

Abstract

The threonine protease Taspase1 is of high interest as new target for cancer therapeutics, due to its implication in leukemias and solid tumors. Although Taspase is not an oncogene itself, it is crucially required for the proteolytic activation of the MLL oncogene as well as MLL fusion proteins generated by chromosomal translocations. Hence, MLL-dependent cells can successfully be targeted by inhibition of Taspase activity. However, Taspase is insensitive to inhibition by general serine, cysteine or metalloprotease inhibitors. Furthermore, the limited number of available Taspase inhibitors display either low inhibitory potential or broad bioactivity. Thus, novel Taspase inhibitors are still urgently required.

In a first step, detailed characterization revealed for the first time that recombinant Taspase and protein overexpressed in eukaryotic cells are comparable with respect to their catalytic parameters.

Moreover, the specific catalytic activity (0.03 U/mg) was determined, as well as a 20-fold higher efficiency regarding cleavage of the CS2 cleavage site of MLL over CS1. Regarding stability, Taspase rapidly loses its catalytic activity (half-life < 3 h), unless it is stabilized by high concentrations of NaCl (≥ 450 mM). Additionally, the autocatalytic processing event required for catalytic competence was found to occur on a time scale of 2-3 days. The flexible loop region between glycine 178 and aspartate 233 generated by this activation event is not resolved in the crystal structure. Hence, NMR and CD spectroscopy were applied and the results suggest a helix-turn-helix structure. Furthermore, analytical gel filtration pinpointed that Taspase is active as a hetero-tetramer in solution. With these data, a fluorogenic *in vitro* assay was optimized for initial inhibitor tests.

While the controversially discussed bisarsonic inhibitor NSC48300 and compounds derived from virtual docking exhibited no inhibitory effect, both silica nanoparticles and succinimide peptides were discovered as novel Taspase inhibitors. In fact, silica nanoparticles are known to bind proteins, albeit nanoparticle-mediated inhibition of enzyme activity is scarcely described. Surprisingly, IC_{50} values in the nanomolar and picomolar range indicate high affinity binding, which was observed *in vitro* and in cells. In addition, comparison of nanoparticles with different diameters (8-125 nm) suggests a positive correlation of size and affinity. Subsequent analyses characterized the inhibition type as noncompetitive and pinpointed that Taspase does not change its structure upon binding. Importantly, inhibition by nanoparticles is no general feature, as three other enzymes (lactate dehydrogenase, chymotrypsin, and proteinase K) showed no or only weak inhibition by silica nanoparticles.

Another approach for Taspase inhibition exploited the cleavage sequence and the proposed mechanism to design substrate analog peptides with a succinimide moiety at the cleavage site. The most promising compound exhibited a K_i value of 400 ± 88 nM and displays thus a tenfold better inhibitory potential than the best reported Taspase inhibitor. Moreover, the competitive inhibition type and the resistance against Taspase cleavage were verified. However, degradation by other proteases and/or limited cellular uptake as well as competition with chloride ions prevents the *in vivo* inhibition of Taspase.

Altogether, these findings demonstrate the potential of silica nanoparticles as well as succinimide peptides as Taspase inhibitors and tools for subsequent studies.

Zusammenfassung

Die Threonin-Protease Taspase1 stellt aufgrund ihrer Beteiligung an Leukämien und soliden Tumoren einen wichtigen neuen Ansatzpunkt für Krebsmedikamente dar. Obwohl Taspase selbst kein Onkogen ist, ist sie unabdingbar für die proteolytische Aktivierung des Onkogens MLL und der durch Translokationen entstandenen MLL-Fusionsproteine. Deshalb reagieren MLL-abhängige Zellen besonders sensitiv auf Taspase-Inhibition. Allerdings sind sämtliche allgemeinen Serin-, Cystein- und Metalloprotease-Inhibitoren unwirksam gegen Taspase, und auch die wenigen verfügbaren Taspase-Inhibitoren besitzen entweder nur geringes Inhibitorpotential oder ein breites Wirkspektrum. Daher sind neue Taspase-Inhibitoren nach wie vor von hoher Relevanz.

Ein Vergleich rekombinanter Taspase mit in eukaryotischen Zellen überexprimiertem Protein zeigte eine vergleichbare spezifische katalytische Aktivität (0.03 U/mg). Weiterhin konnte eine 20-fach höhere Effizienz hinsichtlich der Spaltung der CS2-Schnittstelle von MLL gegenüber der CS1-Schnittstelle festgestellt werden. Bei Betrachtung der Proteinstabilität fiel auf, dass Taspase sehr schnell an Aktivität verliert (Halbwertszeit < 3 h), sofern das Protein nicht durch hohe Salzkonzentrationen (≥ 450 mM NaCl) stabilisiert wird. Zudem wurde für die autokatalytische Prozessierung des Proenzym, welche wichtig zur Erlangung katalytischer Kompetenz ist, eine Zeitspanne von 2-3 Tagen ermittelt. Der dabei entstehende flexible Bereich zwischen Glycin 178 und Aspartat 233 ist in der Kristallstruktur ungeordnet, konnte aber dank NMR- und CD-Spektroskopie als potentiell Helix-Turn-Helix-Motiv identifiziert werden. Des Weiteren belegten analytische Gelfiltrationen die Aktivität von Taspase als Hetero-Tetramer. Mithilfe dieser Informationen wurde ein *in vitro* Assay optimiert und für Inhibitortests verwendet.

Während der kontrovers diskutierte Inhibitor NSC48300 und die mittels virtuellen Dockings ermittelten Substanzen keine Inhibition zeigten, konnten Silikatnanopartikel und Succinimid-Peptide als neue Taspase-Inhibitoren identifiziert werden. Obwohl Proteinbindung an Nanopartikel bekannt ist, ist eine durch diese vermittelte Enzyminhibition kaum beschrieben. Umso überraschender sind die IC_{50} -Werte im nano- und picomolaren Bereich, die sowohl *in vitro* als auch in Zellen beobachtet wurden. Weiterhin konnte mit verschiedenen Nanopartikelgrößen eine positive Korrelation von Durchmesser und Affinität belegt werden. Weitere Analysen ergaben eine nichtkompetitive Inhibition und keine Strukturänderung bei Bindung. Bemerkenswerterweise stellt Enzyminhibition keine generelle Eigenschaft von Nanopartikeln dar, da drei Kontrollenzyme (Lactatdehydrogenase, Chymotrypsin und Proteinase K) kaum durch Nanopartikel inhibiert wurden.

In einem anderen Ansatz wurde die Taspase-Schnittsequenz und der vermutete Mechanismus für das Design peptidischer Substratanaloga mit Succinimid-Motiv an der Schnittstelle genutzt. Die beste Verbindung zeigte einen K_i -Wert von 400 ± 88 nM und ist damit ein zehnfach besserer Hemmstoff als der beste zuvor beschriebene Taspase-Inhibitor. Des Weiteren konnte die kompetitive Hemmung und die Stabilität gegenüber Abbau durch Taspase gezeigt werden. Allerdings verhindern schlechte Zellaufnahme und/oder Abbau durch andere Proteasen sowie Konkurrenz mit Chlorid-Ionen eine Inhibition *in vivo*.

Insgesamt belegen diese Ergebnisse das Potential von Silikatnanopartikel sowie Succinimid-Peptiden als Taspase-Inhibitoren und Werkzeuge für nachfolgende Studien.