nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(Q4N)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von Q3 nach Asn-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(L5A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(L5I)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Iso-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(L5F)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von L2 nach Phe-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(D6A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D1 nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(G7A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von G1' nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(V8A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von V2' nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(D9A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D3' nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit
pAC-dBioTaspCSmut(D10A)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase-Schnittstelle2 des MLL-Proteins mit Mutation von D4' nach Ala-myc-RevNES	Diese Arbeit

5.1.7 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Tabelle 5.13 Charakterisierung der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller/Referenz
<i>E.coli</i> XL2-Blue™	recA1 endA1 gyrA96 thi ⁻¹ hsdR17 supE44 relA1 lac [F0 proAB lacqZ _{M15} Tn10 (Tetr) Amy Cam ^r]	Stratagene (Heidelberg)
<i>E.coli</i> Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araIeu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Darmstadt)

5.1.8 Zelllinien

Tabelle 5.14: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Organismus/Gewebe/Charakteristika	ATCC Nr./Referenz
293T	Embryonales Nierengewebe, <i>Homo sapiens</i>	CRL-11268
H441	Lunge, papilares Adeno-Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	HTB-174
HeLa	Cervix Adeno-Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	CCL-2
S2R+	<i>Drosophila melanogaster</i> Zellen (late embryonic stage)	(Yanagawa et al. 1998)
SW480	Kolo-Rektales Adeno-Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	CCL-228

5.1.9 Software

Tabelle 5.15 verwendete Software

Programm	Referenz/Internetseite
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
UniProt	www.uniprot.org/
GeneDoc	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
ScanProsite	via ExpASy server
ProtScale	via ExpASy server
InterPro scan	via ExpASy server
ExpASy Server	www.expasy.org

DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit und Gene Construction *Kit* analysiert. Homologierecherchen mit Proteinsequenzen erfolgten mit der UniProt Datenbank und des GeneDoc Programms. Für die Analyse der Proteinsequenz (Motive, Domänen, etc.) wurden die in der Tabelle aufgeführten Algorithmen verwendet. Neben den Standard-Office-Programmen wurden außerdem AxioVision 3.0, Leica *Confocal Software*, PhotoShop 5 und Canvas 9 zur Datenauswertung und Bildbearbeitung benutzt.

5.2 Methoden

5.2.1 Polymerasekettenreaktion

- Biotherm Taq-DNA-Polymerase von GeneCraft (Lüdinghausen)
- PCR-Reaktionspuffer, 10x Biotherm (enthält 15mM MgCl₂)
- dNTP-Mix, 10mM
- spezifische Primer siehe Tabelle
- Aqua bidest., steril

Für einen 50 µl PCR-Ansatz werden die Komponenten wie in Tabelle 5.16 beschrieben auf Eis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert.

Tabelle 5.16: Pipettierschema für einen 50µl PCR-Ansatz

Komponente		Volumen pro Reaktion [µl]	Endkonzentration im Ansatz
PCR-Mix:	10x PCR-Puffer	5	1x
	10 mM dNTP-Mix	1	200 µM
	10 µM „forward“ Primer	1	0,1 µM
	10 µM „reverse“ Primer	1	0,1 µM
	Template	variabel	0,2-0,5 µg
Biotherm Taq-Polymerase		1	5 U
Aqua bidest., steril		Ad 50 µl	-

Das jeweilige PCR-Programm wird im Thermocycler von Biometra (Göttingen) oder von VWR (Darmstadt) durchgeführt (vgl. Tabelle 5.4), wobei für die Amplifikation eines Sequenzbereiches von einer Länge größer einem Kilobasenpaar das *Expand*-Programm verwendet wird. Das Standard-Programm ist für PCR-Produkte von bis zu einem kb ideal. Die jeweilige Primer-Annealing-Temperatur richtet sich nach den gewählten Primern.

Tabelle 5.17: PCR-Programme

PCR Programm	
Standard	95°C/10min (95°C/30s; 60°C*/1min; 72°C/1min) x 30 Zyklen; 72°C/ 7min; 4°C/ ∞
Expand	94°C/ 2min (94°C/10s; 60°C */ 30s; 68°C/ 4min) x 9 Zyklen (94°C/ 15s; 56°C */ 30s; 68°C/ 4min) x 26 Zyklen; 68°C/ 7min; 4°C/ ∞

*richtet sich nach Primerpaar

5.2.2 Splice-Overlap Extension PCR (SOE-PCR)

Bei der SOE-PCR handelt es sich um ein wichtiges Werkzeug zur Erzeugung von gerichteten Mutationen in einem bekannten Sequenzbereich. Es lassen sich Einzel- oder Mehrfach-Mutationen, Insertionen oder Deletionen einfügen, und somit die biologische Funktion des translatierten Proteins genauer untersuchen.

Das Prinzip beruht auf zwei nacheinander durchgeführten PCR-Runden (PCR-1 und PCR-2), bei denen zunächst das zu amplifizierende Fragment in zwei Teilen vermehrt wird, welche in PCR-2 als Template dienen. Zunächst wird in PCR-1 jeweils einer von zwei „äußeren“ Primern (siehe Abb. 5.1 a und d) mit einem der beiden „inneren“ Primern (b oder c) kombiniert. Entscheidend ist hierbei das „Primer-Design“, da beide innenliegenden Primer so gewählt werden müssen, dass die gewünschte Mutation (in Abb. 5.1 „+“) in ihrer Sequenz vorhanden ist. So entsteht nach der ersten PCR-Runde das zu amplifizierende Fragment in zwei Teilen (AB und CD), wobei beide Teile dabei in dem zu mutierenden Bereich überlappen und die gewünschte Mutation enthalten. In der zweiten PCR-Runde wird nun das komplette Fragment in einem Stück amplifiziert, wobei die beiden äußeren Primer (a und d) und die in PCR-1 gebildeten Teile als Template kombiniert werden. Das Produkt aus PCR-2 ist somit das gesamte Fragment mit der gewünschten Mutation. Mit diesem PCR-Produkt kann wie in folgenden Abschnitten beschrieben weiter verfahren werden.

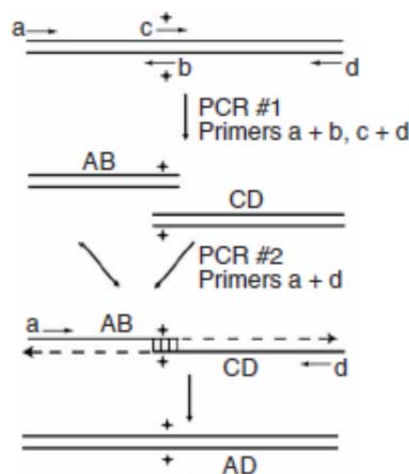


Abbildung 5.1: Prinzip der SOE-PCR (nach (Heckman und Pease 2007))

5.2.3 Oligoannealing

Synthetisch hergestellte komplementäre Oligonukleotide können bei einer Ligation als *Insert* verwendet werden. Sofern die Oligonukleotide nicht phosphoryliert sind, werden die 5'-Enden zunächst mit einer Phosphonukleotidkinase (PNK, NEB, Schwalbach) phosphoryliert. Für die Phosphorylierung werden je 1µg der in HPLC-H₂O gelösten Oligonukleotide mit je 1µl PNK-Puffer, dNTPs und PNK versetzt und auf 10µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt für 20min bei 37°C. Für die Hybridisierung (*Annealing*) wurden 2µl 10xNEB Puffer 3 und H₂O_{bidest} ad 20µl Reaktionsvolumen hinzugegeben, das Gemisch in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt und bei Raumtemperatur abgekühlt.

5.2.4 DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese

- 10x Restriktionspuffer von NEB
- BSA, 100x von NEB (1:10 verdünnt)
- Restriktionsenzyme 10 U/µl von NEB
- Agarose
- Ethidium-Bromid (Stocklösung: 2 mg/ml H₂O)
- TAE-Puffer, 1x (4,84 g Trizma Base, 2 ml 500 mM EDTA, ad pH 8,5 konz. Salzsäure, ad 1 l H₂O)
- Ladepuffer (20% Glycerin, 100 mM EDTA, 0,25 g Bromphenolblau)
- Größenstandard (NEB), 100 bp und 1 kb (in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA)

Für die Restriktionsenzyme (NEB) sind die angegebenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet worden. Generell wurden 1-5µg DNA verdaut und nach Zugabe des 5x DNA-Probenpuffers elektrophoretisch in 0,8-2% Agarose-Gelen aufgetrennt.

5.2.5 Gel-Elution

- QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Düsseldorf)
enthält QIAquick Spin-Säulen, PE-Puffer mit Ethanol, QG-Puffer, EB-Puffer

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese wird die gewünschte Bande auf dem Transilluminator ausgeschnitten und gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert.

5.2.6 DNA-Ligation

- CIP, 2 U/µl von NEB
- NEB-Puffer 3, 10x von NEB (Ipswich)
- Takara-DNA-Ligase, Solution 1, Version 2.1 von Cambrex (Lonza)
- T4-DNA Ligase von NEB

Mit Hilfe der DNA-Ligation können durch *PCR* hergestellte oder durch Restriktionsenzyme ausgeschnittene DNA-Fragmente (*Inserts*) in entsprechend aufgeschnittene Plasmid-Vektoren inseriert werden. Es wurde entweder die T4-DNA-Ligase der Firmen NEB (Frankfurt) oder TaKaRa (über Mobitec, Göttingen bezogen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, werden die 5'-Enden des restringierten Vektors mittels alkalischer Phosphatase nach Angaben des Herstellers verdaut.

5.2.7 DNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt entweder mit einem programmierbaren UV/Visible-Spektrometer (Amersham) in einer Quarzküvette oder mit Hilfe des NanoDrop-Spektrometers 2000c der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham). Die Extinktionsmessung findet bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm statt.

5.2.8 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

- kompetente *E.coli*-Zellen (siehe Tabelle 5.13)
- LB-Amp-Agarplatten
10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Yeast Extract, 20 g Bacto Agar, pH 7,0 mit NaOH, H₂O ad 1 l
nach dem Autoklavieren und Abkühlen 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) hinzugeben

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut und pro Ligationsansatz werden 50 µl der Zellen hinzugegeben. Nach halbstündiger Inkubation auf Eis erfolgt der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Danach werden die Zellen erneut auf Eis gebracht. Der komplette Ansatz wird auf angewärmten Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

5.2.9 Plasmidvermehrung

- LB-Amp-Medium
10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Yeast Extract, pH 7,0 mit NaOH, H₂O ad 1 l
nach dem Autoklavieren und Abkühlen 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) hinzugeben

Die *E.coli* Kulturen werden unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert.

5.2.10 Plasmidpräparation

- DNA Miniprep-Kit von Qiagen (Düsseldorf)
enthält QIAprep 8er-Säulen, PE- (mit EtOH), P1- (mit RNase A und Lysis-Control), P2-, N3- und EB-Puffer
- Bzw. DNA Maxiprep-Kit von Qiagen (Düsseldorf)
enthält QIAGEN-tip 500,P1- (mit RNase A und Lysis-Control), P2-, P3-, QBT-, QC- und QF-Puffer
- Isopropanol
- Ethanol, 70% (w/v)

Zunächst werden die *E.coli* Zellen werden aus der Übernachtskultur mittels Zentrifugation pelletiert. Je nach benötigter DNA-Menge wird entweder das DNA Miniprep-Kit oder das Maxiprep Kit (Qiagen) gemäß Angaben des Herstellers verwendet. Zur langfristigen Lagerung und Herstellung von Glycerinkulturen der Bakterien werden pelletierte Zellen mit 15% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

5.2.11 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Genterprise Sequenzierservice GmbH (Mainz) durchgeführt. Die Sequenzauswertungen erfolgt mit Hilfe der Software *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Ibis Biosciences).

5.2.12 RNA-Extraktion

- Trizol von Invitrogen (Karlsruhe)
- Chloroform
- 70% Ethanol
- RNeasy Mini Kit von Qiagen (Düsseldorf)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wird nach den Angaben des RNeasy Mini Kits durchgeführt.

5.2.13 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche (Mannheim)

Nach den Angaben des verwendeten Kits wird aus 1µg Gesamt-RNA cDNA gewonnen.

5.2.14 Herstellung von Gesamt-Zelllysaten

- modifizierter RIPA-Puffer
50 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1% Na-deoxycholat, 1% Triton-X-100, Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche)
- IP-Lysispuffer (Interaktion)
50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche), Lagerung bei -20°C
- IP-Lysispuffer (Acetylierung)
25mM Tris-HCl, pH 7.0, 150mM NaCl, 1% SDS, 1% Na-deoxycholate, 1% NP-40, Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche), kurz vor Gebrauch: 1µM TSA, Lagerung bei -20°C

Die Zellen werden mittels Zellschaber geerntet und bei 1500 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen auf Eis im jeweiligen Lysepuffer resuspendiert. Das verwendete Volumen des Aufschlusspuffers richtet sich dabei nach der Größe des Zellpellets (40-100 µl) bei RIPA-Lysaten, bei Lysaten für anschließende Immunpräzipitation wird pro Ansatz 1ml des Lysepuffers verwendet. Die Zellyse erfolgt für 20 Minuten auf Eis, wobei die Lysate während der Inkubationszeit sonifiziert werden (2x 30Pulse, 50%). Nach Zentrifugation des Lysats bei 13.000 rpm, 20 Minuten und 4°C wird der Überstand bei -80°C aufbewahrt oder direkt für die Immunpräzipitation weiter verwendet.

5.2.15 Immunpräzipitation (IP)

- µMACS GFP Isolation Kit von Miltenyi (Bergisch Gladbach)
- µMACS Protein A/G MicroBeads von Miltenyi (Bergisch Gladbach)

Mittels der Immunpräzipitation lässt sich ein spezifisches Protein mit Hilfe eines Antikörpers aus einem Gesamt-Zelllysate isolieren. Das hier verwendete Kit von Miltenyi liefert dabei gebrauchsfertige magnetische Beads, an die je nach Bedarf Antikörper gekoppelt sind, hier wurden Beads gekoppelt an einen GFP-Antikörper verwendet. Des Weiteren wurden Protein A bzw. Protein G-Beads verwendet, welche das eigenständige Koppeln eines beliebigen Antikörpers an die Beads erlauben. Hier wurden

verschiedene Taspase1-Antikörper an die magnetischen Beads gemäß den Angaben des Herstellers gekoppelt.

Für die Immunpräzipitation werden transfizierte 293T Zellen (5×10^7 Zellen pro 10cm Schale) verwendet. Die Zellyse erfolgt mit je 1ml IP-Lysepuffer wie in Abschnitt 5.2.13 beschrieben und nach Abnahme des Überstandes werden 30 μ l (3% Input) abgenommen und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Restliches Lysat wird gemäß Herstellerangaben für die Immunpräzipitation verwendet. Die Elution erfolgt mit insgesamt 70 μ l/ Probe heißem (95°C) Elutionspuffer. Die native Elution erfolgt mit 70 μ l/ Probe 0,1M Triethylamin (pH12) + 3 μ l/Probe MES-Puffer (pH 3). Das native Eluat wird mit Dissoziationspuffer versetzt und gekocht wie in 5.2.17 beschrieben.

5.2.16 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Die Stammlösung des Proteinfärbe-Reagens (BioRad Protein Assay, mit Coomassie G-250, BioRad) wird mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Jeweils 5 μ l des Proteinlysats und des entsprechenden Lysis-Puffers werden mit 1ml Bradford-Lösung vermischt, bei 595 nm im Photometer vermessen und anhand einer Eichkurve quantifiziert.

5.2.17 SDS-PAGE

- Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30% w/v; 0,8% w/v)
- Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH8,9; 0,4% SDS)
- Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) von Serva Electrophoresis (Heidelberg)
- APS, 10% (1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml H₂O, sterilfiltrieren und Aufbewahrung bei -20°C)
- Isopropanol
- Gelgießstand für Acrylamidgele von Biorad (München)
- Zellysate (Herstellung siehe Kapitel 5.2.14)
- 6x Lämmli-Ladepuffer (2,25 ml Tris 1M pH 6,8; 5 ml Glycerin; 0,5 g SDS; 2,5 ml DTT 1M; H₂O ad 10 ml; 2 mg Bromphenolblau)
- 1x SDS-Laufpuffer (30,3 g Tris; 144,1 g Glycin; 5 g SDS; H₂O ad 1 l; pH 8,8)
- 10x Lämmli-Laufpuffer (30,3 g Tris; 144,1 g Glycin; 5 g SDS; H₂O ad 1 l; pH 8,8)
- Größenstandard peqGOLD Prestained Proteinmarker IV von peqLab (Erlangen)

Die Proben werden mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und 5 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Polyacrylamidgel wird in das Gelkammersystem von Biorad eingespannt und 20-30 μ l der Proben pro Gelkammer geladen. Die IP-Eluate sind nach Elution mit heißem Dissoziationspuffer (vgl. 5.2.15) bereits denaturiert und es werden 30-35 μ l pro Probe aufgetragen. Gleichzeitig werden etwa 8 μ l des Größenstandards aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgt zunächst zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel bei etwa 50 V, nach dem Erreichen des Trenngels bei bis zu 100 V.

5.2.18 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

- Coomassie-Färbelösung (50 mg Coomassie, 40 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure, in 100 ml H₂O lösen)
- Entfärber (400 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, 500 ml Aqua bidest.)

Das Polyacrylamidgel wird zunächst für 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärber gewaschen bis die Proteinbanden sichtbar werden. Dies erfolgt meist über Nacht.

5.2.19 Western Blot/ Immunblot

- SDS-Polyacrylamidgel mit aufgetrennten Proben
- Roti® - PVDF-Membran von Roth (Karlsruhe), 9x6 cm
- Whatman-Papier von Fisher Scientific (Schwerte), 10x7 cm
- Wet-Blot-Transferpuffer, 10x (30 g Tris, 144 g Glycin 200 ml Methanol, H₂O ad 1 l)
- Magermilchlösung (5% in PBS, versetzt mit 0,1% Tween 20)
- Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS)
- Antikörper-Lösungen (siehe Tabelle 5.4 und 5.5)
- Wet-Tank-Blot von peqLab (Erlangen)
- ECL-Lösung oder ECL-Plus-Lösung von Amersham (Buckinghamshire)
- Fotofilme von Fuji (Kleve)
- Filmkassette von Okamoto (Langen)
- Entwicklermaschine von Agfa (Köln)
- Entwickler- und Fixierlösung von Imagine Medical (Sierra Blanca)
- Bzw.
- Entwickler ChemiDoc MP (BioRad)

Vor dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wird diese eine Minute in Methanol aktiviert und 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Das Blotten erfolgt bei 4°C mit konstanter Stromstärke von etwa 300 mA (Spannung zwischen 50-100 V) für 1-2 Stunden. Anschließend wird die Membran zum Blocken in etwa 5 ml Magermilchlösung gelegt. Dies erfolgt unter Schütteln entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht.

Zur Detektion der Proteine wird zunächst der Primärantikörper in angegebener Verdünnung und Dauer auf die Membran gegeben. Vor der Sekundärantikörperinkubation wird die Membran dreimal 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Membran wird dann für 1 Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper geschüttelt. Nach erneutem Waschen wird der Blot durch die Zugabe von ECL-Lösung gemäß Angaben des Herstellers entwickelt.

5.2.20 Strippen der Western Blot Membran

- *Re-Blot Plus Strong*, 10x von Chemicon (1:10 in H₂O verdünnen)
- Waschpuffer (siehe Kapitel 5.2.19)

Pro Membran wird etwa 5 ml der 1:10 verdünnten Stripping-Lösung darauf gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal 5 Minuten gewaschen, bevor erneutes Blocken und Antikörperinkubation erfolgen kann.

5.2.21 Immunfluoreszenzfärbung

- 4% Paraformaldehyd (PFA)
- 0,1% Triton-X-100 in PBS
- PBS (2 g KCl; 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl; 14,35 g Na₂HPO₄*2 H₂O; H₂O ad 1 l)
- Antikörper-Lösung (vgl. Tabelle 5.4 und 5.5)
- Hoechst-Farbstoff (0,5 mg ad 10 ml PBS)

Die zu färbenden Zellen werden in gewünschter Verdünnung in Mikroskopierschälchen (2 ml pro Schale) ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dabei sollte man vorsichtig vorgehen, um ein Ablösen zu verhindern. Dann wird zur Fixierung der Zellen etwa 100 µl 4%iges PFA in die Mitte jedes Schälchens gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgt die Permeabilisierung mit 0,1%igem Triton-X 100 in PBS für 10 Minuten. Es wird mit PBS gewaschen und die Primärantikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Die Antikörper werden dabei entweder in 10% FCS oder 10% BSA in PBS verdünnt. Vor der Sekundärantikörperinkubation (1 h RT) wird wieder mit PBS gewaschen. Um die DNA in den Zellen darzustellen erfolgt die Hoechstfärbung für 10 Minuten bei RT. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (siehe 5.2.22).

5.2.22 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich Proteine in lebenden oder fixierten Zellen sehr gut bildlich darstellen. Es erfolgt dabei entweder die Detektion nativer Proteine mittels spezifischer Antikörper, die an ein Fluorochrom gebunden sind oder es wird durch das Einführen eines Vektors ein verändertes Protein in den Zellen produziert, das mit einem fluoreszierenden Protein wie GFP (grün fluoreszierendes Protein; engl. *green fluorescent protein*) fusioniert ist. GFP ist ein natürlich in der Quallenart *Aequorea victoria* vorkommendes Protein und wurde erstmals 1961 von Osamu Shimomura beschrieben. Das Protein besteht aus 238 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 26,9 kDa, wobei das eigentliche Fluorophor des GFP sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ innerhalb der Polypeptidkette bildet. So wird GFP durch blaues Licht zur grünen Fluoreszenz (500 nm) angeregt. Inzwischen gibt es diverse modifizierte Versionen des ursprünglichen GFP, die andere Fluoreszenzspektren aufweisen.

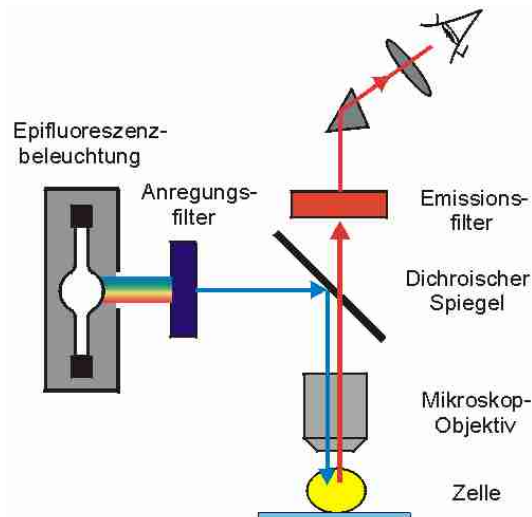


Abbildung 5.2: Funktionsschema eines Fluoreszenzmikroskops

Das Funktionsprinzip der Fluoreszenzmikroskops (Abb. 5.2) beruht auf der Tatsache, dass die in der Zelle befindlichen Fluorochrome durch das Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden können. Die so angeregten Fluorochrome emittieren daraufhin Licht, das energieärmer und somit langwelliger als das anregende Licht ist. Als Lichtquelle dient im Falle des hier verwendeten Fluoreszenzmikroskops AxioVert 200M (Zeiss) eine Kaltlichtlampe, die Licht des gesamten sichtbaren Spektralbereiches emittieren. Die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge wird durch einen Anregungsfilter herausgefiltert und das einfarbige Licht auf das Objekt geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren beginnt. Das zu beobachtende Objekt wird dabei nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet (*Epifluoreszenzmikroskop*). Der emittierte Lichtstrahl wird im Objektiv gesammelt und im Strahlengang vom anregenden Lichtstrahl durch einen Farbteiler getrennt. Anschließend wird das Licht ins Okular, eine Fotokamera oder eine elektronischen Verstärker (Photomultiplier) geleitet.

Somit kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden, ob ein bestimmtes Protein nukleär, zytoplasmatisch oder an einer Membran lokalisiert. Außerdem kann anhand gleicher Lokalisation verschiedener Proteine mögliche Interaktionen gezeigt werden.

5.2.23 Kultivierung von Säugerzelllinien

Tabelle 5.18: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Medium	Beschreibung	Zusatz	Verwendung	Hersteller
DMEM	Glukose 4500mg/l, Na-Pyruvate, ohne L- Glutamine	10% FCS 1% Pen/Strep 1% Glutamin	Zellpassage und Erhaltungskultur	Gibco (Karlsruhe) #21969
DMEM- 800	Selektionsmedium für stabile Zellen	10% FCS 1% Pen/Strep 1% Glutamin G418 (Geneticin)	Zellpassage und Erhaltungskultur	Gibco (Karlsruhe)

OptiMEM	Serum-reduziert, L-Glutamin, 2400mg/l Na-Bicarbonate, HEPES, Sodium Pyruvate	-	Transfektion	Gibco (Karlsruhe) #31985
RPMI 1640	Glukose 2000mg/l, ohne L-Glutamine	20% FCS (Sigma) 1% Pen/Strep 1% Glutamin	Zellpassage und Erhaltungskultur	Gibco (Karlsruhe) #21870-084

Alle Zelllinien wurden entsprechend den Angaben der ATCC kultiviert und passagiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen durch kurze Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgt in Flüssigstickstoff in FCS, dem 10% DMSO zugesetzt wird.

5.2.24 Zellzählung

- Casy[®] ton von Innovatis

Die Zellzahl wird nun mit dem Casy 1 (Schärfe System) elektronisch bestimmt. Die Methode beruht auf dem unterschiedlichen elektrischen Widerstand jeder Zelle (elektronische Pulsflächenanalyse). Das Gerät gibt außerdem das Durchschnittsvolumen und den Durchschnittsdurchmesser der Zellen an.

Zellen werden wie üblich mit PBS gewaschen, durch Trypsinieren abgelöst und eine definierte Menge der Zellsuspension in 10ml Casyton[®]-Lösung gegeben. Die Messung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

5.2.25 Transfektion

Unter Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle verstanden, wobei in dieser Arbeit die unten beschriebenen Methoden verwendet wurden.

5.2.25.1 Transfektion mittels kationischer Polymere (PEI)

- Polyethylenimin, 10 mM von Sigma-Aldrich (München)
- PBS, 1x, steril von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

Für die Transfektion im 96 Well-Platten Format wurden zunächst pro Vertiefung 12,3 µl PBS mit 2,7 µl PEI bzw. 1 µg DNA mit 15 µl PBS in getrennten Ansätzen versetzt und sorgfältig durch Vortexen gemischt. Das DNA-Gemisch wird auf PBS-PEI gegeben und erneut gut gevortext. Diese Mischung wird vorsichtig auf die Zellen gegeben.

5.2.25.2 Lipofektion

- Lipofectamin™ 2000 von Invitrogen (Karlsruhe)
 - OptiMEM von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
- bzw.
- JetPrime von Polyplus Transfection

Bei dieser Methode wird die DNA durch die Bildung von Komplexen mit Liposomen in die Zelle eingebracht. Es wird dabei Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) verwendet, wobei es sich um eine durch kationische Lipide vermittelte Transfektion handelt. Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 50-70% transfiziert. Pro Ansatz werden 125 µl OptiMEM mit 5 µl Lipofectamin durch Vortexen gemischt und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Mischung aus 2 µg der einzubringenden Plasmid-DNA und 125 µl OptiMEM tropfenweise hinzugegeben und erneut 20 Minuten inkubiert. Von den Zellen wird das Medium abgesaugt, durch 2 ml OptiMEM ersetzt und die DNA-Lipidmischung hinzugegeben. Die Transfektion erfolgt etwa 6 Stunden oder über Nacht im Brutschrank. OptiMEM wird durch serumhaltiges Medium ersetzt.

Bei Verwendung von JetPrime erfolgt die Zugabe der Puffer-DNA-Mischung direkt ins Medium. Pro Ansatz werden 200 µl JetPrime-Puffer und 2 µg DNA gemischt, gevortext und 4 µl JetPrime-Reagenz hinzugegeben. Nach erneutem Vortexen wird die Mischung 10 Minuten inkubiert und auf die Zellen gegeben.

5.2.26 Inhibitor-Behandlung

- Trichostatin A (TSA) von Sigma Aldrich (Taufkirchen), 5mM Stammlösung
- Leptomycin B (LMB) von Axxora (Lörrach) 10µM Stammlösung in DMSO

Um Deacetylierung von Proteinen zu verhindern, wurden die Zellen 24h mit einer Endkonzentration von 100nM TSA behandelt.

Um den aktiven nukleären Export zu inhibieren, wurden Zellen mit Leptomycin B in einer finalen Konzentration von 10nM für 4h behandelt.

5.2.27 Massenspektrometrie

Um eine gesicherte Aussage über Acetylierungsstellen machen zu können, wurde sich der Methode der Massenspektrometrie bedient. Zellen werden hierzu mit zu analysierenden Proteinen in GFP-Fusion transfiziert und je nachdem was analysiert werden sollte mit HATs kotransfiziert. 48h später erfolgt eine IP (siehe Kapitel 5.2.15), gefolgt von einer SDS-Page und einer koloidale Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 5.2.18). Banden wurden ausgeschnitten und für die MALDI-TOF-Analyse (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* gekoppelt mit *Time of Flight*) in 100 µl Wasser verschickt. Die eigentliche Analyse und Auswertung wurde durch Prof. Gührs, Universität Jena durchgeführt.

Bei MALDI ionisiert man den Analyten mittels Laserbeschuss (meist UV bei 337 nm, es finden aber auch zunehmend IR-Anregungen Verwendung) über eine Matrix, in welche die eigentlichen Analyten eingebettet sind. Dazu wird der zu untersuchende Analyt und die Matrix auf einem metallischen Träger

ko-kristallisiert. Durch Laserbeschuss verdampft die Matrix explosionsartig und die zu untersuchenden Analyt-Moleküle werden mitgerissen. Dabei findet üblicherweise gleichzeitig eine Ionisierung des Analyten statt. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Typische Beschleunigungsspannungen hierfür liegen bei 10-30 kV. Wegen der gepulsten Ionen-Erzeugung bietet sich für die Massenanalyse ein TOF-Analysator an.

Hierbei gilt für die Flugzeit (*Time Of Flight*) in Abhängigkeit von Masse (m) und Ladungszahl (z) folgender Zusammenhang:

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Ein Ionendetektor wandelt die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal um. Der Vorteil dieser Messmethode ist die schnelle Analyse eines vergleichsweise großen Massenbereichs. Bemerkenswert ist, dass der TOF-Analysator keine prinzipielle Massenbegrenzung zu großen Massen hin besitzt, so dass schon Ionen von m/z bis zu 1.000.000 gemessen wurden. Als ionisierte Spezies treten vor allem die Pseudo-Molekülionen $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oder auch $[M+K]^+$ auf. Das Auftreten (bzw. die relativen Intensitäten) der unterschiedlichen Spezies hängt jedoch stark von der Vorgeschichte der Probe sowie von der Substanzklasse an sich ab.

6. Referenzen

- Allen, R. R., L. Qi, et al. (2005). "Upstream stimulatory factor regulates E box-dependent PAI-1 transcription in human epidermal keratinocytes." *J Cell Physiol* **203**(1): 156-65.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, et al. (1964). "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-94.
- Allis, C. D., L. G. Chicoine, et al. (1985). "Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 8048-52.
- Ames, B. N., L. S. Gold, et al. (1995). "The causes and prevention of cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5258-65.
- Armstrong, S. A., J. E. Staunton, et al. (2002). "MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia." *Nat Genet* **30**(1): 41-7.
- Ayton, P. M. and M. L. Cleary (2001). "Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins." *Oncogene* **20**(40): 5695-707.
- Barrett, A. J. (2001). "Proteases." *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**: Unit 21 1.
- Barrett, A. J. (2004). "Bioinformatics of proteases in the MEROPS database." *Curr Opin Drug Discov Devel* **7**(3): 334-41.
- Belanger, K. D., D. Walter, et al. (2009). "Nuclear localisation is crucial for the proapoptotic activity of the HtrA-like serine protease Nma111p." *J Cell Sci* **122**(Pt 21): 3931-41.
- Bier, C. (2010). "Molekularbiologische Charakterisierung der Funktion und Regulation der Protease Taspase1." *Dissertation*.
- Bier, C., R. Hecht, et al. (2012a). "Overexpression of the catalytically impaired Taspase1 T234V or Taspase1 D233A variants does not have a dominant negative effect in T(4;11) leukemia cells." *PLoS One* **7**(5): e34142.
- Bier, C., S. K. Knauer, et al. (2011a). "The importin-alpha/nucleophosmin switch controls taspase1 protease function." *Traffic* **12**(6): 703-14.
- Bier, C., S. K. Knauer, et al. (2011b). "Cell-based Analysis of Structure-Function Activity of Threonine Aspartase 1." *J Biol Chem* **286**(4): 3007-17.
- Bier, C., S. K. Knauer, et al. (2012b). "Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization in vivo." *Faseb J* **26**(8): 3421-9.
- Birk, Y. (1985). "The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans." *Int J Pept Protein Res* **25**(2): 113-31.
- Blink, E. J., Z. Jiansheng, et al. (2005). "Interaction of the nuclear localizing cytolytic granule serine protease granzyme B with importin alpha or beta: modulation by the serpin inhibitor PI-9." *J Cell Biochem* **95**(3): 598-610.
- Borgono, C. A. and E. P. Diamandis (2004). "The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(11): 876-90.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brunmeir, R., S. Lager, et al. (2009). "Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation." *Int J Dev Biol* **53**(2-3): 275-89.
- Calomme, C., T. L. Nguyen, et al. (2002). "Upstream stimulatory factors binding to an E box motif in the R region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates viral gene expression." *J Biol Chem* **277**(11): 8775-89.
- Cao, Y., Z. D. Fu, et al. (2005). "Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants." *J Asian Nat Prod Res* **7**(3): 205-13.
- Capotosti, F., J. J. Hsieh, et al. (2007). "Species selectivity of mixed-lineage leukemia/trithorax and HCF proteolytic maturation pathways." *Mol Cell Biol* **27**(20): 7063-72.
- Chen, D. Y., H. Liu, et al. (2010). "Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis." *Cancer Res* **70**(13): 5358-67.
- Choudhary, C., C. Kumar, et al. (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." *Science* **325**(5942): 834-40.
- Clausen, T., M. Kaiser, et al. (2011). "HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(3): 152-62.
- Cokol, M., R. Nair, et al. (2000). "Finding nuclear localization signals." *EMBO Rep* **1**(5): 411-5.
- Corre, S. and M. D. Galibert (2005). "Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors." *Pigment Cell Res* **18**(5): 337-48.
- Coussens, L. M., B. Fingleton, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations." *Science* **295**(5564): 2387-92.

- Curran, M. P. and K. McKeage (2009). "Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma." *Drugs* **69**(7): 859-88.
- Deng, Z., C. J. Chen, et al. (2003). "The CBP bromodomain and nucleosome targeting are required for Zta-directed nucleosome acetylation and transcription activation." *Mol Cell Biol* **23**(8): 2633-44.
- Denu, J. M. (2005). "The Sir 2 family of protein deacetylases." *Curr Opin Chem Biol* **9**(5): 431-40.
- Docter, D., U. Distler, et al. (2014). "Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles." *Nat Protoc* **9**(9): 2030-44.
- Dong, Y., B. A. Van Tine, et al. (2014). "Taspase1 cleaves MLL1 to activate cyclin E for HER2/neu breast tumorigenesis." *Cell Res* **24**(11): 1354-66.
- Doucet, A. and C. M. Overall (2008). "Protease proteomics: revealing protease in vivo functions using systems biology approaches." *Mol Aspects Med* **29**(5): 339-58.
- Drag, M. and G. S. Salvesen (2010). "Emerging principles in protease-based drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* **9**(9): 690-701.
- Eckner, R., M. E. Ewen, et al. (1994). "Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor." *Genes Dev* **8**(8): 869-84.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-74.
- Ernst, P., J. Wang, et al. (2001). "MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein." *Mol Cell Biol* **21**(7): 2249-58.
- Fair, K., M. Anderson, et al. (2001). "Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells." *Mol Cell Biol* **21**(10): 3589-97.
- Fisher, A. (1946). "Mechanism of the proteolytic activity of malignant cells." *Nature* **157**(442).
- Frehlick, L. J., J. M. Eirin-Lopez, et al. (2007). "New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones." *Bioessays* **29**(1): 49-59.
- Glozak, M. A., N. Sengupta, et al. (2005). "Acetylation and deacetylation of non-histone proteins." *Gene* **363**: 15-23.
- Gregoretti, I. V., Y. M. Lee, et al. (2004). "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis." *J Mol Biol* **338**(1): 17-31.
- Gu, W. and R. G. Roeder (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." *Cell* **90**(4): 595-606.
- Habtemichael, N., D. Wünsch, et al. (2010). "Cloning and functional characterization of the guinea pig apoptosis inhibitor protein Survivin." *Gene* **469**(1-2): 9-17.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Hanson, R. D., J. L. Hess, et al. (1999). "Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14372-7.
- Hatcher, H., R. Planalp, et al. (2008). "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials." *Cell Mol Life Sci* **65**(11): 1631-52.
- Heckman, K. L. and L. R. Pease (2007). "Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension." *Nat Protoc* **2**(4): 924-32.
- Hoiby, T., D. J. Mitsiou, et al. (2004). "Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA." *Embo J* **23**(15): 3083-91.
- Hoiby, T., H. Zhou, et al. (2007). "A facelift for the general transcription factor TFIIA." *Biochim Biophys Acta* **1769**(7-8): 429-36.
- Hong, S., A. Derfoul, et al. (2009). "A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes." *Faseb J* **23**(10): 3539-52.
- Hsieh, J. J., E. H. Cheng, et al. (2003a). "Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression." *Cell* **115**(3): 293-303.
- Hsieh, J. J., P. Ernst, et al. (2003b). "Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization." *Mol Cell Biol* **23**(1): 186-94.
- Inoue, A. and D. Fujimoto (1969). "Enzymatic deacetylation of histone." *Biochem Biophys Res Commun* **36**(1): 146-50.
- Ismail, P. M., T. Lu, et al. (1999). "Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines." *Oncogene* **18**(40): 5582-91.
- Ito, A., Y. Kawaguchi, et al. (2002). "MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation." *Embo J* **21**(22): 6236-45.

- Kennedy, A. R. (1998). "The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent." *Am J Clin Nutr* **68**(6 Suppl): 1406S-1412S.
- Khan, J. A., B. M. Dunn, et al. (2005). "Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL." *Structure* **13**(10): 1443-52.
- Kim, T. Y., Y. J. Bang, et al. (2006). "Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy." *Epigenetics* **1**(1): 14-23.
- Kimura, A., K. Matsubara, et al. (2005). "A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes." *J Biochem* **138**(6): 647-62.
- Knauer, S. K., V. Fetz, et al. (2011). "Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors." *PLoS One* **6**(5): e18253.
- Knauer, S. K. and R. H. Stauber (2005). "Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells." *Anal Chem* **77**(15): 4815-20.
- Koehn, F. E. and G. T. Carter (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* **4**(3): 206-20.
- Koppen, M., F. Bonn, et al. (2009). "Autocatalytic processing of m-AAA protease subunits in mitochondria." *Mol Biol Cell* **20**(19): 4216-24.
- Kouzarides, T. (2000). "Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?" *Embo J* **19**(6): 1176-9.
- Krivtsov, A. V. and S. A. Armstrong (2007). "MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development." *Nat Rev Cancer* **7**(11): 823-33.
- Lagger, G., D. O'Carroll, et al. (2002). "Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression." *Embo J* **21**(11): 2672-81.
- Lah, T. T., M. B. Duran Alonso, et al. (2006). "Antiprotease therapy in cancer: hot or not?" *Expert Opin Biol Ther* **6**(3): 257-79.
- Lai, Z. W., E. C. Nice, et al. "Glycocapture-based proteomics for secretome analysis." *Proteomics* **13**(3-4): 512-25.
- Lange, A., R. E. Mills, et al. (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." *J Biol Chem* **282**(8): 5101-5.
- Li, S., L. M. Iakoucheva, et al. (2010). "Loss of post-translational modification sites in disease." *Pac Symp Biocomput*: 337-47.
- Liedtke, M. (2009). MLL. *Transcription factor encyclopedia*.
- Liu, H., E. H. Cheng, et al. (2009). "MLL fusions: pathways to leukemia." *Cancer Biol Ther* **8**(13): 1204-11.
- Lopez-Otin, C. and L. M. Matrisian (2007). "Emerging roles of proteases in tumour suppression." *Nat Rev Cancer* **7**(10): 800-8.
- Lopez-Otin, C. and C. M. Overall (2002). "Protease degradomics: a new challenge for proteomics." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(7): 509-19.
- Luo, J., M. Li, et al. (2004). "Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2259-64.
- Luo, J., N. L. Solimini, et al. (2009). "Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction." *Cell* **136**(5): 823-37.
- Luo, J., F. Su, et al. (2000). "Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis." *Nature* **408**(6810): 377-81.
- Luo, X. and M. Sawadogo (1996a). "Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1308-13.
- Luo, X. and M. Sawadogo (1996b). "Functional domains of the transcription factor USF2: atypical nuclear localization signals and context-dependent transcriptional activation domains." *Mol Cell Biol* **16**(4): 1367-75.
- Mann, M. and O. N. Jensen (2003). "Proteomic analysis of post-translational modifications." *Nat Biotechnol* **21**(3): 255-61.
- Marchant, D. J., C. L. Bellac, et al. (2014). "A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity." *Nat Med* **20**(5): 493-502.
- Martinez-Balbas, M. A., U. M. Bauer, et al. (2000). "Regulation of E2F1 activity by acetylation." *Embo J* **19**(4): 662-71.
- Mason, S. D. and J. A. Joyce (2011). "Proteolytic networks in cancer." *Trends Cell Biol* **21**(4): 228-37.
- Menon, L. G., R. Kuttan, et al. (1999). "Anti-metastatic activity of curcumin and catechin." *Cancer Lett* **141**(1-2): 159-65.
- Milne, T. A., S. D. Briggs, et al. (2002). "MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters." *Mol Cell* **10**(5): 1107-17.

- Mohamed, M. M. and B. F. Sloane (2006). "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(10): 764-75.
- Montgomery, R. L., C. A. Davis, et al. (2007). "Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility." *Genes Dev* **21**(14): 1790-802.
- Nakamura, T., T. Mori, et al. (2002). "ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation." *Mol Cell* **10**(5): 1119-28.
- Nguyen, K. T., M. P. Holloway, et al. (2012). "The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease." *Int J Biochem Mol Biol* **3**(2): 137-51.
- Overall, C. M. and C. Lopez-Otin (2002). "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era." *Nat Rev Cancer* **2**(9): 657-72.
- Oyama, T., S. Sasagawa, et al. (2013). "Cleavage of TFIIA by Taspase1 activates TRF2-specified mammalian male germ cell programs." *Dev Cell* **27**(2): 188-200.
- Paik, W. K., D. C. Paik, et al. (2007). "Historical review: the field of protein methylation." *Trends Biochem Sci* **32**(3): 146-52.
- Park, J. and C. N. Contreas (2010). "Anti-carcinogenic properties of curcumin on colorectal cancer." *World J Gastrointest Oncol* **2**(4): 169-76.
- Patel, D., S. Shukla, et al. (2007). "Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review)." *Int J Oncol* **30**(1): 233-45.
- Pless, B., C. Oehm, et al. (2011). "The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC--are potential target structures in t(4;11) leukemia." *Leukemia* **25**(4): 663-70.
- Polo, S., S. Sigismund, et al. (2002). "A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins." *Nature* **416**(6879): 451-5.
- Poole, A. R., K. J. Tiltman, et al. (1978). "Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas." *Nature* **273**(5663): 545-7.
- Pozo-Guisado, E., J. M. Merino, et al. (2005). "Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB." *Int J Cancer* **115**(1): 74-84.
- Prabakaran, S., G. Lippens, et al. (2012). "Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**(6): 565-83.
- Pratheeshkumar, P., C. Sreekala, et al. (2012). "Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets." *Anticancer Agents Med Chem* **12**(10): 1159-84.
- Qyang, Y., X. Luo, et al. (1999). "Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1508-17.
- Ravindran, J., S. Prasad, et al. (2009). "Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?" *Aaps J* **11**(3): 495-510.
- Rosorius, O., P. Heger, et al. (1999). "Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells." *Biotechniques* **27**(2): 350-5.
- Schwartz, D. C. and M. Hochstrasser (2003). "A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers." *Trends Biochem Sci* **28**(6): 321-8.
- Seeler, J. S. and A. Dejean (2003). "Nuclear and unclear functions of SUMO." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(9): 690-9.
- Segre, C. V. and S. Chiocca (2011). "Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 690848.
- Seo, J. and K. J. Lee (2004). "Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches." *J Biochem Mol Biol* **37**(1): 35-44.
- Sims, A. H., N. S. Dunn-Coleman, et al. (2004). "Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi." *FEMS Microbiol Lett* **239**(1): 95-101.
- Singh, A. K., P. Seth, et al. (2002). "Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells." *Arch Biochem Biophys* **401**(1): 29-37.
- Souza Lda, C., R. Camargo, et al. (2014). "Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells." *PLoS One* **9**(1): e86600.
- Spange, S., T. Wagner, et al. (2009). "Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(1): 185-98.
- Stauber, R. H., C. Bier, et al. (2012). "Targeting Taspase1 for cancer therapy--letter." *Cancer Res* **72**(11): 2912; author reply 2913.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463-516.
- Su, C. C., G. W. Chen, et al. (2006). "Curcumin inhibits cell migration of human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of nuclear factor kappa B /p65 and down-regulates

- cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expressions." *Anticancer Res* **26**(2A): 1281-8.
- Sun, C. Y., Y. Hu, et al. (2006). "Resveratrol as a novel agent for treatment of multiple myeloma with matrix metalloproteinase inhibitory activity." *Acta Pharmacol Sin* **27**(11): 1447-52.
- Takeda, S., D. Y. Chen, et al. (2006). "Proteolysis of MLL family proteins is essential for *taspase1*-orchestrated cell cycle progression." *Genes Dev* **20**(17): 2397-409.
- Takeda, S., S. Sasagawa, et al. (2015). "*Taspase1*-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting *Cdkn2a* locus transcription." *J Clin Invest*.
- Thomas, L. W., C. Lam, et al. (2010). "*Mcl-1*; the molecular regulation of protein function." *FEBS Lett* **584**(14): 2981-9.
- Thomas, M. C. and C. M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**(3): 105-78.
- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 785-99.
- Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 530-41.
- Ugalde, A. P., G. R. Ordonez, et al. (2010). "Metalloproteases and the degradome." *Methods Mol Biol* **622**: 3-29.
- Unruhe, B., E. Schröder, et al. (2015). "An old flame never dies - Survivin in cancer and cellular senescence." *Gerontology*: in press.
- Wan, X. S., T. C. Hamilton, et al. (1998). "Growth inhibition and cytotoxicity induced by Bowman-Birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells." *Nutr Cancer* **31**(1): 8-17.
- Weideman, C. A., R. C. Netter, et al. (1997). "Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA." *J Mol Biol* **271**(1): 61-75.
- Weinstein, I. B. and A. Joe (2008). "Oncogene addiction." *Cancer Res* **68**(9): 3077-80; discussion 3080.
- Wünsch, D., V. Fetz, et al. (2012). "Chemico-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of threonine aspartase-1." *Blood Cancer Journal* doi:10.1038/bcj.2012.22.
- Wünsch, D., A. Hahlbrock, et al. (2015a). "Fly versus man: Evolutionary impairment of nucleolar targeting affects the degradome of *Drosophila*'s *Taspase1*." *Faseb J*.
- Wünsch, D., A. Hahlbrock, et al. (2015b). "Evolutionary divergence of Threonine Aspartase1 leads to species-specific substrate recognition." *Biological Chemistry*: in press.
- Xia, Z. B., M. Anderson, et al. (2003). "MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8342-7.
- Yanagawa, S., J. S. Lee, et al. (1998). "Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that respond to wingless signaling." *J Biol Chem* **273**(48): 32353-9.
- Yang, X. J. (2004). "Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling." *Bioessays* **26**(10): 1076-87.
- Yang, X. J. and E. Seto (2008). "The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 206-18.
- Yun, C., Y. Wang, et al. (2008). "Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases." *J Cell Biol* **183**(4): 589-95.
- Zeleznik-Le, N. J., A. M. Harden, et al. (1994). "11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10610-4.
- Zhou, H., S. Spicuglia, et al. (2006). "Uncleaved TFIIA is a substrate for *taspase 1* and active in transcription." *Mol Cell Biol* **26**(7): 2728-35.
- zur Hausen, H. (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." *Virology* **384**(2): 260-5.

1 7. Anhang

2 7.1 Abkürzungsverzeichnis

3	%	Prozent
4	% v/v	Volumenprozent
5	% w/v	Gewichtsprozent
6	°C	Grad Celsius
7	μ	mikro
8	ABL	Abelson Kinase
9	AcK	acetylierte Lysine
10	AF	<i>ALL1 fused gene on chromosome</i>
11	ALL	Akute Lymphatische Leukämie
12	AML	Akute Myeloische Leukämie
13	amp	Ampicillin
14	ARF	<i>alternative reading frame protein</i>
15	ATCC	<i>American type culture collection</i>
16	ATP	Adenosin-Triphosphat
17	BFP	blau fluoreszierendes Protein
18	bidest.	doppelt destilliert
19	bp	Basenpaare
20	BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
21	bzgl.	bezüglich
22	bzw.	beziehungsweise
23	ca.	circa
24	Cas9	<i>CRISPR associated 9</i>
25	CBP	Creb bindendes Protein
26	Cdk	<i>Cyclin dependent Kinase</i>
27	cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
28	CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
29	CMV	Cytomegali Virus
30	Co-IP	Co-Immunpräzipitation
31	CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
32	Crm1	<i>Chromosomal Region Maintenance1</i>
33	CS	<i>Cleavage Site</i>
34	CTD	C-terminale Domäne
35	Cy3	Carbocyanin 3
36	d	desoxy
37	DMSO	Dimethylsulfoxid
38	DNA	Desoxyribonukleinsäure
39	ds	Doppelstrang
40	dTasp1/ dTaspase1	<i>Drosophila Taspase1</i>
41	DTT	Dithiothreitol
42	ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
43	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
44	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

1	E2F	2ter eukaryotischer Transkriptionsfaktor
2	ENL	<i>Eleven-nineteen leukemia</i>
3	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
4	g	Erdbeschleunigung
5	g	Gramm
6	GapDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
7	GCN5	<i>General control of amino acid synthesis5</i>
8	GFP	grün fluoreszierendes Protein
9	ggf.	gegebenenfalls
10	GNAT	<i>Gcn5-related N-Acetyltransferase</i>
11	GO	<i>Gene Ontology</i>
12	gRNA	<i>guide</i> RNA
13	GST	Glutathion-S-Transferase
14	GTP	Guanosin-Triphosphat
15	h	Stunde
16	HA	Hemagglutinin
17	HAT	Histon Acetyltransferase
18	HCF	<i>Host Cell Factor1</i>
19	HDAC	Histon Deacetylase
20	HMG	<i>High Mobility Group</i>
21	HOX	Homeobox
22	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
23	HSF1	<i>Heat shock factor protein 1</i>
24	i	inhibiert
25	IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration, bei der 50% inhibiert ist
26	Ig	Immunglobulin
27	IP	Immunpräzipitation
28	IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
29	kb	Kilobasenpaare
30	kDa	Kilodalton
31	kg	Kilogramm
32	K _M	Maß für die Affinität des <i>Enzyms</i> zum Substrat
33	λ	Wellenlänge
34	l	Liter
35	LMB	LeptomycinB
36	m	milli
37	M	molar
38	MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
39	mCherry	monomeres rot fluoreszierendes Cherry-Protein
40	MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence1</i>
41	MDM2	<i>Mouse Double Minute2</i>
42	min	Minute
43	MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
44	MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
45	mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>

1	MS	Massenspektrometrie
2	MS275	Entinostat, Klasse I HDAC Inhibitor
3	mut	mutiert
4	MW	Molekulargewicht
5	Myo	Myosin
6	m/z	Masse pro Ladung
7	n	nano
8	NES	nukleäres Export-Signal
9	NFκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
10	NLS	nukleäres Lokalisationssignal
11	NoLS	nukleäres/ nukleoläres Lokalisationssignal
12	NLP	<i>Nukleoplasmin-like protein</i>
13	NP-40	Nonidet-P40
14	NTD	N-terminale Domäne
15	NTP	Nukleotid-Triphosphat
16	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
17	ORF	Open reading frame
18	p	Wahrscheinlichkeit
19	p300	E1A bindendes Protein p300
20	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
21	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
22	pCAF	p300/CBP assoziierter Faktor
23	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
24	PEI	Polyethylenimin
25	PFA	Para-Formaldehyd
26	PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
27	PNK	Phospho Nukleotid-Kinase
28	Pol	Polymerase
29	PTM	post-translationale Modifikation
30	Puro	Puromycin
31	qPCR	quantitative PCR
32	Rb	Retinoblastom
33	red.	reduziert
34	RNA	Ribonukleinsäure
35	rpm	<i>rounds per minute</i>
36	RT	Raumtemperatur
37	s	Sekunde
38	SDS	Sodiumdodecylsulfat
39	SIRT	Sirtuin
40	SOE	<i>Splice Overlap Extension</i>
41	SRY	<i>Sex-determining Region on Y</i>
42	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
43	SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
44	SV40	Simian Virus 40
45	TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer

1	Tasp/Taspase1	Threonine Aspartase1
2	TaspTV	Tasp mit Mutation des Threonin 234 nach Valin
3	TBP	TATA-Box bindendes Protein
4	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
5	TE	Tris-EDTA
6	TEMED	N,N'-tetramethyl-ethylene-diamine
7	TFIIA	Transkriptionsfaktor 2A
8	TIP60	60kDa Tat-interaktives Protein
9	TOF	<i>Time of Flight</i>
10	Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
11	Trx	Trithorax
12	TSA	Trichostatin A
13	U	<i>Unit</i>
14	USF2	<i>Upstream stimulatory Factor2</i>
15	UV	ultraviolettes Licht
16	V	Volt
17	V5	Simian Virus5
18	wt	<i>Wildtyp</i>

19

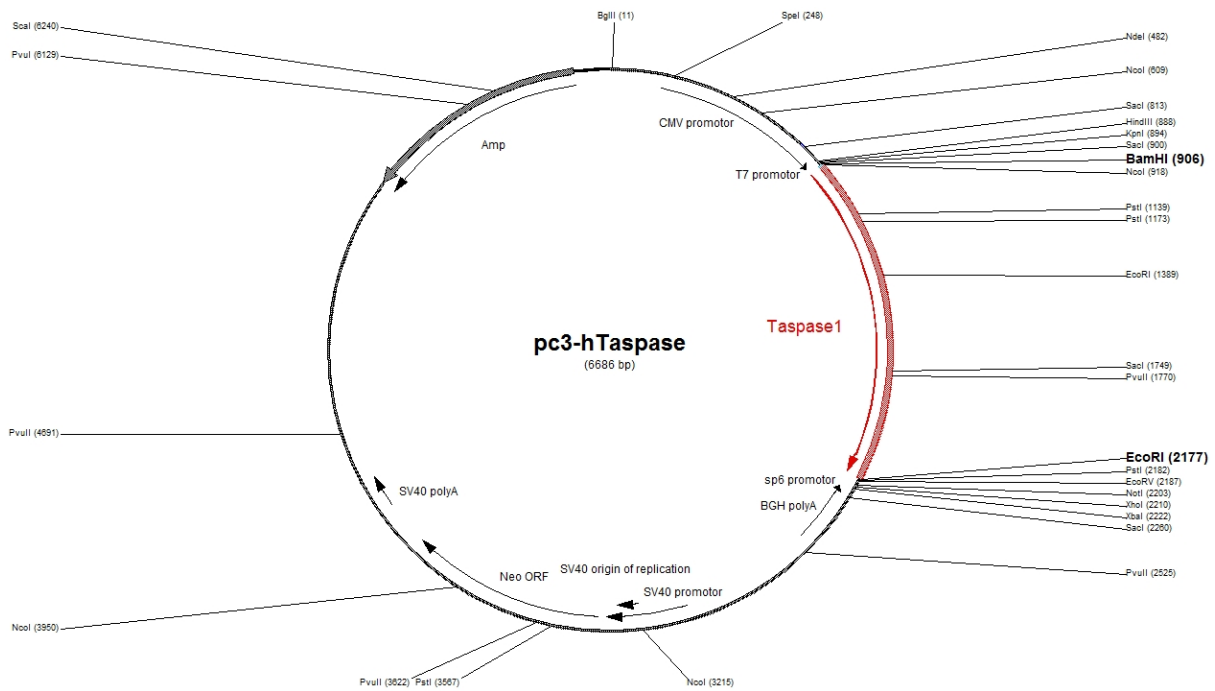
20 **Symbole für Aminosäuren**

21

22	A	Ala	Alanin
23	C	Cys	Cystein
24	D	Asp	Asparaginsäure
25	E	Glu	Glutaminsäure
26	F	Phe	Phenylalanin
27	G	Gly	Glycin
28	H	His	Histidin
29	I	Ile	Isoleucin
30	K	Lys	Lysin
31	L	Leu	Leucin
32	M	Met	Methionin
33	N	Asn	Asparagin
34	P	Pro	Prolin
35	Q	Gln	Glutamin
36	R	Arg	Arginin
37	S	Ser	Serin
38	T	Thr	Threonin
39	V	Val	Valin
40	W	Trp	Tryptophan
41	Y	Tyr	Tyrosin

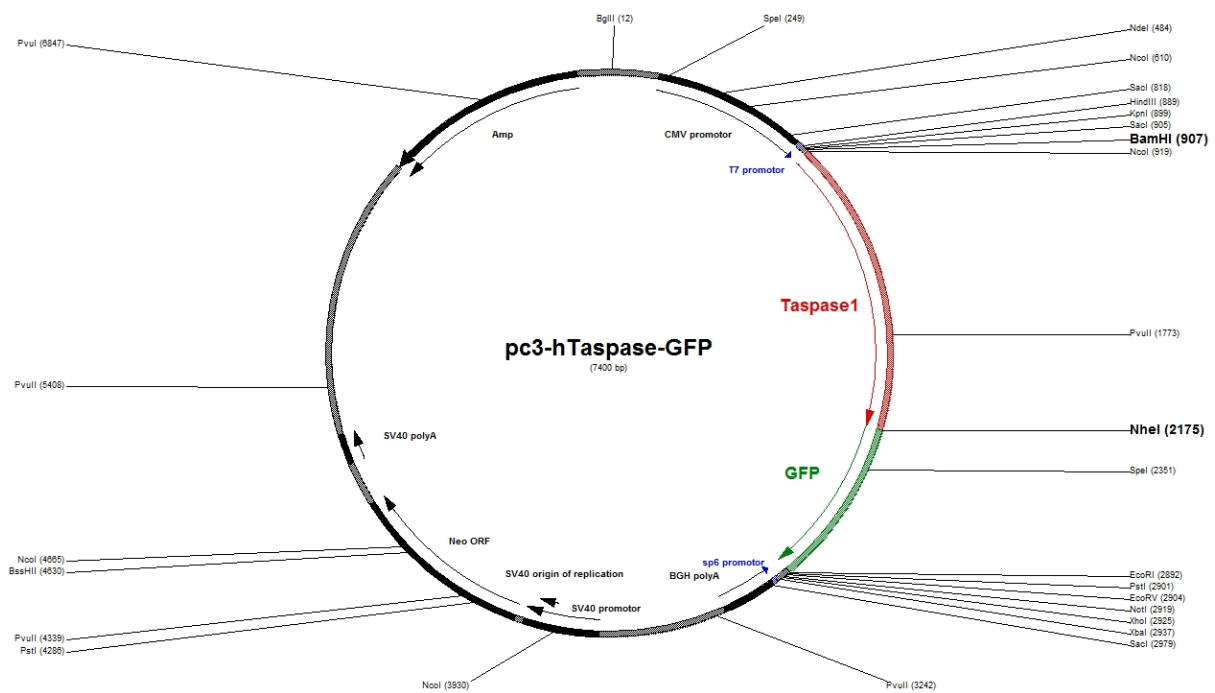
1 **7.2 Plasmid-Karten**

2
3



4
5
6
7
8

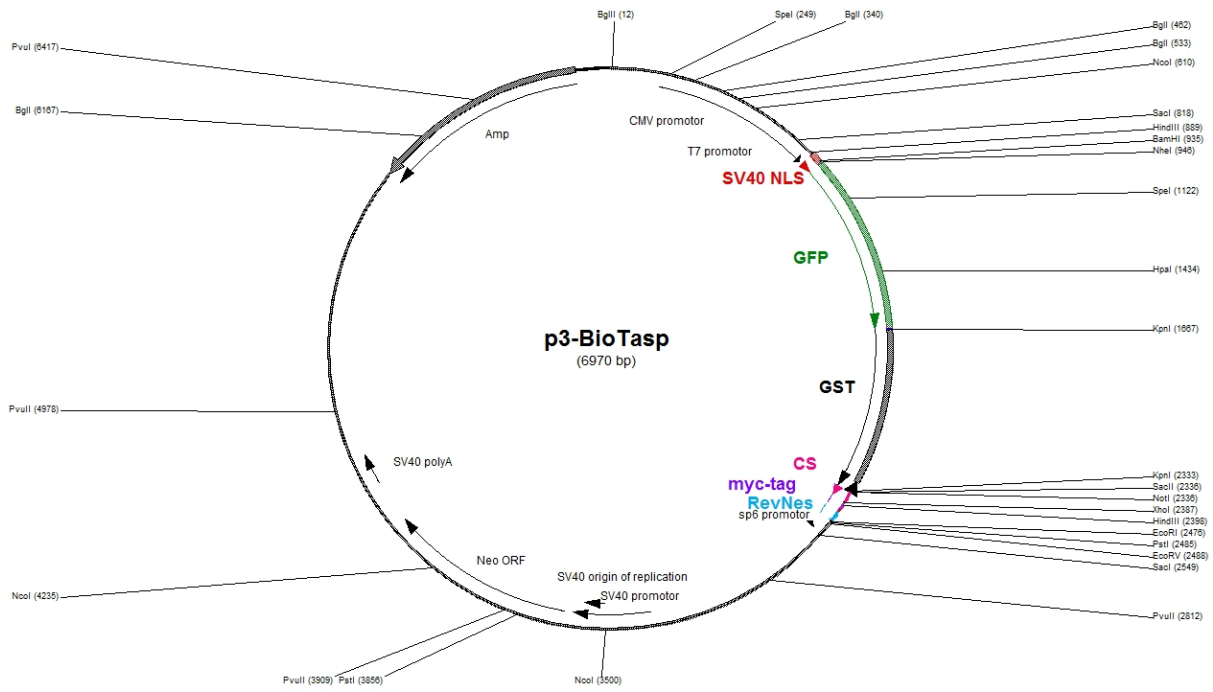
Abbildung 7.1: Schematische Darstellung eines pc3-Plasmids.



9
10
11
12
13

Abbildung 7.2: Schematische Darstellung eines pc3-GFP-Plasmids.

1



2

3

4

Abbildung 7.3: Schematische Darstellung eines pc3-Biosensor-Plasmids.

5

1 **7.3 Eidesstattliche Erklärung**

2 Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter
3 Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen
4 Promotionsversuch unternommen.

5

6 Mainz, den 17. März 2015

7