

Untersuchung des signalvermittelten Kerntransportes von DFF (DNA- Fragmentierungsfaktor) durch Importin α 3/Importin β

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Wibke Müller
geboren am 20.07.1978 in Solingen

Giessen, 2008

Für Dich, Felix!

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie (FB08) der Justus-Liebig-Universität Giessen in der Zeit von Februar 2005 bis April 2008 unter Leitung von Prof. Dr. A. Pingoud angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner
Institut für Organische Chemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Erstgutachter: PD. Dr. Gregor Meiss
Institut für Biochemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Tina Trenczek
Institut für allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Stephanstrasse 24, 35392 Giessen

Tag der Promotion: 09.06.2008

I. Publikationen

1. Müller, W., Scholz, S.R., Linke, C., Gimadutdinow, O. & Meiss, G.
Molecular analysis of the NLS-mediated binding of DFF subunits to importin α 3:
implications for nuclear uptake of the DFF-complex, in preparation

II. Teilnahme an Fachkonferenzen

1. Asia Link-meeting; Orange County Resort (India):

Human Resources Development in Study of Nucleic Acids

13.-20. September 2006

Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster und Vortrag
“DNA-Fragmentation Factor (DFF) on its way to the nucleus: nuclear localisation sequences and importin binding”

2. 58. Mosbacher Kolloquium:

Protein and Lipid Sorting in Health and Disease

29.-31. März 2007

Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster
“Investigation of the nuclear localisation sequences (NLSs) of the two subunits of DFF suggests a transport of the complex into the nucleus by importin molecules”

3. Herbsttagung der GBM (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie), Hamburg:

Molecular Life Science

16.-19. September 2007

Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster
“NLS-dependent nuclear transport of DFF (DNA-Fragmentation Factor) by importin α 3”

III. Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. Alfred M. Pingoud dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion an seinem Institut durchzuführen. Ich danke für das Vertrauen, dass er in mich gesetzt hat, für seine motivierende Begeisterung für die Wissenschaft und ganz besonders für eine unvergessliche Reise zum Asia-Link Kongress nach Indien!

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Gregor Meiss natürlich für die Übernahme des Referates, darüber hinaus noch für vieles mehr: Hilfe, wenn man Hilfe braucht und dafür dass er sein unglaubliches Wissen so toll vermitteln kann. Ich habe viel von Dir gelernt, Danke dafür.

Frau Prof. Dr. Tina Trenczek danke ich für die Übernahme des Ko-Referates.

Steffi, es hat Spaß gemacht, mit Dir zu arbeiten und zu lachen. Danke für viel gute Laune, bei der Arbeit und auch darüber hinaus, und dafür, dass immer ein Schlafplatz bei Dir für mich reserviert war und hoffentlich auch zukünftig ist. Ich werde Dich vermissen! Und ein dickes Danke für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit.

Paddy, Herr Kollege, auch mit Dir gab es immer was zu lachen. Ich habe immer gerne mit Dir einen Raum geteilt. Außerdem danke für DIE Formel aller Formeln!

Marika, immer hilfsbereit, immer gut drauf! Ich finde, Du bist eine echte Bereicherung für unsere Arbeitsgruppe.

Caro, danke für die vielen gemeinsamen Mittagspausen mit den „Wanderungen“ zum Otto-Eger-Heim und vielen guten Gespräche. Und natürlich danke für die vielen gemeinsam gerannten Kilometer durch den Bergwerkswald, Du hast mich immer gut motiviert, durchzuhalten.

Meinen Praktikanten Bene, Daniel, Chrissi und Steffi T.: Ihr wart alle eine große Hilfe und habt meine Arbeit wirklich weitergebracht. Bene, Daniel und Chrissi, danke für die schöne Zeit während Eurer Diplomarbeit bei uns im Labor.

Heike, danke für schöne Kaffe-und-Kuchen Nachmittage bei Dir zu Hause mit Deinen süßen Kindern!

Den Ehemaligen und „Besuchern“: Martina, Inn, Oleg, Iwona, Ute, Christian, Basti. Ich freue mich, Euch kennengelernt zu haben!

Dem Rest der Biochemie danke ich für die nette Atmosphäre, lustige Weihnachtsfeiern und Betriebsausflüge. Ein besonderer Dank geht an Ina, mit der ich immer besonders viel Spaß beim Notduschen testen hatte. Hoffentlich findet sich ein großer Nachfolger!

Dem Institut für Genetik danke ich für die Bereitstellung der Zellkultur und die Belieferung mit Zellen.

Silke Schreiner, Dir auch ein großes Danke für viele Schalen „HeLa-G“ und „HeLa-M“.

Peter und Ulrike Fuchs: Danke für die Formatierhilfe!

Meine Eltern und meinem Bruder und meiner Schwester: Danke, dass Ihr meine Familie seid!

Felix, danke dass du mich auf Händen durchs Leben trägst, das macht so Vieles leichter. Ich freue mich jeden Tag ein bisschen mehr, dass Du mich gefunden hast!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Apoptose.....	1
1.1.1	Signalwege der Apoptose.....	2
1.1.2	Apoptotische DNA-Fragmentierung.....	4
1.2	DFF: Der DNA-Fragmentierungsfaktor.....	5
1.2.1	DFF40: Die apoptotische Nuklease.....	7
1.2.2	DFF45: Inhibitor und Chaperon für DFF40.....	8
1.3	Kompartimentierung und Transport von Makromolekülen.....	9
1.3.1	Signalvermittelter Kerntransport.....	10
1.3.1.1	Kernlokalisations-signale.....	12
1.3.1.2	Importine: lösliche Transportrezeptoren.....	14
1.3.1.2.1	Importin β	14
1.3.1.2.2	Importin α	15
1.4	NLS-abhängiger Kerntransport von DFF.....	17
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
2	Materialien und Methoden.....	19
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Chemikalien und Biochemikalien.....	20
2.1.3	Kitts.....	21
2.1.4	Enzyme und Marker.....	21
2.1.5	Antikörper.....	22
2.2	Mikrobiologische Arbeiten.....	23
2.2.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E.coli</i>	23
2.2.2	<i>E.coli</i> Stämme.....	24
2.2.3	DNA-Transformation von <i>E.coli</i>	25
2.2.3.1	Bereitung elektrokompetenter <i>E.coli</i>	25
2.2.3.2	Bereitung TSS-kompetenter <i>E.coli</i>	25
2.2.3.3	Transformation elektrokompetenter <i>E.coli</i>	26
2.2.3.4	Transformation TSS-kompetenter <i>E.coli</i>	26
2.3	Molekularbiologische Arbeiten.....	27
2.3.1	Elektrophorese und Western <i>blot</i>	27
2.3.1.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.3.1.2	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.3.1.3	Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.3.1.4	Western <i>blot</i>	28
2.3.2	Plasmid-DNA-Isolation.....	29
2.3.3	DNA Konzentrationsbestimmung.....	30
2.3.4	Bearbeitung von DNA.....	30
2.3.4.1	Restriktionsspaltungen von DNA.....	30
2.3.4.2	Ligation von Restriktionsfragmenten.....	31
2.3.5	PCR.....	31
2.3.5.1	Oligonukleotide.....	31
2.3.5.2	PCR Standardbedingungen.....	32
2.3.5.3	<i>in-vitro</i> -Mutagenese mittels inverser PCR.....	32
2.3.6	Plasmid-Vektoren Konstruktionen.....	34
2.3.6.1	Plasmide für Expression in eukaryontischen Zelllinien.....	34
2.3.6.2	Plasmide für Expression in <i>E.coli</i>	35
2.4	Expression von Genen und Reinigung von Proteinen in <i>E.coli</i>	36
2.4.1	Reinigung von His-FLAG-DFF45wt/- Δ NLS.....	36
2.4.2	Reinigung von DFF.....	37
2.4.3	Reinigung von His-Importin β	37
2.4.4	Reinigung von GST-Importin α Varianten.....	38

2.5	Expression und Reinigung von Proteinen in eukaryontischen Zellen	38
2.5.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien.....	38
2.5.2	Verwendung eukaryontischer Zelllinien	39
2.5.3	DNA-Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	39
2.5.4	Herstellung von Proteinen in eukaryontischen Zellen	40
2.5.4.1	Herstellung von Proteinen in Hela-Zellen.....	40
2.5.4.2	Herstellung von Proteinen in HEK293-Zellen	40
2.6	Charakterisierung von Proteinen	40
2.6.1	Mikroskopische Untersuchungen von Proteinen.....	40
2.6.1.1	Zellkern-Färbung transfizierter Zellen.....	41
2.6.2	Ko-Immunopräzipitationsexperimente	41
2.6.3	GST- <i>pulldown</i> -Experimente	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung der Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten von DFF.....	43
3.1.1	Charakterisierung der Kernlokalisationssequenz der Nuklease CAD	43
3.1.1.1	Auswahl und Klonierung der Kernlokalisationssequenzmutanten von CAD	43
3.1.1.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der EGFP-CAD-Varianten in HeLa-Zellen.....	45
3.1.1.3	Bedeutung der Cluster basischer Aminosäurereste im C-Terminus von CAD im Vergleich mit DFF40.....	47
3.1.2	Charakterisierung der Kernlokalisationssequenz des Inhibitors ICAD-L/DFF45	48
3.1.2.1	Auswahl und Klonierung der Kernlokalisationssequenzmutanten von ICAD-L/DFF45	48
3.1.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der <i>DsRedMonomer</i> -DFF45/ ICAD-L-Varianten in HeLa-Zellen.....	50
3.1.2.3	Bedeutung der Cluster basischer Aminosäurereste im C-Terminus von DFF45/ ICAD-L	52
3.2	Charakterisierung des Kerntransportes von DFF durch Importine	53
3.2.1	Auswahl und Klonierung der Importin α -Varianten	53
3.2.2	Bindung von DFF45 an verschiedene Importin α -Varianten.....	54
3.2.2.1	GST- <i>pulldown</i> Experimente mit DFF45 Wildtyp/DFF45 Δ NLS und Importin α 1, α 3 und α 5 produziert in <i>E. coli</i>	54
3.2.2.2	Koimmunopräzipitation von DFF45-Wildtyp/DFF45 Δ NLS und Importin α 1, α 3 und α 5 koproduziert in HEK293-Zellen	56
3.2.3	Kompetitionsassay Importin α 1 und Importin α 3: GST- <i>pulldown</i> -Experiment mit DFF-Komplex und DFF45	57
3.2.4	GST- <i>pulldown</i> -Experimente mit DFF- Δ NLS-Varianten und Importin α 3 Wildtyp	58
3.2.5	Bindung von DFF an die primäre und sekundäre NLS-Bindestelle von Importin α 3.....	61
3.2.5.1	Auswahl der Importin α 3 Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle	61
3.2.5.2	GST- <i>pulldown</i> -Experiment mit DFF40 und Importin α 3 Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle	62
3.2.5.3	GST- <i>pulldown</i> -Experiment mit DFF45 und Importin α 3 Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle	64
3.2.5.4	GST- <i>pulldown</i> -Experiment mit DFF und Importin α 3-Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle	64
3.2.6	Kompetitionsassay DFF45 und DFF-Komplex: GST- <i>pulldown</i> -Experiment mit Importin α 3.....	66
3.2.7	Untersuchung des Kerntransportes von DFF als Tetramer	67
3.2.7.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Kerntransportes von DFF als Tetramer	67
4	Diskussion.....	72

4.1	Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten von DFF	72
4.1.1	Klassifizierung der Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten von DFF..	73
4.1.2	Die Kernlokalisationssequenz von CAD ist einteilig, entspricht aber nicht der klassischen Konsensussequenz	73
4.1.3	Die Kernlokalisationssequenzen von ICAD-L/DFF45 sind klassisch einteilig	75
4.2	Kerntransport von DFF durch Importine: Bindung durch das Adapterprotein Importin α 3 ..	77
4.2.1	DFF45 besetzt die primäre, DFF40 die sekundäre Bindestelle von Importin α 3 ..	80
4.2.2	Die Kernlokalisationssequenzen von DFF40 und DFF45 imitieren bei der Bindung des Komplexes an Importin α 3 ein klassisches zweiteiliges NLS	81
4.2.3	DFF hat gegenüber DFF45 eine höhere Bindungsaffinität zu Importin α 3	84
4.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass DFF als Tetramer DFF40 ₂ /DFF45 ₂ transportiert wird	86
4.3	Kerntransport-Modell von DFF	87
4.4	Aussichten	88
5	Zusammenfassung	89
6	Anhang	91
6.1	Modell Importin α , gebunden mit NLS-Petiden von DFF40 und DFF45	91
6.2	Abkürzungsverzeichnis	91
6.3	Pufferverzeichnis	93
6.4	Literaturverzeichnis	96

1 Einleitung

1.1 Apoptose

Apoptose wird definiert als programmierter Zelltod. Den ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines programmierten Selbstmordprozesses von Zellen, der sich vom unkontrollierten Zelltod, der Nekrose (griechisch: Tod, Absterben), unterscheidet, erhielt der australische Doktorand J.F.R. Kerr im Jahr 1962 anhand von mikroskopischen Zelluntersuchungen. Er nannte diese neuartige Form des Zelltodes „*shrinking necrosis*“. Später führte Kerr, der inzwischen als Pathologe an der Universität von Queensland arbeitete, zusammen mit seinen Mitarbeitern Wyllie und Currie den Begriff Apoptose ein¹. Der Name Apoptose begründet sich auf das griechische Wort αποπτωσις (apo: weg, los; ptosis: Senkung), welches das Abfallen von Blütenblättern oder des Laubes im Herbst beschreibt.

Das genetisch gesteuerte, kontrollierte Sterben von Zellen ist für die Entwicklung vielzelliger Organismen unabdingbar. Im Laufe der Embryogenese werden überflüssige Zellen gebildet, die im Zuge der Entwicklung wieder entfernt werden müssen, wie zum Beispiel überzählige Nervenzellen oder Zellen der Handanlage, die so genannte Schwimnhäute ausbilden².

Eine weitere, lebenswichtige Funktion von Apoptose ist die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, d.h. des Gleichgewichts zwischen alten und neu gebildeten Zellen³. Neben Zellen, die ebenso lang existieren wie der Organismus, wie zum Beispiel Skelettmuskelzellen oder Nervenzellen, werden viele andere Zellen häufiger erneuert. Besonders kurzlebig sind z.B. manche weißen Blutkörperchen mit einer Überlebensdauer von wenigen Minuten. Des Weiteren werden beschädigte, infizierte oder mutierte Zellen durch Apoptose entfernt, um eine Schädigung des Gesamtorganismus durch diese Zellen zu verhindern.

Das Sterben der Zelle durch Apoptose ist geprägt durch morphologische Charakteristika. Als Folge der Spaltung der Aktinfilamente des Cytoskeletts beginnt die Zelle zu schrumpfen, die Membran bildet Bläschen, die letztendlich als sogenannte „*apoptotic bodies*“ abgeschnürt werden (siehe Abb. 1-1), das Chromatin im Zellkern kondensiert, die DNA wird von apoptotischen Nukleasen internukleosomal gespalten. Auf diese Weise entstehen ca. 200 bp große DNA-Fragmente. Ebenfalls kommt es zu Veränderungen in der Plasmamembran, wie z.B. der Translokation von Phosphatidylserin aus der Zelle auf die Zelloberfläche. Dies stellt ein Signal zur Phagozytose für Makrophagen dar⁴. Durch die schnelle Resorption durch Makrophagen und benachbarte Zellen werden die Überreste der apoptotischen Zelle aus dem umliegenden Gewebe entfernt, so dass Entzündungsreaktionen verhindert werden⁵.

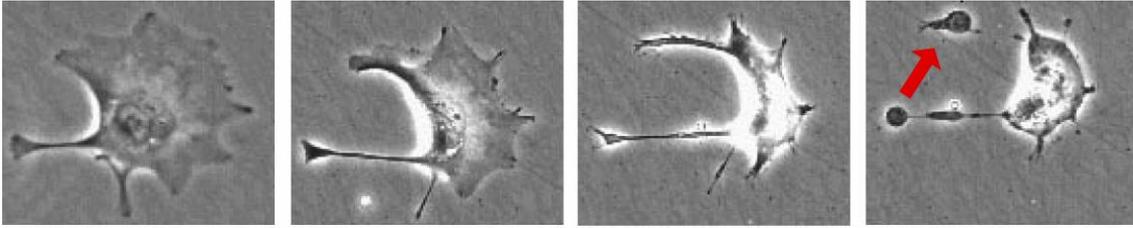


Abb. 1-1: Zeitraffer Photographie einer apoptotischen Zelle: Gezeigt sind verschiedene morphologische Stadien einer apoptotischen Zelle. Man erkennt deutlich das fortschreitende Schrumpfen der Zelle. Der Zellkern nimmt eine hufeisenartige Form an, was für apoptotische Nuklei als typisch beschrieben wird. Im letzten Stadium kommt es zur Abschnürung von apoptotischen Körperchen (Markierung mit rotem Pfeil), die von Makrophagen oder benachbarten Zellen aufgenommen werden können. (Guy Whitley, *Reproductive & Cardiovascular Disease Research Group, St. George's Hospital Medical School, London, U.K.*)

Im Vergleich zur Apoptose ist der Zelltod durch Nekrose ein unkontrollierter Prozess. Er ist geprägt durch Platzen der Zelle und der Verteilung der Zellfragmente im Gewebe. Dies hat erhebliche Entzündungsreaktionen, ausgelöst durch die Immunantwort, zur Folge⁶. Nekrose entsteht durch äußere Einflüsse, wie Verbrennungen, Vergiftungen und mechanische Verletzungen. Ein Beispiel dafür ist Sonnenbrand.

Seit der Entdeckung der Apoptose wird dieses Gebiet intensiv erforscht, nicht zuletzt wegen der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten bei Störungen der Apoptose. So spielt übermäßige Apoptose eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson⁷. Unzureichende Apoptose kann durch Verlängerung der Lebenszeit der Zelle, Zellakkumulation und unkontrollierte Proliferation zu Krebs führen⁸. Kennzeichnend für Krebszellen ist beispielsweise eine übermäßige Expression anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2 oder Bcl-X_L, wodurch dem Auslösen des Zelltod-Programms entgegengewirkt werden kann. In der Krebstherapie wird häufig an dieser Stelle angegriffen, indem, durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren für anti-apoptotische Faktoren sowie *down*-Regulation der Expression anti-apoptotischer Faktoren, die Zelle zur Apoptose gebracht werden soll⁹.

1.1.1 Signalwege der Apoptose

Apoptose ist ein signalvermittelter Prozess. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Wege zur Induktion der Apoptose. Auf dem intrinsischen Weg wird Apoptose hauptsächlich durch innere Signale unter Mitwirkung der Mitochondrien ausgelöst; der extrinsische Weg leitet Apoptose durch äußere Signale ein, die durch Bindung an Rezeptoren ins Zellinnere weitergeleitet werden. Sowohl intrinsischer als auch extrinsischer Weg führen zur Aktivierung von Initiator-Caspasen, die wiederum in der Lage sind Effektor-Caspasen zu aktivieren¹⁰. Caspasen sind Cystein-enthaltende Aspartat-spezifische Proteasen, die als inaktive Zymogene exprimiert werden. Die Aktivierung der Initiator-Caspasen erfolgt durch Dimerisierung, während Effektor-Caspasen durch proteolytische Spaltung der Zymogene

aktiviert werden¹¹. Die Regulation auf posttranslationaler Ebene ermöglicht eine schnelle Verfügbarkeit und Aktivierung der Caspasen.

Eine bedeutende Rolle für den intrinsischen Weg der Apoptose spielen Mitglieder der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2 family*) Proteinfamilie, zu denen sowohl pro- als auch anti-apoptotische Faktoren zählen¹². Durch intrinsische Signale wie intrazelluläre Schädigungen, z.B. Schädigungen der DNA, verlagert sich das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie zugunsten der Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren. Anti-apoptotische Faktoren wie Bcl-2 und Bcl-X_L werden durch Bindung an pro-apoptotische Proteine wie PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) inhibiert¹³. Es kommt zur Ausbildung von Poren (*mitochondrial permeability transition pore*) in der äußeren Mitochondrien-Membran durch Oligomerisierung der pro-apoptotischen Faktoren Bax (*Bcl2-associated X protein*)/Bak und dadurch zur Freilassung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Cytoplasma der Zelle. Die Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 (*apoptosis proteases activating factor-1*) im Cytoplasma bewirkt die Oligomerisierung von Apaf-1 zu einem rad-förmigem Oligomer, dem sogenannten Apoptosom¹⁴. Am Apoptosom kommt es zur Dimerisierung und somit zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9, welche als aktives Enzym die Effektor-Caspase-3 aktiviert.

Ebenfalls zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 führt der extrinsische Weg der Apoptose. Dabei spielen Rezeptoren in der Zellmembran eine Rolle (Fas-; TNF (*tumor necrosis factor*)-; TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Rezeptor), die durch Ligandenbindung an die außerhalb der Zelle liegende Domäne des Rezeptors aktiviert werden. An der innerhalb der Zelle liegenden Rezeptordomäne kommt es daraufhin durch Assoziation verschiedener Faktoren zur Bildung des DISC (*death inducing signalling complex*). Dieser Komplex rekrutiert Caspase-8, ebenfalls eine Initiator-Caspase, die durch Dimerisierung Aktivität erlangt und Caspase-3 durch proteolytische Spaltung aktiviert¹⁵. Ein weiteres Substrat der aktiven Caspase-8 ist der pro-apoptotische Faktor Bid (*BH3 interacting domain death agonist*), der durch Spaltung aktiviert wird (tBid = *truncated Bid*) und daraufhin die Bildung der mitochondrialen Poren durch Bax/Bak auslöst. Auf diese Weise kommt es zur Verknüpfung von intrinsischem und extrinsischem Weg der Apoptose¹⁶.

Intrinischer und extrinsischer Weg laufen an der Effektor-Caspase-3 zusammen. Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 *knockout*-Mäuse Störungen in sowohl durch extrinsische als auch durch intrinsische Stimuli ausgelöster Apoptose aufweisen^{17,18}. Die proteolytische Spaltung der Procaspase-3 bewirkt einen irreversiblen Ablauf des zellulären Selbstmordprogramms.

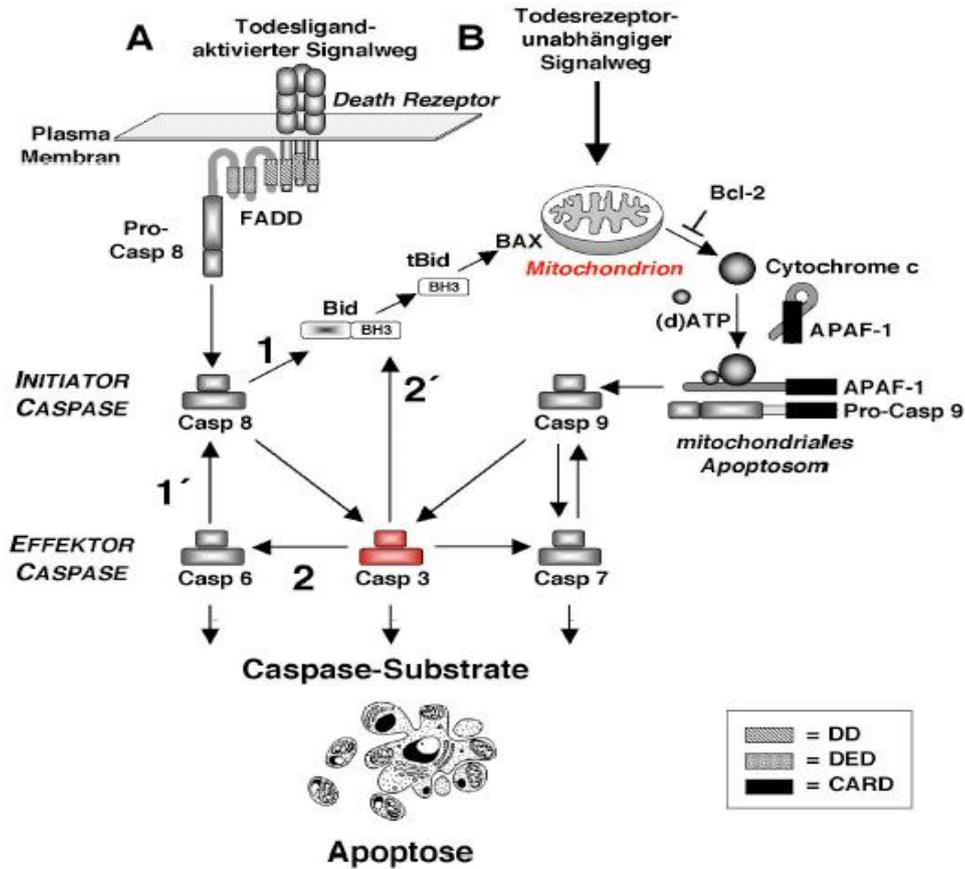


Abb. 1-2: Extrinsischer (A) und intrinsischer (B) Signalweg der Apoptose: Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch Bindung von Liganden an membranintegrierte *death receptors* vermittelt. Durch Bildung des DISC im Inneren der Zelle wird Procaspase-8 rekrutiert und aktiviert und kann die Effektor-Caspase-3 aktivieren. Durch den intrinsischen Apoptoseweg entstehen Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, durch die Cytochrom c ins Cytoplasma entlassen wird. Durch Interaktion von Cytochrom c, APAF-1 und Procaspase-9 entsteht das Apoptosom, welches die Aktivierung von Caspase-9 vermittelt. Caspase-3 ist ein Substrat von Caspase-9, so dass an diesem Punkt beide Signalwege vereint werden.

Eine Verbindung von extrinsischem und intrinsischem Signalweg entsteht durch die Spaltung von Bid und der von tBid vermittelten Aktivierung von Bax, welches die *mitochondrial permeability transition pores* bildet. (Dr. med. Peter Daniel : *Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren*)

1.1.2 Apoptotische DNA-Fragmentierung

Ein im späten Stadium der Apoptose auftretendes Merkmal ist die DNA-Fragmentierung. Die erste Beobachtung der Entstehung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 200 bp bzw. Vielfachem von 200 bp machte Albert Wyllie in den achtziger Jahren bei Untersuchungen von Dexamethason-ausgelöster Apoptose in Ratten-Thymocyten¹⁹. Die Entstehung dieser sogenannten „DNA-ladder“ ist auf die im Zuge der Apoptose erfolgte Aktivierung von Endonukleasen zurückzuführen, welche die chromosomale DNA internukleosomal spalten. Apoptotische Nukleasen lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Neben den sogenannten zellautonomen (*cell autonomous*) Nukleasen, die einen intrinsischen Teil der Apoptose

darstellen und die DNA der Zelle im Verlauf der Apoptose im Zellkern spalten, existieren Nukleasen zur kompletten Spaltung des Chromatins, die in Lysosomen kompartimentiert sind oder in den extrazellulären Raum entlassen werden²⁰. Die Aufgabe dieser sogenannten „*waste management*“ Nukleasen liegt in der kompletten Beseitigung von Chromatin-Fragmenten sterbender Zellen, die beispielsweise vom Immunsystem getötet wurden, durch Phagozyten. DNase I und DNase II sind die prominentesten Nukleasen dieser Gruppe und sind für die Entwicklung von Säugern essentiell.

Zu den zellautonomen apoptotischen Nukleasen zählt die mitochondriale Endonuklease G (EndoG), die im Zuge der Apoptose durch die mitochondrialen Poren ins Cytoplasma entlassen wird und in den Nukleus gelangt²¹. Des Weiteren sind DNase γ und Mitglieder der Cyclophilin Proteinfamilie zu nennen, im Besonderen Cyclophilin E, dessen Beteiligung an apoptotischer DNA-Degradierung in *C. elegans* und Säugern, in Kooperation mit AIF (*apoptosis inducing factor*), gezeigt werden konnte^{22,23}.

Die wichtigste zellautonome apoptotische Nuklease ist CAD/DFF40 (*caspase activated DNase/DNA-fragmentation factor 40*)²⁴. Eine genaue Beschreibung dieser Nuklease, sowie deren Inhibitor ICAD/DFF45 (*Inhibitor of CAD/DNA-fragmentation factor 45*) wird im nachfolgenden Kapitel vorgenommen.

1.2 DFF: Der DNA-Fragmentierungsfaktor

DFF (DNA-Fragmentierungsfaktor) ist ein Proteinkomplex, bestehend aus der apoptotischen Nuklease CAD (*caspase activated DNase*) und deren Inhibitor ICAD (*Inhibitor of CAD*)²⁵. Diese Bezeichnungen werden für die murinen Untereinheiten des DFF-Komplexes verwendet. Im Folgenden werden die Bezeichnungen DFF40 (DNA-Fragmentierungsfaktor 40) für die nukleolytische Untereinheit und DFF45 (DNA-Fragmentierungsfaktor 45) für die inhibitorische Untereinheit von DFF verwendet, die in der Nomenklatur den Bezeichnungen der humanen Orthologen von DFF entsprechen²⁶. Die Begriffe CAD und ICAD werden nur dann verwendet, wenn spezifische Eigenschaften der Maus-Orthologen gezeigt wurden und es keine Untersuchungen für die entsprechenden humanen Faktoren DFF40 und DFF45 gibt, wie zum Beispiel bei der Beschreibung der Kristall-Struktur von CAD (siehe 1.2.1).

Die Nuklease DFF40 ist für die internukleosomale DNA-Spaltung sowie für die Chromatin-Kondensation im Zuge der Apoptose in vielen Zelltypen verantwortlich²⁷. Auch in nicht-apoptotischen Zellen wird DFF40 latent hergestellt. Aus diesem Grund ergibt sich die Notwendigkeit der Inhibition der nukleolytischen Aktivität von DFF40, um DNA-Fragmentierung in proliferierenden Zellen zu verhindern. Diese Aufgabe wird von der Zelle in perfekter Weise durch die Expression von DFF45 gelöst. Einerseits bewirkt die Bildung des Heterodimers DFF40/DFF45 eine wirksame Inhibition der Nukleaseaktivität, andererseits ist

DFF45 ein spezifisches Chaperon für DFF40. In Abwesenheit von DFF45 wird DFF40 zwar exprimiert, es kommt aber nicht zur korrekten Faltung, so dass die Nuklease keine Aktivität erlangt²⁸. So kann auch bei unbalancierter Expression von DFF40 und DFF45 sichergestellt werden, dass keine DNA-Fragmentierung in gesunden Zellen stattfindet. DFF45 bietet auf diese Weise eine doppelte Sicherheitskontrolle -Faltungshelfer und Inhibitor- zum Schutz der zellulären DNA.

Wird im Zuge der Apoptose Caspase-3 aktiviert, ist diese in der Lage, den Inhibitor DFF45 spezifisch zu spalten, was eine Dissoziation der Fragmente von DFF45 von der Nuklease zur Folge hat. Die freie Nuklease ist daraufhin aktiv und spaltet die chromosomale DNA internukleosomal.

Obwohl der DFF-Komplex ursprünglich aus dem Cytoplasma isoliert wurde, konnte später gezeigt werden, dass DFF in wachsenden Zellen im Nukleus lokalisiert ist (siehe 1.4)

Im Zellkern nicht-apoptotischer Zellen diffundiert DFF frei, ist aber auch in der Lage durch die Nuklease-Untereinheit transient an DNA zu binden, ohne DNA-Fragmentierung auszulösen²⁹. DNA-Fragmentierung wird durch die Präinkubation von DNA und DFF mit anschließender Aktivierung durch Caspase-3 verstärkt, was vermuten lässt, dass eine Aktivierung der Nuklease im DNA-gebundenen Zustand möglich ist.

Die Stöchiometrie von DFF wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ursprünglich wurde angenommen, dass DFF40 und DFF45 einen heterodimeren Komplex aus je einer Untereinheit DFF40 und einer Untereinheit DFF45 bilden. Nach Aktivierung der Nuklease durch Caspase-3-Spaltung wurde Homooligomerisierung von DFF40 beobachtet, wobei als kleinste Einheit ein Tetramer beschrieben worden war³⁰. Später konnte gezeigt werden, dass sowohl endogener als auch heterolog exprimierter DFF in HeLa-Zellen als Heterotetramer mit einer Stöchiometrie von DFF40₂/DFF45₂ vorkommt. Die aktivierte Nuklease beinhaltet zwei bis vier DFF40-Untereinheiten³¹. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass im Zuge der Lösung der Kristallstruktur ein CAD-Homodimer als kleinste, nukleolytisch aktive Einheit präsentiert werden konnte³².

DFF übernimmt ferner eine Rolle als Tumorsuppressor, indem es für die Instandhaltung der Genomstabilität sorgt. Der Verlust von DFF40 führt zum Anstieg spontan induzierter Gen-Mutationen, Gen-Amplifikationen und chromosomaler Instabilität in murinen Primärzellen und humanen Zelllinien³³. Des Weiteren werden DFF40 und DFF45 in vielen Tumortypen aberrant exprimiert, was meist mit einer schlechten Heilungsprognose für den Patienten verbunden ist³⁴.

1.2.1 DFF40: Die apoptotische Nuklease

DFF40 besteht aus 338 Aminosäureresten, CAD, das Ortholog der Maus, besitzt fünf zusätzliche Aminosäurereste am C-Terminus. Man kategorisiert drei unterschiedliche Domänen (C1, C2, C3) in DFF40, die verschiedene Funktionen übernehmen. Die N-terminale Domäne C1 (AS 1-83) weist deutliche Sequenzhomologie mit der N-terminalen Domäne von DFF45 aus Säugern und *Drosophila*, sowie der N-terminalen Domäne von Mitgliedern der proapoptotischen Familie der CIDE-Proteine auf und wird deshalb auch als CIDE-N-Domäne bezeichnet³⁵. 2001 konnten durch NMR-Spektroskopie die Strukturen der N-terminalen CIDE-Domänen von DFF40 und DFF45 aufgeklärt werden³⁶. Die CIDE-Domänen der beiden Untereinheiten des DFF-Komplexes bilden das *binding interface* und sind primär für die kotranslationale Dimerisierung des Komplexes zuständig^{37,38}. Die CIDE-Domäne in DFF40 weist eine konvexe Form auf und beinhaltet basische Reste im *dimer-interface* während die CIDE-Domäne in DFF45 konkav geformt und durch saure Reste geprägt ist.

Die Lösung der Kristallstruktur von CAD, allerdings ohne die N-terminale CIDE-Domäne, die im Kristall unstrukturiert vorlag, erfolgte im Jahr 2004³². Es konnte gezeigt werden, dass ein Dimer aus zwei CAD-Molekülen die nukleolytisch aktive Einheit der Nuklease bildet. Die Homodimerisierung wird hauptsächlich durch die Interaktion der beiden C2-Domänen (AS 84–131) vermittelt. Die Form des Dimers erinnert an eine geöffnete Schere, deren Schneiden von den C3-Domänen (AS 132-328) der beiden CAD-Monomere gebildet werden. In jeder C3-Domäne wird ein Zn^{2+} -Molekül koordiniert, welches für die Stabilität und die Homodimerbildung eine Rolle spielt. Am Grund des von den Schneiden gebildeten Spaltes befindet sich das aktive Zentrum von CAD. Die Größe des Spaltes erlaubt es der Nuklease, zwischen internukleosomaler und nukleosomaler DNA zu unterscheiden. Im aktiven Zentrum ordnen sich die invarianten Aminosäurereste H263, H308, K310 und H313, die an der Katalyse der DNA-Spaltung beteiligt sind³⁹, um einen konservierten Aspartatrest in Position 262 an, welcher für die Koordination eines Mg^{2+} -Ions benötigt wird.

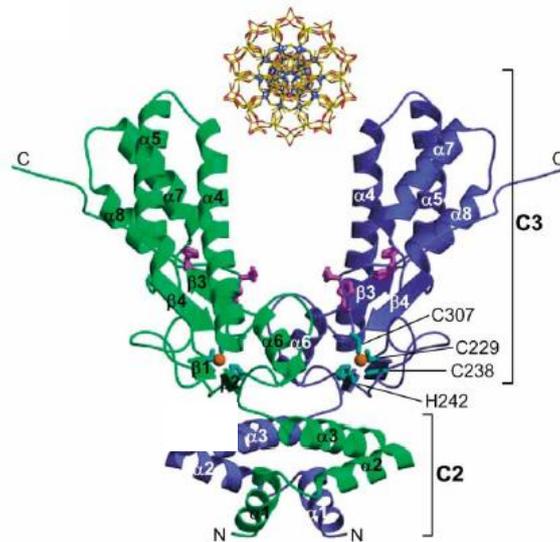


Abb. 1-3: Kristallstruktur der murinen Nuklease CAD: Gezeigt ist das Homodimer, die Monomere sind in grün und blau dargestellt. Die C3-Untereinheiten bilden einen Spalt, an dessen Grund die Aminosäurereste des aktiven Zentrums liegen. In jedem CAD-Monomer wird ein strukturelles Zn^{2+} immobilisiert. Am C-Terminus schließt sich das Kernlokalisierungssignal an, welches in der CAD-Struktur zugänglich für Kerntransport-Moleküle lokalisiert ist.

Die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung wird durch einen allgemeinen Säure-Base-Mechanismus vermittelt. H263 ist befähigt als allgemeine Base das Nukleophil OH^- zu generieren, indem es ein Proton aus einem Molekül H_2O abstrahiert. OH^- attackiert das positiv polarisierte 5'-Phosphat, dabei bildet sich ein instabiles pentakoales Phosphatintermediat⁴⁰, dessen negative Ladung vermutlich durch die positive Ladung des Mg^{2+} neutralisiert wird. Mg^{2+} würde dann die Funktion eines Elektrophils einnehmen. Allerdings ist die tatsächliche Funktion des Metallions spekulativ. Ebenso wäre die Beteiligung des Mg^{2+} an der Koordination der Sauerstoff-Atome des Phosphates denkbar. Mit Sicherheit aber lässt sich sagen, dass Mg^{2+} für die katalytische Aktivität von CAD unentbehrlich ist⁴¹.

Durch die DNA-Spaltung von DFF40 kommt es zur Bildung einer 3'-OH- und einer 5'-Phosphatgruppe. Die Spaltung ist dsDNA-spezifisch und erzeugt keine Überhänge⁴².

1.2.2 DFF45: Inhibitor und Chaperon für DFF40

Bereits im Zuge der Entdeckung des DFF-Komplexes konnte festgestellt werden, dass die inhibitorische Untereinheit des Komplexes in zwei unterschiedlichen Splice-Varianten existiert. Neben der langen Isoform DFF45/ICAD-L, bestehend aus 331 Aminosäureresten, wurde die kürzere Variante DFF35/ICAD-S isoliert. ICAD-S besteht aus 265 Aminosäureresten, das humane Ortholog DFF35 ist um drei Aminosäurereste länger⁴³.

Sowohl DFF45 als auch DFF35 werden durch apoptotisch aktivierte Caspase-3 an zwei Positionen (D117; D244) gespalten, was in einer Dissoziation und somit Aktivierung der Nuklease resultiert.

Über die Stöchiometrie von DFF45 findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. In ersten Gelfiltrationsexperimenten eluierte DFF45 mit einem apparenten Molekulargewicht von 75 kDa, was auf einen DFF45-Homodimer hindeutet²⁵. Widlak *et al.* konnten zeigen, dass DFF45 und DFF35 *in vivo* als Monomer im großen Überschuss über die Nuklease vorliegt³⁰. In einer Studie von Kanouchi *et al.* konnte eine Oligomerisierung des Inhibitors gezeigt werden⁴⁴.

McCarthy *et al.* definierten in DFF45 drei funktionelle Domänen D1, D2 und D3, die den Caspase-3-Spaltfragmenten entsprechen⁴⁵. D1 entspricht der CIDE-N-Domäne und ist, wie bereits erwähnt für die Dimerisierung von DFF40 und DFF45 verantwortlich. D2 bindet an die katalytische Domäne von DFF40 und spielt eine Rolle bei der Inhibition der Nuklease. Der genaue Mechanismus der Inhibition ist allerdings noch unbekannt. Die C-terminale Domäne D3 beherbergt die chaperone Aktivität von DFF45. 2002 konnte die Struktur des C-Terminus von DFF45 durch NMR-Spektroskopie bestimmt werden⁴⁶. Die Struktur weist ein Cluster negativ geladener Aminosäuren an der Oberfläche des C-Terminus auf, welches vermutlich mit den positiven Ladungen der katalytischen Domäne von DFF40 interagiert. Im Zuge des auf diese Weise erreichten Ladungsausgleichs kann DFF45 als Chaperon wirken.

Die kürzere Splice-Variante DFF35 weist eine mit DFF45 vergleichbare Inhibitorfunktion auf. Über die Chaperonfunktion von DFF35 wird unterschiedlich diskutiert. Frühere Studien mit ICAD-S zeigten, dass die kurze Isoform keinerlei chaperone Aktivität aufweist⁴³. In ICAD-S ist das C-terminale Cluster negativer Ladungen, welches in der langen Isoform zu finden ist, durch die Deletion der Aminosäurereste 262-331 zerstört. Dies könnte ein Grund für die beeinträchtigte Chaperonfunktion von DFF35 sein. In folgenden Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass durch die Koexpression von ICAD-S und CAD eine funktionelle Nuklease produziert wird, die aber in ihrer nukleolytischen Aktivität etwa um den Faktor 50 reduziert war⁴⁷. Die Rolle von ICAD-S in der Zelle ist weiterhin unklar.

1.3 Kompartimentierung und Transport von Makromolekülen

Eukaryontische Zellen sind in unterschiedliche Reaktionsräume, sogenannte Kompartimente eingeteilt. Die Abgrenzung der Kompartimente voneinander durch Membranen ermöglichen durch ihre steuerbare Durchlässigkeit eine selektive Permeabilität. In den einzelnen Kompartimenten können unterschiedliche biochemische Reaktionen, die einander stören würden, getrennt voneinander ablaufen. Eukaryontische Zellen erhalten somit eine zusätzliche Möglichkeit, fundamentale Prozesse, wie Genexpression und Signaltransduktion

zu regulieren⁴⁸. Des Weiteren können zwischen den einzelnen Kompartimenten Konzentrationsgradienten aufgebaut werden. Diese Konzentrationsgefälle können z. B. von Proteinen genutzt werden, um Produkte zu synthetisieren⁴⁹. Auch die Bindung und Freisetzung von Substraten wird über Konzentrationsgradienten zwischen den einzelnen Reaktionsräumen reguliert, wie später am Beispiel löslicher Transportrezeptoren (Importine) genauer erläutert wird.

Die Kompartimentierung eukaryontischer Zellen macht einen gesteuerten Molekültransport zwischen den einzelnen Kompartimenten nötig. Zum Beispiel ist der Transport von Makromolekülen zwischen Zellkern und Cytoplasma ein essentieller, zellulärer Prozess in allen Eukaryonten⁵⁰. Alle nukleären Proteine werden im Cytoplasma der Zelle synthetisiert und müssen im Folgenden in den Zellkern transportiert werden⁵¹. Viele Proteine bewegen sich ständig zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her. RNA-Moleküle, die im Zellkern transkribiert werden, müssen in das Cytoplasma exportiert werden. Die Vielzahl der zu transportierenden Moleküle ergibt einen enorm hohen Level an nukleocytoplasmatischem Transportverkehr. Schätzungsweise werden 1 Million Makromoleküle pro Minute in wachsenden Säugerzellen zwischen den beiden Kompartimenten hin- und herbewegt.

1.3.1 Signalvermittelter Kerntransport

Kerntransport (Kernimport und Kernexport) von Makromolekülen ist ein aktiver, signalvermittelter Prozess, bei dem Cargo-Moleküle durch den *nuclear pore complex* (NPC), der eingebettet in die Lipid-Doppelschicht der Kernmembran so genannte Kernporen bildet, geschleust werden⁵². Der NPC ist eine 125 MD umfassende, makromolekulare Struktur, die sich aus unterschiedlichen Nukleoporin-Molekülen zusammensetzt. Die allgemeine Architektur wird von Struktur-Nukleoporinen gebildet, während porenassoziierte Membranproteine (*pore membrane proteins*) den NPC in der Kernmembran verankern. Der Kanal des NPC wird von FG-Nukleoporinen ausgekleidet, die sich durch Phenylalanin-Glycin-*repeat*-Motive, getrennt durch geladene oder polare Linker-Regionen, auszeichnen. FG-Nukleoporine bilden ebenfalls ausgedehnte Filamente auf cytoplasmatischer und nukleärer Seite des NPC und sind an der Erzeugung der Permeabilitätsbarriere des NPC beteiligt. Die mit Cargomolekülen beladenen Rezeptormoleküle interagieren während der Translokation durch den NPC mit den FG-Nukleoporinen.

Kleine Moleküle (bis ca. 40 kDa) wie Ionen und Metabolite diffundieren passiv, dem Konzentrationsgradienten folgend, durch den *nuclear pore complex*, während Makromoleküle, die eine Größe von 40 kDa überschreiten, durch Rezeptorproteine gebunden und aktiv transportiert werden müssen⁵³. Lösliche Transportrezeptoren erkennen und binden spezifisch das Cargo-Protein im entsprechenden Zellkompartiment und geben es

nach dem Durchtritt durch die Zellmembran auf der gegenüberliegenden Seite des NPC wieder ab. Die Rezeptorproteine können daraufhin weitere Cargo-Moleküle durch den NPC schleusen (*recycling*). Da der Transport von Cargo-Molekülen durch Rezeptormoleküle gegen einen Konzentrationsgradienten stattfinden kann, ist er an Energieverbrauch gekoppelt⁵¹.

Die prominentesten löslichen Kerntransportrezeptoren in eukaryontischen Zellen sind Mitglieder der Proteinfamilien der Importine und Exportine (siehe 1.3.1.2).

Die Regulation von Cargobindung, Transport durch die Kernmembran und Abgabe des Cargos im Zielkompartiment durch Importine/Exportine wird über die asymmetrische Verteilung der beiden Nukleotid-Stadien der GTPase Ran zwischen Kern und Cytoplasma, dem sogenannten RanGTP Gradienten, reguliert^{50,54}.

Ran existiert in der Zelle sowohl im GTP- als auch im GDP-gebundenen Zustand, vermittelt durch zusätzliche Faktoren in verschiedenen Kompartimenten. *Ran guanine nucleotide exchange factor* RCC1 katalysiert die Bindung von GTP und ist in der Zelle nahezu ausschließlich im Nukleus lokalisiert, während die Hydrolyse von RanGTP durch die cytoplasmatisch lokalisierten Faktoren *RanGTPase activating protein* RanGAP, sowie RanBP1 und RanBP2 vermittelt wird^{55,56}. Auf diese Weise wird ein steiler Konzentrationsgradient der beiden Nukleotid-Stadien zwischen den Kompartimenten Cytoplasma und Zellkern gewährleistet⁵⁷.

Sowohl Importine als auch Exportine interagieren über ihre konservierte N-terminale Domäne mit RanGTP, allerdings mit gegenteiligem Effekt. Während Importine im Cytoplasma in Anwesenheit von RanGDP Cargo-Proteine erkennen und binden können, erfolgt im Zellkern die Freilassung der Cargo-Moleküle durch die Interaktion mit RanGTP. Die Interaktion von Exportinen mit RanGTP im Zellkern hingegen führt zu einer Bindung der Export-Cargos an Exportine. Im Cytoplasma dissoziieren die Cargo-Moleküle ab, sobald die Hydrolyse von GTP zu GDP von RanGAP, RanBP1 und RanBP2 katalysiert wird. Auf diese Weise funktioniert RanGTP als molekularer Schalter, welcher Bindung und Freisetzung der Cargo-Moleküle von Importinen und Exportinen reguliert⁵⁸.

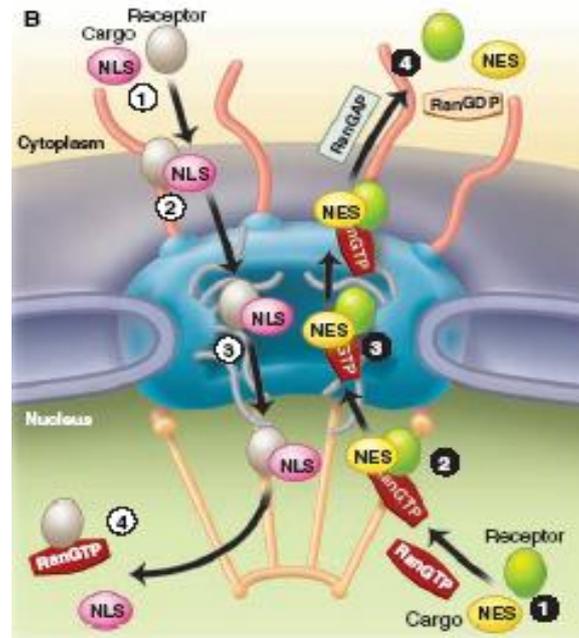


Abb. 1-4: Modell von RanGTP/RanGDP gesteuertem Kernimport und Kernexport: Im Cytoplasma, in Abwesenheit von RanGTP, binden Cargo-Moleküle, die ein NLS beinhalten, an lösliche Importrezeptorproteine. Nach Translokation durch den NPC wird das Cargo-Molekül durch Bindung von RanGTP an den Transportrezeptor von diesem freigelassen. Die gegenteilige Wirkung hat die Bindung von RanGTP an Exportrezeptoren im Zellkern, die durch Bindung von RanGTP Cargo-Moleküle, die ein NES (*nuclear export signal*) beinhalten, erkennen und binden können. Nach dem Durchtritt durch den NPC wird die Hydrolyse von GTP zu GDP im Cytoplasma vermittelt, was zu einer Entlassung des Cargos vom Exportrezeptor zur Folge hat. Auf diese Weise wird durch den RanGTP/RanGDP-Gradienten über die Kernmembran sichergestellt, dass Rezeptorproteine die entsprechenden Cargo-Moleküle im richtigen Kompartiment binden und auf der anderen Seite des NPC entlassen.⁵⁹

1.3.1.1 Kernlokalisierungssignale

Wie bereits erwähnt, ist der Kerntransport von Proteinen, die eine Größe von ca. 40 kDa überschreiten, ein signalvermittelter Vorgang. Klassische Kernlokalisierungssignale (*nuclear localisation signals*; NLS) in Proteinen sind kurze Peptidsequenzen, die durch Ansammlungen basischer Aminosäurereste geprägt sind⁶⁰. Sie werden definiert als die minimalen Sequenzen, die zur Vermittlung der Translokation des parentalen Proteins vom Cytoplasma in den Zellkern notwendig sind.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Konsensussequenzen von klassischen Kernlokalisierungssignalen, die in nukleären Proteinen zu finden sind, die als einteilig bzw. zweiteilig bezeichnet werden.

Das Vorhandensein der einteiligen Kernlokalisationssequenz wurde zuerst entdeckt und geprägt durch intensive Untersuchungen am Beispiel des SV40 *large T*-Antigen mit der Sequenz **PKK¹²⁸KRKV⁶¹**. Die basischen Aminosäurereste sind in einem Cluster angeordnet.

Der Austausch des Lysinrestes in Position 128 gegen Threonin bzw. Asparagin führt zu einem vollständigen Verlust der Kernlokalisierung des SV40 *large T*-Antigen⁶².

Erste Vermutungen über das Vorhandensein weiterer NLS-Konsensussequenzen in nukleären Proteinen wurden angestellt, als in Nukleoplasmin ein NLS-Motiv entdeckt wurde, welches wesentlich länger war, als die einteilige Konsensussequenz im SV40 *large T*-Antigen⁶³. Das NLS-Motiv **KRPAATKKAGQAKKKK** weist ebenfalls einen hohen Anteil basischer Aminosäurereste auf, die in drei Clustern angeordnet sind. Durch Mutagenese-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das C-terminal sowie das N-terminal gelegene Cluster basischer Aminosäurereste für die Kerntranslokalisierung von Bedeutung sind. Sequenzalignments mit weiteren Proteinen zeigten, dass das Nukleoplasmin NLS-Motiv in einer Vielzahl von kernlokalisierten Proteinen vorkommt, woraufhin die Konsensussequenz des zweiteiligen NLS definiert wurde: Zwei Cluster basischer Aminosäurereste werden durch einen Linker, bestehend aus 10-12 nicht konservierten Aminosäureresten getrennt. Das N-terminale Cluster besteht aus zwei basischen Aminosäureresten, während das zweite Cluster an die Konsensussequenz des einteiligen SV40 *large T*-Antigen-NLS erinnert⁶⁴. Untersuchungen der Linkerregionen verschiedener zweiteiliger Kernlokalisationssequenzen zeigten, dass sowohl Deletionen als auch Insertionen die Effizienz der Kerntranslokalisierung kaum beeinflussten⁶⁵. Aus diesem Grund wird vermutet, dass nicht die Länge des Linkers bedeutend ist, sondern die Flexibilität der Region, die die richtige Positionierung der Cluster zur Bindung an Transportrezeptoren zulässt⁶⁶.

Häufig wird der NLS-abhängige Kerntransport durch Phosphorylierung von Aminosäureresten, die die NLS-Region flankieren, übergeordnet reguliert. Die Phosphorylierung wird durch Zellzyklus-abhängige Kinasen, wie z.B. Cdc2 durchgeführt und führt zu verstärkter Akkumulation im Zellkern. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung dieser Sequenzen eine Rolle in der Zellzyklus-abhängigen Kontrolle der nukleären Lokalisation von Onkogen-Produkten und Transkriptionsfaktoren spielt⁶⁷.

Ein weiteres Beispiel für übergeordnete Regulation des Kerntransportes von Proteinen mit Kernlokalisierungssignalen ist die Maskierung eines NLS durch Komplexierung mit anderen Proteinen. Ein prominentes Beispiel dafür ist das NLS des Transkriptionsfaktors NF κ B, welches durch Bindung des Inhibitors I κ B nicht für die Kerntransportmaschinerie zugänglich ist. Ausgelöst durch proinflammatorische Stimuli kommt es zur Phosphorylierung und anschließenden Spaltung von I κ B und somit zur Demaskierung des NLS, sodass NF κ B in den Zellkern transportiert werden kann⁶⁸.

Neben den klassisch ein- bzw. zweiteiligen Kernlokalisationssequenzen existieren auch Signalpeptide, die weder der einen noch der anderen Konsensussequenz zugeordnet werden können, aber dennoch für den Kerntransport wichtige basische Aminosäurereste enthalten. Zum Beispiel enthält die Kernsignalsequenz des Influenzavirus Nukleoprotein

AAFEDLRVL nur einen basischen Aminosäurerest⁶⁹ und stellt somit ein nicht-klassisches, einteiliges NLS dar. Ein nicht-klassisches zweiteiliges NLS ist im *fibroblast growthfactor-2* zu finden, in dessen Konsensussequenz ¹¹⁶RSRK¹⁹⁹YTSWYVALKR¹²⁹ nur der Lysinrest in Position 119 und der Argininrest in Position 129 für den Kerntransport bedeutend sind⁷⁰.

Der Kernimport von Proteinen mit Kernlokalisationssequenzen, die von basischen Aminosäuren geprägt sind, wird von löslichen Transportrezeptoren der Zelle durchgeführt, der Proteinfamilie der Importine (siehe 1.3.1.2).

1.3.1.2 Importine: lösliche Transportrezeptoren

Mitglieder der Karyopherin β Proteinfamilie sind am Kerntransport verschiedenster Cargomoleküle beteiligt⁷¹. Snurportin z.B. ist zusammen mit Kap β 1 verantwortlich für den Kerntransport der snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) U1, U2, U4 und U5, wobei das m³G-cap der UsnRNA als NLS fungiert⁷². Der Kerntransport von Proteinen mit basischem NLS wird von einem Heterodimer aus Kap β 1 (Synonym: Importin β) und Kap α (Synonym: Importin α) vermittelt⁷³. In dieser Arbeit werden für die Transportrezeptoren die Bezeichnungen Importin α und Importin β verwendet. Durch Wechselwirkungen von Importin β mit FG-Nukleoporinen des NPC erfolgt die Translokation aus dem Cytoplasma in den Nukleus. Erkennen und Bindung des NLS des Cargoproteins wird von dem Adaptermolekül Importin α ausgeführt.

1.3.1.2.1 Importin β

Importin β (90 kDa) ist ein helikales Protein, aufgebaut aus 19 tandemartigen HEAT *repeats*, die von zwei über einen kurzen *turn* verbundenen, antiparallelen Helices A und B gebildet werden. Die A-Helices bilden die konvex geformte Oberfläche, die B-Helices formen die konkave Innenseite des Proteins. Die Oberfläche von Importin β vermittelt beim Durchtritt durch die Kernpore die Wechselwirkungen mit den FG-Nukleoporinen des NPC (siehe 1.3.1). HEAT-*repeats* 7-19 an der Innenseite des Rezeptors weisen ein ausgedehntes Netzwerk saurer Aminosäurereste auf. Diese vermitteln durch elektrostatische Wechselwirkungen mit basischen Aminosäureresten der Importin β -Bindedomäne (IBB) von Importin α , die Bildung des Heterodimers aus Importin α und Importin β ⁷⁴.

Ebenfalls an der Innenseite des Rezeptors erfolgt die Interaktion mit RanGTP vermittelt durch HEAT-*repeats* 1-10. Importin β weist eine gewisse Flexibilität auf und untergeht durch die Bindung von RanGTP eine globale Konformationsänderung. Dies spielt eine Rolle bei der RanGTP-abhängigen Bindung weiterer Faktoren, insbesondere der IBB-Domäne von Importin α , die in Anwesenheit von RanGTP nicht an Importin β binden kann⁷⁵.

HEAT-*repeats* 2-11 bergen eine Bindestelle für nicht-klassische Kernlokalisierungssignale. Die Lösung der Kristallstruktur von Importin β HEAT-*repeats* 2-11 im Komplex mit der Peptidsequenz des nicht-klassischen Kernlokalisierungssignals des *parathyroid hormone-related protein* (PHTrP) zeigte eine Vielzahl von Interaktionen zwischen Aminosäureresten des NLS-Peptids und Importin β . Dies spricht dafür, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Peptide in der Lage ist, an die Importin β Cargobindestelle zu binden. Dadurch erklärt sich das Fehlen einer strikt konservierten Konsensussequenz für nicht-klassische Kernlokalisierungssignale, deren Kerntransport durch Importin β vermittelt wird⁷⁶. In Säugern findet man nur eine Isoform von Importin β .

1.3.1.2.2 Importin α

Das Adapterprotein Importin α (60 kDa) besteht aus der N-terminalen IBB-Domäne aus konservierten basischen Aminosäureresten und der C-terminalen NLS-Bindedomäne⁷⁷. Die NLS-Bindedomäne wird gebildet von zehn Armadillo-*repeats* (*arm-repeats*), die aus je drei Helices bestehen und tandemartig angeordnet eine superhelikale Struktur bilden⁷⁸. Die dem umgebenden Medium ausgesetzte Oberfläche der NLS-Bindedomäne birgt eine Grube, die der superhelikalen Struktur des Moleküls folgt. Sie wird gebildet von hochkonservierten Tryptophan- und Asparaginresten, die jeweils in Helix 3 der *arm-repeats* lokalisiert sind.

Importin α besitzt zwei Kernlokalisierungssignal-Bindestellen. Die N-terminal gelegene Bindestelle liegt zwischen *arm-repeat* 2-5 und wird als primäre Bindestelle bezeichnet. Sie vermittelt die Beherrschung von klassischen, einteiligen Kernlokalisierungssignalen, sowie des C-terminal gelegenen Clusters von klassischen, zweiteiligen Kernlokalisierungssignalen und ist optimal konstruiert für die Erkennung von fünf basischen Aminosäureresten. Die konservierten Asparaginreste gewährleisten die antiparallele Orientierung sowie die Streckung des gebundenen NLS, während die Tryptophanreste in der Lage sind, die Beherrschung der aliphatischen Teile der Lysinreste der Kernlokalisierungssignale zu bewerkstelligen.

Die sekundäre Bindestelle wird von *arm-repeat* 7-9 gebildet und erlaubt die Erkennung und Bindung von zwei basischen Aminosäureresten. Das N-terminal gelegene, kleinere Cluster basischer Aminosäurereste von klassisch zweiteiligen Kernlokalisierungssignalen wird dort gebunden. Die Beherrschung von klassisch einteiligen Kernlokalisierungssignalen an die sekundäre Bindestelle wird kontrovers diskutiert. Moroiianu *et al.* konnten die Bindung des SV40 *large* T-antigen NLS an die sekundäre Bindestelle von Importin α zeigen⁷⁹. Da aber die Architektur der Bindestelle die Erkennung und Bindung von nur zwei basischen Aminosäureresten erlaubt, könnte die Bindung des SV40 *large* T-Antigen NLS auf unspezifische Bindung aufgrund von exzessivem Peptidüberschuss zurückzuführen sein.

Allerdings konnte in der Kristallstruktur von murinem Importin α 2 gezeigt werden, dass das einteilige SV40 large T-Antigen sowohl an die primäre als auch an die sekundäre Bindestelle binden kann (Abb. 1-5).

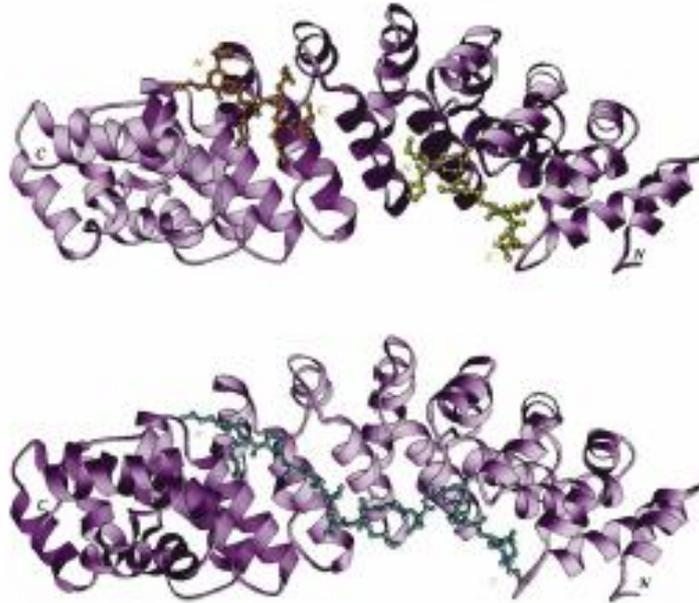


Abb. 1-5: Importin α -NLS-Bindedomäne, gebunden mit zwei einteiligen SV40-NLS bzw. mit zweiteiligem Nukleoplasmin-NLS: Gezeigt ist die NLS- Bindedomäne (AS 70-529) von murinem Importin α 2. Die primäre Bindestelle für basische Kernlokalisierungssignale ist N-terminal lokalisiert, die sekundäre Bindestelle mehr C-terminal. Im Kristall wurde das SV40-NLS-Peptid assoziiert mit beiden Bindestellen gefunden. Das zweiteilige NLS von Nukleoplasmin bindet mit dem größeren Cluster basischer Aminosäuren in die primäre und mit dem kleineren Cluster basischer Aminosäuren in die sekundäre Bindestelle. Die Bindung der NLS-Peptide verläuft antiparallel.

In Abwesenheit von Importin β wird die primäre Bindestelle von Importin α durch die Bindung eines internen NLS ($^{49}\text{KRRNV}^{53}$), lokalisiert in der N-terminalen IBB-Domäne, autoinhibiert⁸⁰. Durch die Bindung der IBB an Importin β wird die Autoinhibition aufgehoben und die Bindestelle ist frei für Interaktionen mit Kernlokalisationssequenzen von Cargo-Proteinen. Aus diesem Grund ist eine verstärkte Bindung von Substraten an Importin α in Anwesenheit von Importin β zu beobachten^{81,82}.

Sechs humane Isoformen des Adapterproteins Importin α wurden bisher beschrieben, Importin α 1, α 3, α 4, α 5, α 6 und α 7. Basierend auf Sequenzhomologien können die Importin-Isoformen in drei Unterfamilien gruppiert werden. Innerhalb einer Subfamilie besteht mindestens 80% Sequenzidentität, während Isoformen unterschiedlicher Subfamilien etwa 50% Sequenzidentität aufweisen⁸³. Die verschiedenen Isoformen werden in allen Geweben exprimiert, mit Ausnahme von Importin α 6, welches hauptsächlich in Hoden produziert wird⁸⁴. In der Literatur sind viele Beispiele für Substratspezifitäten bezüglich der Cargo-Proteine für die unterschiedlichen Isoformen von Importin α zu finden^{85,86}. Köhler *et al.* konnten in einer

systematischen *in-vitro*-Untersuchung zeigen, dass viele Substrate von unterschiedlichen Importin α Isoformen gebunden werden können. Allerdings zeigte sich eine deutliche Bindungspräferenz, wenn einer Isoform mehrere Substrate angeboten wurden, was dafür spricht, dass *in-vivo* der Kerntransport substratspezifisch von den Importin α Isoformen vermittelt wird.

1.4 NLS-abhängiger Kerntransport von DFF

Bereits im Zuge der Entdeckung des DFF-Komplexes, wurde in der murinen Nuklease CAD ein C-terminal lokalisiertes Kernlokalisierungssignal entdeckt, welches von Ansammlungen basischer Aminosäurereste geprägt ist. Es wurde vermutet, dass es durch die Heterodimerbildung mit dem Inhibitor ICAD zu einer Maskierung des CAD-NLS kommt, was in einer Zurückhaltung des DFF-Komplexes im Cytoplasma nicht-apoptotischer Zellen resultiert. Wird Apoptose ausgelöst, wird ICAD durch proteolytische Spaltung durch Caspase-3 aus dem DFF-Komplex entfernt. Das Kernlokalisierungssignal von CAD wird daraufhin für die Kerntransportmaschinerie zugänglich und die freie, aktive Nuklease wird in den Kern transportiert²⁵.

Zu diesem Zeitpunkt wurde durch mehrere Forschergruppen unabhängig voneinander anhand von Immunlokalisationsexperimenten und GFP-Fusionsexperimenten die Lokalisation der humanen Isoform DFF45 und des Maus-Homologs ICAD-L im Zellkern gezeigt. Es wurde angenommen, dass DFF45 im *piggy-back*-Verfahren durch den aktiven Kerntransport von CAD oder weiteren kernlokalisierten Polypeptiden in den Kern gelangt^{27,87}. Durch Deletions- und Fusionsexperimente am C-Terminus von DFF45 wurde schließlich bestätigt, dass auch die inhibitorische Untereinheit des DFF-Komplexes ein von basischen Aminosäureresten gekennzeichnetes Kernlokalisierungssignal am C-Terminus beherbergt⁸⁸. Sequenzalignments mit der klassisch zweiteiligen Kernlokalisationssequenz von Nukleoplasmin zeigten eine große Übereinstimmung und ließ vermuten, dass DFF45 ein klassisches zweiteiliges NLS beinhaltet.

Die Lösung der Kristallstruktur von CAD zeigte, dass die Kernlokalisationssequenz der Nuklease im gefalteten Protein so positioniert ist, dass sie frei zugänglich für die Bindung durch Transportrezeptoren ist³².

Durch Untersuchungen des Kerntransportes von DFF konnte gezeigt werden, dass der Kerntransport NLS-abhängig durch Importin α /Importin β ausgeführt wird. Es konnte gezeigt werden, dass jeweils ein Cluster basischer Aminosäurereste in beiden Untereinheiten von DFF für den Kerntransport von Bedeutung ist⁸⁹.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war zum einen, die genaue biochemische Charakterisierung verschiedener Cluster basischer Aminosäurereste am C-Terminus beider Untereinheiten des DFF-Komplexes und zum anderen, die Analyse des aktiven, Importin-vermittelten Transportes dieser Faktoren in den Zellkern.

Anhäufungen basischer Aminosäurereste deuten auf das Vorhandensein klassischer Kernlokalisations-signale hin, die traditionell als ein- bzw. zweiteilig eingruppiert werden. Die Anordnung und Anzahl dieser Cluster in den Untereinheiten des DFF-Komplexes lässt offen, ob es sich um einteilige oder zweiteilige Kernlokalisations-signale handelt. Durch vorausgehende Studien konnte gezeigt werden, dass in DFF40 ausschließlich ein von zwei Cluster basischer Aminosäurereste für den Kerntransport von Bedeutung ist^{90,91}. CAD, die murine Form von DFF40, weist zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus auf, welche ein weiteres Cluster basischer Aminosäurereste beinhalten. Die NLS-Sequenz von CAD sollte im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert und klassifiziert werden. Frühere Untersuchungen der NLS Sequenz von DFF45 zeigten ebenfalls den Einfluss von mindestens einem Cluster basischer Aminosäurereste, ein weiteres, mehr N-terminal gelegenes Cluster wurde in dieser Arbeit untersucht, um das NLS von DFF45 genau klassifizieren zu können.

Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten sowie Punktmutanten der Untereinheiten des DFF-Komplexes als Fusionskonstrukte mit fluoreszierenden Proteinen generiert und mikroskopisch untersucht.

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Art und Weise des Transportes von DFF aus dem Cytosol in den Zellkern wenig bekannt. Das Vorhandensein klassischer Kernlokalisations-signale in den DFF Untereinheiten, charakterisiert durch Anhäufungen basischer Aminosäuren, führte zu der Annahme, dass der Kerntransport durch freie, auf NLS-abhängigen Transport spezialisierte Rezeptorproteine, den Importinen, bewerkstelligt wird. Die Bindefähigkeit von DFF an verschiedene Importin-Isoformen sollte untersucht werden, um Rückschlüsse auf Substratspezifität und Stöchiometrie des Transportes durch Importine ziehen zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Geräte, die zur Standardausstattung eines biochemischen Labors gehören wie Pipettierhilfen, Glas- und Plastikgefäße etc. werden hier nicht vermerkt.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Hersteller
Autoklav	Technomara Integra Bioscience
BlueFlash semi-dry Blotter	SERVA
Elektrophoresenetzgeräte EPS 3500 XL	Pharmacia Biotech
Elektroporator EasyjecT	EquiBio
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra
Gelkammern (vertikal, horizontal)	SERVA, Keutz, Angewandte Gentechnik Systeme GmbH
Heizblock Driblock [®] DB-3	Techne
Heizrührer IKAMAG [®] REO	Janke & Kunkel
HPLC	Beckman
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor J6-HC	Beckman
Kühlzentrifuge mit Festwinkelrotor J2-HS	Beckman
Luftschüttler innova [®] 40	New Brunswick Scientific
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss (Germany)
Minishaker MS1	Janke & Kunkel IKA [®]
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop [®]
pH-Meter HI991001	Hanna
Reinstwasseranlage	Seralpur PRO90 CN
Spectrophotometer U1100	Hitachi
Speedvac Hetovac VR1	Heto
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermocycler Tpersonal	Biometra
Tischzentrifugen 5417C, Minispin	Eppendorf
Ultraschall-Desintegrator Sonifier 250	Branson
Vakuumpumpe	HetoLab Equipment
Vortexer VF2	Janke & Kunkel

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Alle Chemikalien und Biochemikalien, die verwendet wurden, trugen den Reinheitsgrad *pro analysi*. Die Auflistung erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid 40% Mix 1:29	AppliChem
Agarose	Eurogentec
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Aluminiumsulfat Hydrat	AppliChem
CelLytic M Cell Lytic Reagent	Sigma
Chloramphenicol	AppliChem
Coomassie® Brilliant blue G250	AppliChem
DMEM	Gibco Life technology
DTT	AppliChem
EDTA	AppliChem
EGTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethidium Bromid	Roth
Ethanol	Merck
Fötale Kälberserum	Gibco Life Technology
Glutathion red.	Merck
Glutathion Sepharose	Amersham Bioscience
Glycerin	AppliChem
Glycin	Merck
Hoechst 33342	Molecular Probes
HEPES	AppliChem
Imidazol	Merck
IPTG	AppliChem
Kaliumacetat	AppliChem
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycinsulfat	AppliChem
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat	AppliChem

Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
o-Phosphorsäure	Roth
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technology
PMSF	AppliChem
Polyfect	Qiagen
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Salzsäure	Merck
SDS	Roth
TEMED	Merck
Tetracyclin-Hydrochlorid	AppliChem
Transfast	Promega
Tris	AppliChem
Triton X 100	Merck
Tween 20	Merck

2.1.3 Kits

Tabelle 2.3: Kits in alphabetischer Reihenfolge

Kit	Hersteller	Verwendung
Nucleobond [®] AX	Macherey-Nagel	Plasmidpräparation im Maxi-Maßstab
PureYield [™] Plasmid Midiprep System	Promega	Plasmidpräparation im Midi-Maßstab
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-up System	Promega	Plasmidpräparation im Mini-Maßstab

2.1.4 Enzyme und Marker

Restriktionsenzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern eingesetzt und werden hier in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Der Pfeil in der Erkennungssequenz kennzeichnet die Schnittstelle des Enzyms.

Tabelle 2.4: Restriktionsenzyme in alphabetischer Reihenfolge

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
AgeI	5`-A ↓ CCGGT-3`	Fermentas
BglII	5`-A ↓ GATCT-3`	Fermentas
NheI	5`-G ↓ CTAGC-3`	Fermentas
SacII	5`-CCGC ↓ GG-3`	NEB
Sall	5`-G ↓ TCGAC-3`	Fermentas
XhoI	5`-C ↓ TCGAG-3`	Fermentas

Folgende DNA-modifizierende Enzyme wurden verwendet:

Tabelle 2.5: DNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Eigenherstellung
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Eigenherstellung
T4 DNA-Ligase	Fermentas

Für gelelektrophoretische Untersuchungen von Proteinen und DNA wurden folgende Größenstandards verwendet:

Tabelle 2.6: Verwendete Größenstandards

Marker	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1kb	Fermentas
pUC Mix Marker, 8	Fermentas

2.1.5 Antikörper

Zur immunologischen Untersuchung von Proteinen durch Western *blots* wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
IgG (H +L), Goat Anti-Rabbit (CALTAG™)	Invitrogen
Anti-DFF40/CAD (IN), rabbit polyclonal	assay designs
Anti-DFF45/ICAD (NT), rabbit polyclonal	assay designs
Anti-FLAG® M2-Peroxidase (HRP), mouse monoclonal	Sigma
Anti-HA-Peroxidase (HRP), mouse monoclonal	Sigma

2.2 Mikrobiologische Arbeiten

2.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte generell in *lysogeny broth* Medium (LB-Medium).

LB-Medium: 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Trypton, 5g/l NaCl

Zur Herstellung von Flüssig-Selektivmedien wurden die entsprechenden Antibiotika erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Zur Verwendung von LB-Medium als Festmedium in Petrischalen wurde Bacto-Agar (1.5% (w/v)) zugesetzt. Die Zugabe von Antibiotika zur Herstellung von Selektivplatten erfolgte nach dem Autoklavieren des Agars, da diese nicht hitzestabil sind.

2.2.2 *E. coli* Stämme

Tabelle 2.8: Verwendete *E. coli* Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Beschreibung
XL1 BlueMRF+	$[\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, sup-E44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F^- pro AB lac^qZ\Delta M15 Tn 10(Tet^f)]]$	Dieser Stamm eignet sich aufgrund geringer Rekombinationsraten (<i>recA1</i>) und funktionsloser Endonuklease (<i>endA1</i>) sehr gut für die Generierung von Plasmid-DNA mit einem hohen Anteil an scDNA. In dieser Arbeit wurde er bevorzugt für die Produktion von Plasmid-DNA eingesetzt. Die Proteinherstellung von Importin α und His-Importin β erfolgte ebenfalls in diesem Zellstamm.
TGE900	$[F^-, su-1, ilv-1, bio(\lambda cIts857\Delta Bam\Delta H1)]$	Dieser Stamm exprimiert die Variante $\lambda cIts857$ des λ -Repressors, welcher bei 28°C stabil ist und durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C denaturiert wird. Die Transkription von Genen, die unter Kontrolle des λpL - oder λpR -Promotors stehen, können deshalb durch Inkubation der Zellen bei 42°C angeschaltet werden. In dieser Arbeit wurde der Stamm eingesetzt, um den DFF-Komplex mit Hilfe eines Zwei-Plasmid-Systems zu exprimieren.
BL21-Gold (DE3)	$[F^-, ompT, hsdS(r_B^- r_B^-) dcm^+, Tet^f, gal \lambda(DE3), endA, Hte]$	Dieser Stamm wurde benutzt, um Gene unter der Kontrolle des T7 ϕ 10-Promotors zu exprimieren. In dieser Arbeit wurde DFF45 in BL21-Gold (DE3) exprimiert.

2.2.3 DNA-Transformation von *E. coli*

E. coli-Zellen sind von Natur aus nicht in der Lage, DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Deswegen müssen sie vor der Transformation kompetent gemacht werden. In dieser Arbeit wurden zwei Arten kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

2.2.3.1 Bereitung elektrokompetenter *E. coli*

Setzt man *E. coli*-Zellen kurzen Hochspannungsimpulsen aus, kommt es zu Öffnungen in der Zellhülle, durch die externe DNA aus dem umgebenden Medium in die Zellen aufgenommen werden kann. Voraussetzung für diese Methode ist, dass sich sowohl die *E. coli*-Zellen, als auch die aufzunehmende DNA weitgehend in Ionen-freier Lösung befinden.

Um dies zu erreichen, werden die *E. coli*-Zellen mehrmals mit 10%iger Glycerinlösung gewaschen.

Folgendes Protokoll wurde zur Bereitung elektrokompetenter Zellen eingesetzt:

Gefäße und Glycerinlösung wurden vor Beginn autoklaviert bzw. mit Ethanol ausgespült und vorgekühlt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

1. 2 x 500 ml LB-Medium wurden mit je 10 ml einer ü.N.-Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln angezogen, bis eine OD^{600nm} von 1 erreicht wurde.
2. Die Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rpm für 30 min abzentrifugiert.
3. Der Überstand wurde abgegossen. Es folgten drei Waschschrte mit eiskaltem 10%igen Glycerin (250 ml, 150 ml, 20 ml) wobei das Zellpellet durch vortexen gelöst wurde, anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (s. Schritt 2)
4. Die pelletierten Zellen wurden nun in 3-4 ml eiskalter Glycerinlösung aufgenommen, zu je 80µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellaliquots wurden bei -80 C° gelagert.

2.2.3.2 Bereitung TSS-kompetenter *E. coli*

Die TSS-Transformation von *E. coli* geht auf die Methode nach Chung *et al.*, 1989 zurück⁹².

Folgendes Protokoll wurde zur Bereitung elektrokompetenter Zellen eingesetzt:

Gefäße und TSS-Lösung wurden vor Beginn autoklaviert bzw. mit Ethanol ausgespült und vorgekühlt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

1. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer ü.N.-Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln angezogen, bis eine OD^{600nm} von 0.3-0.5 erreicht wurde.
2. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 3480 x g und 4°C abzentrifugiert.
3. Das Zellpellet wurde in 10 ml (0.1 Vol. bezogen auf das ursprüngliche Kulturvolumen) TSS-Lösung (LB-Medium mit 40% (w/v) PEG 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM Mg²⁺ (MgCl₂), pH 6.0-6.5) aufgenommen.
4. Die Zellen zu je 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

2.2.3.3 Transformation elektrokompetenter *E. coli*

1. Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis angetaut und mit 1-200 ng salzfreier *supercoiled* DNA versetzt und kurz auf Eis inkubiert.
2. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben.
3. Die Transformation erfolgte mit maximaler Kapazität von 50 µF, einem Widerstand von 150 Ω, einer vorgelegten Spannung von 1500 V, einer Stromstärke von 25 mA und einer maximalen Leistung von 25 W. Die Zellen wurden im Elektroporator kurzfristig diesem elektrischen Feld ausgesetzt.
4. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und in einem Eppendorfreaktionsgefäß für 60 min bei 37°C inkubiert.
5. 50 µl der Zellsuspension wurden auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde bei 6000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet im verbleibenden Mediumrest gelöst und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden 24 h im Inkubator bei der für den eingesetzten Zellstamm empfohlenen Temperatur gelagert.

2.2.3.4 Transformation TSS-kompetenter *E. coli*

1. Ein Aliquot TSS-kompetenter Zellen wurde auf Eis angetaut. Es wurden 50 ng – 2 µg Plasmid-DNA dazugegeben und das Zell-DNA-Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert.
2. Danach wurde ein Hitzeschock (42°C) für 2 min durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis abgekühlt.
3. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 60 min.
4. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Zellen bei 6000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in dem verbleibenden, restlichen Medium

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Inkubator bei der für den gewählten Zellstamm empfohlenen Temperatur gelagert.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Elektrophorese und Western *blot*

Charakterisierungen und Analysen von DNA und Proteinen werden im Allgemeinen anhand von elektrophoretischen Verfahren durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde sowohl Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese zur Analyse von DNA, als auch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western *blotting* zur Charakterisierung von Proteinen eingesetzt.

2.3.1.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Moleküle zu untersuchen, die eine Größe von 1000 bp überschreiten (z.B. Plasmidpräparationen, Restriktionsspaltungen), wurde die analytische Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurden 0,8%ige Agarosegele verwendet, hergestellt mit TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer), die in einem horizontalen Kammersystem eingesetzt wurden.

TBE-Puffer: 100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8.3

Pro cm Gellänge wurden höchstens 10 V angelegt. Die Proben wurden mit 0.2 Vol 5-fach konzentriertem Agaroseauftragspuffer (AAP) versetzt.

Agaroseauftragspuffer (AAP): 250 mM EDTA, 25 % (w/v) Saccharose, 1.2 % (w/v) SDS,
0.1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8.0 (eingestellt mit NaOH)

Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese in Ethidium-Bromid-haltiger Lösung inkubiert. Ethidium-Bromid Moleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA und verändern dabei ihr Anregungsspektrum. Die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht wird so stark erhöht. Die Auswertung von DNA-Gelen erfolgte durch eine Geldokumentationsanlage, die mit Hilfe von UV-Licht Ethidium-Bromid gefärbte DNA sichtbar machen kann. Die Bilder wurden sowohl elektronisch gespeichert, als auch ausgedruckt.

2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode kam zum Einsatz, um PCR-Produkte bis zu einer Größe von 1000 bp zu untersuchen. Dazu wurden 0,8%ige Polyacrylamidgele (Acrylamid : Bisacrylamid/29 : 1) mit TPE-Puffer in einer Größe von 9 cm x 10 cm x 0,1 cm hergestellt, die in einem vertikalen Kammersystem eingesetzt wurden.

TPE-Puffer: 90 mM Tris, 2 mM EDTA, 1,55 ml/L 85%ige Phosphorsäure, pH 8.3

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 45 mA. Auch bei dieser Methode wurden die Proben mit 0,2 Vol 5-fach konzentriertem Agaroseauftragspuffer (AAP) versetzt. Die Färbung der DNA, sowie Auswertung und Speicherung der Bilder wurde in gleicher Weise, wie bei Agarosegelen durchgeführt.

2.3.1.3 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Charakterisierung von Proteinen wurde die SDS-PAGE (SDS: *sodium dodecyl sulfate*) durchgeführt. Dazu wurden SDS-Polyacrylamid-Gele angefertigt, bestehend aus einem 9 cm x 6 cm x 0,1 cm großen Trenngel und einem 9 cm x 4 cm x 0,1 cm großen Sammelgel⁹³. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel unterscheiden sich im Polyacrylamidgehalt (Trenngel 12,5%; Sammelgel 6%), sowie im pH-Wert (Trenngel pH 8,8; Sammelgel pH 6,8).

Nach der elektrophoretischen Trennung wurde auf unterschiedliche Weise mit dem Gel verfahren. Entweder wurde es 3 x 5 min mit zuvor erwärmtem Wasser gewaschen und anschließend mit colloidalem Coomassie® *Brilliant blue* inkubiert. Dieser Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit unspezifisch Proteine an. Zum spezifischen und sensitiveren Nachweis von Proteinen wurden die Gele für Western *blots* weiterverwendet.

2.3.1.4 Western blot

Beim Western *blotting* wurden Proteine aus dem SDS-Gel im *semi-dry-blot* Verfahren auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) transferiert⁹⁴. Der Transfer erfolgte dabei elektrophoretisch in einem kontinuierlichen Puffersystem. Gele, Membran und Filterpapiere wurden zuvor für 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert.

Transferpuffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0.05 % (v/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Der Proteintransfer wurde bei einer Stromstärke von ca. 0.8 mA/cm² (ca. 45 mA bei 9 cm x 6 cm) durchgeführt. Um die noch unbesetzten Bindestellen auf der Membran mit Proteinen zu besetzen, wurde die Membran in Blockpuffer inkubiert, welcher gelöstes Magermilchpulver enthielt.

Blockpuffer: 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5 + 2 mg/50 ml Magermilchpulver

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper. In dieser Arbeit wurden die entsprechenden Antikörper in folgender Verdünnung (in Blockpuffer) eingesetzt:

Tabelle 2.9: Verdünnungen der eingesetzten Antikörper

Nachzuweisendes Epitop/ Protein	Verdünnung 1. Antikörper	Verdünnung 2. Antikörper
FLAG-tag	Anti-FLAG [®] M2-Peroxidase (HRP), mouse monoclonal; 1:500	-
HA-tag	Anti-HA-Peroxidase (HRP), mouse monoclonal; 1:2000	-
DFF40	Anti-DFF40/CAD (IN), rabbit polyclonal; 1:500	IgG (H +L), Goat Anti-Rabbit; 1:4000
DFF45	Anti-DFF45/ICAD (NT), rabbit polyclonal; 1:1000	IgG (H +L), Goat Anti-Rabbit; 1:4000

Nach mehrmaligem Waschen mit TTBS-Puffer (Tween-Tris-buffered saline) wurde die Nachweisreaktion durch Zugabe von ECL[™]-*detection solution* gestartet.

TTBS-Puffer: 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5

Das in der ECL[™]-*detection solution* enthaltene Luminol wurde von der Antikörpergekoppelten Meerrettich-Peroxidase unter Lichtaussendung oxidiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilmes konnte diese Reaktion sichtbar gemacht werden.

2.3.2 Plasmid-DNA-Isolation

Plasmid-Isolierung aus *E. coli* wurde in drei verschiedenen Maßstäben (Mini-, Midi- und Maxi-Maßstab) durchgeführt.

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Mini-Maßstab (3 ml *E. coli* Kultur) wurde mit dem Kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* von Promega nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde eingesetzt, um neu generierte Plasmide durch Restriktionsspaltungen, PCR oder Sequenzierung auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Auch zur Transformation in *E. coli* zur Proteinexpression wurde im Mini-Maßstab gewonnene Plasmid-DNA eingesetzt.

Um eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erreichen, wurden Präparationen im Midi- und Maxi-Maßstab (250 ml bzw. 500 ml *E. coli* Kultur) mit den Kits *PureYield™ Plasmid Midiprep System* von Promega und Nucleobond® AX von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Auf diese Weise gewonnene Plasmid-DNA eignete sich aufgrund des hohen Gehaltes an *supercoiled* DNA für die Transfektion von eukaryontischen Zellen. Bei beiden Plasmid-Präparationsmethoden handelt es sich um Modifikationen des Verfahrens der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly⁹⁵.

2.3.3 DNA Konzentrationsbestimmung

Um den DNA-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurden photometrische Messungen durchgeführt. Dazu wurde ein Spektrum im Bereich von 220 bis 320 nm gemessen. DNA absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ ($1E_{260\text{nm}} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l dsDNA}$).

Der Reinheitsgrad von DNA lässt sich durch das Verhältnis der Extinktion der Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmen. E_{260}/E_{280} sollte im Idealfall zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, größere Werte auf Verunreinigung mit RNA.

2.3.4 Bearbeitung von DNA

2.3.4.1 Restriktionsspaltungen von DNA

In dieser Arbeit wurden sowohl präparative als auch analytische Restriktionsspaltungen durchgeführt.

Präparativ wurden Restriktionsenzyme als Werkzeuge zur Klonierung neuer DNA-Konstrukte eingesetzt. 5 μg des Zielvektors wurden in einem Volumen von 30 μl -50 μl mit 20-50 *units* des Restriktionsenzym für 2 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. Ebenso wurde mit PCR-*inserts* verfahren. Inkubationstemperatur und Puffer wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach der Spaltung erfolgte eine Reinigung der Ansätze mit Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* von Promega nach Angaben des Herstellers.

Analytische Restriktionsspaltungen wurden eingesetzt, um z.B. neu generierte Plasmide oder PCR-Produkte (nach Mutagenese) auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Durch Linearisierung mit Restriktionsenzymen konnte die Länge neuer Vektoren bestimmt und überprüft werden. Mutagenese wurden überprüft, indem eine Restriktionsspaltung der neu

eingeführten Markerschnittstelle durchgeführt wurde. Dazu wurden 200 ng des Plasmids mit 20-30 *units* des Restriktionsenzym inkubiert. Nach der Spaltung erfolgte keine Reinigung, die Probe wurde mit 5 µl 5 x AAP (Agarose-Auftragspuffer) versetzt und durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.3.4.2 Ligation von Restriktionsfragmenten

Ligationen von DNA-Fragmenten wurden mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen 5'-Phosphat and 3'-Hydroxyl-Termini in dsDNA. Es ist in der Lage, sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden zu verbinden.

Dazu wurden 50-100 µg des Zielvektors mit einem Überschuss des *inserts* sowie 2 Weiss units T4-DNA-Ligase gemischt und entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Transformation von *E.coli* wurde der Ligationsansatz mit dem Kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* von Promega nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.3.5 PCR

Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren, um DNA durch wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen mit Hilfe von DNA-Polymerase künstlich zu vervielfältigen. Dieses Verfahren wird standardmäßig in der Molekularbiologie eingesetzt⁹⁶. PCR wurde in dieser Arbeit einerseits präparativ eingesetzt, um DNA-Fragmente zur Klonierung mit den passenden Restriktionsschnittstellen oder Mutationen herzustellen. Andererseits wurde auch analytische PCR durchgeführt, um positive Klonen nach einer Klonierung zu finden (*screening*).

2.3.5.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Sie wurden RP-HPLC gereinigt von der Firma Biomers bezogen und in einer Endkonzentration von 0.3 µM im PCR-Ansatz eingesetzt.

2.3.5.2 PCR Standardbedingungen

Polymerase-Kettenreaktion unter Standardbedingungen wurde durchgeführt, um zu klonierende DNA-Abschnitte zu amplifizieren und um nach positiven Klonen zu *screenen*. Dafür wurde folgender PCR-Mix hergestellt:

100 ng Plasmid-DNA als *template/ E.coli* Kolonie in H₂O denaturiert

0.1 Volumen Polymerase 10 x Puffer (enthält 1.5 mM MgCl₂)

200 μM eines jeden dNTPs

0.3 μM 5'- Primer

0.3 μM 3'- Primer

0.05 U/μl *Taq* DNA-Polymerase/ *Pfu*-DNA Polymerase

30 - 50 μl Endvolumen

Die Polymerasekettenreaktion wurde bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1. Einmalige **Denaturierung** bei 94-98 °C, 2-5 min
2. Zyklische Wiederholungen von **Denaturierung** (94-98 °C, 15 sec.-1 min), **Primerhybridisierung** (50-65 °C, 30 sec.-1 min) und **Primerextension** (68 °C/ 72 °C, 30 sec-1 min)

Die Primerhybridisierungstemperatur hängt vom GC- bzw. AT-Gehalt des jeweiligen Primerpaar ab und berechnet sich mit folgender Formel:

$$T_M = ((G+C) \times 4^\circ\text{C} + (A+T) \times 2^\circ\text{C})$$

Bei Anwendung der *Pfu*-Polymerase wurde eine Primerextensionstemperatur von 68 °C eingestellt, die optimale Temperatur der *Taq*-Polymerase lag bei 72 °C.

3. Einmalige **Primerextension** bei 68 °C/72 °C, 2-7 min
4. **Abkühlung** auf 4 °C.

2.3.5.3 *in-vitro*-Mutagenese mittels inverser PCR

Die *in-vitro*-Mutagenese durch inverse PCR ist eine klassische Methode der Molekularbiologie, um eine gezielte Punktmutation in ein Gen einzuführen. In dieser Arbeit wurden auf diese Weise Varianten von DFF45/ICAD-L hergestellt, die in der

Kernlokalisationssequenz mutiert waren. Ebenso wurde die Importin α 3-Variante mit Mutationen in der primären Bindestelle auf diese Weise generiert.

Bei der *in-vitro* Mutagenese wurden zwei verschiedene Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt.

Die erste PCR diente der Einführung der Mutation und wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Es wurden zwei Primer verwendet, die so gewählt wurden, dass durch die Polymerase-Kettenreaktion ein circa 300 bp großes DNA-Fragment entstand. Einer der beiden Primer enthielt die gewünschte Mutation. Wenn diese weit genug vom 3'-OH-Ende des Primers entfernt liegt, wird der Primer von der Polymerase akzeptiert. Des Weiteren wurde durch diesen Primer eine Markerschnittstelle eingeführt, die zur Kontrolle des Erfolges der Mutagenese diente.

In der zweiten PCR wurde das DNA-Fragment, welches in der ersten Polymerase-Kettenreaktion synthetisiert wurde, als Megaprimer eingesetzt, das *template*-Plasmid blieb gleich. Im Anschluss wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt, um das restliche *template* zu entfernen. DpnI erkennt und spaltet methylierte *dam*-Erkennungsstellen (GmATC) die nur im *template*-Plasmid und nicht im PCR-Produkt vorkommen, da die *dam*-Methylierung der Plasmide innerhalb der Bakterienzellen stattfindet.

Vor der Transformation von *E. coli* wurde eine Ethanol-Fällung der DNA durchgeführt.

Um zu kontrollieren, ob die Mutagenese erfolgreich war, wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion nach positiven Klonen *gescreent*. Durch die gewählten Primer wurde der Bereich amplifiziert, in dem die Mutation und die neu eingeführte Markerschnittstelle lagen. Durch anschließende Restriktionsspaltung mit dem Markerenzym konnten die positiven Klone von den negativen unterschieden werden. Von positiven Klonen wurden Mini-Plasmid-Präparationen angefertigt, zur endgültigen Kontrolle wurde eine Nukleotid-Sequenzierung des veränderten Genes durchgeführt.

2.3.6 Plasmid-Vektoren Konstruktionen

2.3.6.1 Plasmide für Expression in eukaryontischen Zelllinien

Tabelle 2.10: Plasmide für eukaryontische Genexpression

Plasmid	Allgemeine Informationen/ Anwendung	Konstrukte
pCI (Promega)	Der eukaryontischer Expressionsvektor pCI (Promega) enthält eine CMV (Cytomegalie-Virus) <i>enhancer/promotor region</i> , die starke Expression von Genen in vielen Zelllinien zulässt. In dieser Arbeit wurde der Vektor für die Klonierung und Expression von <i>Enhanced Green Fluorescent Protein-</i> (EGFP) bzw. DsRed-Monomer-Fusionen von DFF45, ICAD-L, DFF40 sowie HA- und FLAG-Fusionen von Importin α -Varianten, DFF40 und DFF45 in HeLa- und HEK293-Zellen benutzt.	pCI-DsReM-DFF45-S312A pCI-DsReM-DFF45-S312A-K313A pCI-DsReM-ICAD-L-R312A-R313A pCI-HA-Importin α 1 pCI-HA-Importin α 3 pCI-HA-Importin α 5 pCI-FLAG-DFF45-wt pCI-FLAG-DFF45 Δ NLS
pcDNA3.1 (Invitrogen)	Dieser Vektor von Invitrogen besitzt ebenso wie der pCI von Promega den CMV-Promotor und eignet sich deshalb in gleicher Weise für die Expression in eukaryontischen Zelllinien. In dieser Arbeit wurde er für die Expression von <i>EGFP-CAD</i> -Fusionsproteinen in HeLa-Zellen eingesetzt.	pcDNA3.1-EGFP-CAD pcDNA3.1-EGFP-CAD Δ NLS
pEGFP-C1 (Clontech)	Der Vektor pEGFP-C1 von BD Bioscience Clontech verfügt ebenfalls über den CMV-Promotor. Anschließend an den Promotor befindet sich das Gen für eine Variante von EGFP, die für eine höhere Expression in Eukaryonten und bessere Fluoreszenz optimiert wurde. Gene, die in die <i>Multiple Cloning Site</i> (MCS) eingesetzt wurden, wurden automatisch als EGFP-Fusionen exprimiert. In dieser Arbeit wurde der Vektor zur Generierung und Herstellung der NLS-Varianten von CAD benutzt.	pEGFP-C1-CAD Δ 340-344 pEGFP-C1-CAD Δ 336-344 pEGFP-C1-CAD Δ 330-344 pEGFP-C1-CAD Δ 321-344

2.3.6.2 Plasmide für Expression in *E. coli*

Tabelle 2.11: Plasmide für Genexpression in *E. coli*

Plasmid	Allgemeine Informationen/ Anwendung	Konstrukte
pGEX-2T (Amersham)	<p>Proteine, kloniert in pGEX-2T erhalten automatisch eine N-terminale Fusion mit GST.</p> <p>Zwischen GST-<i>tag</i> und Protein befindet sich eine Thrombin-Schnittstelle, die genutzt werden kann, um durch Thrombin-Spaltung den GST-<i>tag</i> zu entfernen.</p> <p>Die Expression steht unter Kontrolle des tac-Promotors, der chemisch mit IPTG induzierbar ist, welches den Repressor lacI inaktiviert und somit Expression auslöst.</p> <p>Ebenfalls besitzt dieser Vektor ein internes lacIq-Gen zur Produktion des Repressors lacI.</p>	<p>pGEX-2T-DFF40</p> <p>pGEX-2T-DFF40ΔNLS</p>
pACYC-Duet1 (Novagen)	<p>Dieser Vektor beinhaltet zwei <i>Multiple Cloning Sites</i> (MCS) und eignet sich daher für die Koexpression von zwei Genen. Außerdem ist eine kombinierte Transformation von pACYC-Duet1 und pET-Duet1 möglich. Dieser Vektor enthält ebenfalls zwei MCS, dadurch wird eine Expression von bis zu vier Genen gleichzeitig möglich.</p> <p>Die Genexpression wird von einem T7-Promotor kontrolliert und ist mit IPTG induzierbar.</p>	<p>pACYC-Duet1-His-FLAG-DFF45</p> <p>pACYC-Duet1-His-FLAG-DFF45ΔNLS</p>
pLK	<p>Dieser Vektor enthält einen Lambda p_L-Promotor. Die Expression wird durch eine thermosensitive Mutante des cl857 Repressor reguliert, welcher durch Hitzeschock bei 42 °C zerstört werden kann. Ursprünglich stammt dieser Vektor aus einer Arbeit von Botterman und Zabeau, in dessen Rahmen die Genexpression von EcoRI unter Kontrolle des Lambda p_L-Promotor optimiert wurde.</p>	<p>pLK-His-myc-DFF45wt</p> <p>pLK-His-myc-DFF45ΔNLS</p>

2.4 Expression von Genen und Reinigung von Proteinen in *E. coli*

Für *in-vitro* Experimente zur Charakterisierung des Kerntransportes von DFF wurden die benötigten Proteine in *E. coli* hergestellt und anschließend über IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) im *batch* Verfahren gereinigt.

Da jedes Protein unterschiedliche Eigenschaften aufweist, müssen Expressionssysteme, Puffer und Aufreinigungsstrategie spezifisch ausgewählt werden.

Im Allgemeinen wurde LB-Medium mit *E. coli*-Zellen einer über Nacht gewachsenen Vorkultur angeimpft und bei der für den Zellstamm empfohlenen Temperatur unter Schütteln inkubiert. Wenn die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,3-0,5 erreicht hatten, erfolgte die Induktion der Genexpression.

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Expressionssysteme für die zu exprimierenden Proteine aufgelistet.

Tabelle 2.12: Expressionssysteme *E.coli*

exprimierte Proteine	Plasmidvektoren	Zellstamm	Induktion	Resistenz
His-myc-DFF45wt/ Δ NLS	pLK	TGE900	Inkubation bei 42°C	Kanamycin
GST-DFF40wt/ Δ NLS	pGEX-2T		IPTG (1 mM)	Ampicillin
His-FLAG-DFF45wt/ Δ NLS	pACYC-Duet1	BL21-Gold-DE3	IPTG (1 mM)	Ampicillin
GST-Importin α 3, 5, GST-Importin α 3-arm3, - arm 3+8, -arm 7+8	pQE60	XL1-blue MRF ⁺	IPTG (1 mM)	Ampicillin
GST-Importin α 1	pQE70			
His-Importin β	pQE	XL1-blue MRF ⁺	IPTG (1 mM)	Ampicillin Tetracyclin
His-Importin α 1	pQE70	XL1-blue MRF ⁺	IPTG (1 mM)	Ampicillin Tetracyclin

2.4.1 Reinigung von His-FLAG-DFF45wt/ Δ NLS

Die Reinigung von DFF45 mit N-terminalen His-FLAG-*tag* erfolgte aus einer 500 ml-Kultur, die über Nacht exprimiert wurde, über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. Nach Abzentrifugation der Zellen bei 4000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Aufschlusspuffer gelöst. Durch Sonifizierung mit dem Ultraschall-Desintegrator Sonifier 250 von Branson für 10 Minuten (im Rhythmus 15 Sekunden schallen/ 15 Sekunden Pause) wurden die Zellwände der Bakterien zerstört. Anschließend erfolgte eine

Zentrifugation bei 20000 rpm, um die Zellfragmente von der löslichen Phase zu trennen. Nach der Zentrifugation befand sich das Protein His-FLAG-DFF45 im Überstand. Dieser wurde auf 900 μ l Ni²⁺-NTA-Agarose *beads* gegeben, die zuvor mit Aufschlusspuffer äquilibriert wurden. Die Bindung des Fusionsproteins an die Ni²⁺-NTA-Matrix erfolgte meist über Nacht, mindestens aber 1 h bei 4°C. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Ni²⁺-NTA-*beads* 3 x für 10 Minuten mit 10 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Für die Elution wurde ein Puffer mit 200 mM Imidazol eingesetzt. Dabei wurde 3 x mit 1 ml eluiert und die gewonnenen Elutionsfraktionen gegen einen Puffer dialysiert, der 10% Glycerin enthielt. Die Lagerung von His-FLAG-DFF45 erfolgte bei – 20°C.

2.4.2 Reinigung von DFF

Der DFF-Komplex wurde im Zwei-Plasmid-System in *E. coli* im 10 l Maßstab im Fermenter synthetisiert und über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie gereinigt. Über eine Druckluftleitung wurde eine ständige Belüftung der 10 l-Kultur gewährleistet, die Temperatur wurde über eine mit einem Wasserbad verbundene Heizspirale reguliert. Die Induktion des N-terminal His-myc-fusionierten Inhibitors DFF45 erfolgte durch Inkubation der Zellen bei 42°C für 2 h, im Anschluss daran wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die N-terminal GST- (Glutathion-S-Transferase) fusionierte Nuklease DFF40 induziert. Während der Reinigung wurde $\frac{1}{4}$ des Fermenters wie eine 500 ml Kultur behandelt (siehe 2.4.1). Die Reinigung des Komplexes GST-DFF40/His-myc-DFF45 erfolgte über den GST-*tag* der Nuklease mit Glutathion-Sepharose. Der pGEX-2T Vektor, der zur Expression der Nuklease benutzt wurde, beinhaltet einen GST-*tag* mit anschließender Thrombin-Schnittstelle.

Aufgrund dessen konnte anstelle einer Elution mit Glutathion, der GST-*tag* mit der Serin-Protease Thrombin abgespalten werden.

Um das Thrombin aus der Präparation zu entfernen, wurde der Komplex über eine MonoQ HR5/5 Anionenaustauschchromatographiesäule gereinigt. Die Elution der Proteine erfolgte mit Hilfe eines Salzgradienten von 100 mM-400 mM NaCl. Die gesammelten Fraktionen, die den DFF-Komplex enthielten, wurden vereinigt und über ein Centricon YM 50 eingeeengt und in Dialysepuffer mit 10% Glycerin umgepuffert. Der DFF-Komplex wurde bei – 20°C gelagert.

2.4.3 Reinigung von His-Importin β

Die Reinigung von Importin β mit N-terminalem (His)₆-*tag* entsprach im Maßstab und in der Vorgehensweise der Reinigung von His-FLAG-DFF45 über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

2.4.4 Reinigung von GST-Importin α Varianten

Auch die Reinigung der N-terminal mit GST fusionierten Varianten von Importin α wurde im Maßstab einer 500 ml *E. coli*-Kultur über Glutathion Sepharose durchgeführt. Da Importin α gegenüber Abbau durch Proteasen sehr empfindlich ist, war es wichtig, alle Puffer mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), einem unspezifischen Protease-Inhibitor, zu versetzen. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 5 mg/ml Lysozym. Das Enzym Lysozym ist in der Lage β -1,4-glykosidische Bindungen in den Zuckerketten des Peptidoglykangerüsts der Bakterienzellwand zu spalten und auf diese Weise die Zellwände von *E. coli* zu zerstören. Diese Weise des Zellaufschlusses eignete sich besonders für die Reinigung von Importin α , da sie für das Protein schonend war und Fragmentierung des Proteins verhinderte. Die Lagerung von Importin α Varianten erfolgte aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau bei -80°C . Zuvor wurden die aliquotierten Proteinpräparationen in flüssigem N_2 schockartig eingefroren.

2.5 Expression und Reinigung von Proteinen in eukaryontischen Zellen

2.5.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten eukaryontischen Zellen handelte es sich um Zelllinien, die adhären als Monolayer in beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert wurden. Dabei wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 10% fötalem Kälberserum versetzt und 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch verwendet.

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten wurden, sie alle 2-3 Tage verdünnt und auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

Um Kontaminationen mit Pilzen und Bakterien zu verhindern, musste die Arbeit in der Zellkultur unter absolut sterilen Bedingungen und mit sterilem Arbeitsmaterial durchgeführt werden.

2.5.2 Verwendung eukaryontischer Zelllinien

Folgende eukaryontische Zelllinien kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

Tabelle 2.13: eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Ursprung/allgemeine Informationen	Verwendung
HEK 293	Humane embryonale Nierenzelle mit DNA-Anteilen des humanen Adenovirus	Expression von DFF45 und Importin α -Varianten für Ko-Immunopräzipitationsexperimente
HeLa	Humane Epithel-Zellen eines Cervixcarcinoms	Expression von EGFP- bzw. DsRedMonomer-Fusionen von DFF-Untereinheiten zur Untersuchung der Lokalisation durch Fluoreszenzmikroskopie

2.5.3 DNA-Transfektion von eukaryontischen Zellen

Der DNA-Transfer in Säugerzellen wurde, je nach Zelltyp, mit verschiedenen Transfektionsreagenzien durchgeführt, die im Folgenden aufgelistet sind.

Tabelle 2.14: Transfektionsreagenzien für eukaryontische Zellen

Transfektionsreagenz	Hersteller	Allgemeine Informationen	Anwendung
TransFast™	Promega	TransFast™ enthält synthetische kationische und neutrale Lipide, die kolloidale Partikel aus Lipiddoppelschichten bilden (Liposomen). Inkubation mit Nukleinsäuren führt zum Einschluss dieser in die Liposomen, dadurch wird die negative Ladung der DNA neutralisiert. Der Eintritt der Liposomen-Komplexe in die Zelle geschieht durch Endocytose oder Verschmelzung der Liposomen mit der Plasmamembran.	Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA

PolyFect	Qiagen	Komplexe aus PolyFect und DNA weisen eine positive Nettoladung auf und können daher an negativ geladene Rezeptoren in der Zelloberfläche binden. Innerhalb der Zelle ist der pH-Wert des PolyFect-Puffers in der Lage, lysosomale Nukleasen zu inhibieren.	Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA
----------	--------	--	--

2.5.4 Herstellung von Proteinen in eukaryontischen Zellen

2.5.4.1 Herstellung von Proteinen in HeLa-Zellen

In HeLa-Zellen erfolgte die Expression von EGFP- bzw. DsRed-Monomer-Fusionsproteinen zur Untersuchung der Lokalisation durch Fluoreszenzmikroskopie. Dies wurde in *six-well cell culture tissue plates* durchgeführt. Transfiziert wurde dafür eine Gesamtmenge von 2-3 µg Plasmid-DNA. Wurde eine Ko-Transfektion von DFF40 und DFF45 durchgeführt, wurde der Inhibitor im 3-fachen Überschuss über die Nuklease eingesetzt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde 24 h nach der Transfektion der DNA durchgeführt.

2.5.4.2 Herstellung von Proteinen in HEK293-Zellen

Für Ko-Immunopräzipitationsexperimente erfolgte eine Ko-Expression von Genen für FLAG-DFF45wt bzw. FLAG-DFF45ΔNLS mit HA-Importin α-Varianten in HEK293 Zellen in Gewebekulturschalen (ø 10 cm). Es wurde eine Gesamtmenge Plasmid-DNA von 8 µg transfiziert, wobei FLAG-DFF45 im 3-fachen Überschuss über HA-Importin α eingesetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen in 400 µl CellLytic M (Sigma), einem Zellaufschluss-Reagenz speziell für eukaryontische Zellen, geerntet.

2.6 Charakterisierung von Proteinen

2.6.1 Mikroskopische Untersuchungen von Proteinen

Die Untersuchung des Kerntransportes von NLS-Mutanten von DsRed-Monomer-DFF45 und EGFP-CAD wurde mit Hilfe eines Zeiss (*Germany*) Axiophot Fluoreszenzmikroskops durchgeführt, welches vom Institut für Genetik der Justus-Liebig-Universität zur Verfügung

gestellt wurde. Das Mikroskop verfügte über eine Kamera, mit welcher Ausschnittbilder der Zellen zur Dokumentation des Experiments gemacht wurden.

Um statistische Aussagen treffen zu können, wurde die Lokalisation der NLS-Mutanten von DsRed-Monomer-DFF45 oder EGFP-CAD in mindestens 100 Zellen pro Experiment untersucht und dokumentiert.

2.6.1.1 Zellkern-Färbung transfizierter Zellen

Um den Zellkern unter dem Fluoreszenzmikroskop klar vom Cytoplasma der Zelle unterscheiden zu können, wurde die DNA gefärbt. Dazu wurde der kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoff Höchst 33342 benutzt, der aufgrund seines lipophilen Charakters intakte Zellmembranen durchqueren kann und im Zellkern an die kleine Furche der DNA bindet. Der Farbstoff kann bei 350 nm angeregt werden und emittiert blau fluoreszierendes Licht bei 461 nm. Der Farbstoff wurde direkt in das DMEM gegeben, kurz inkubiert und schließlich zusammen mit dem Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und zum Mikroskopieren mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) bedeckt.

2.6.2 Ko-Immunopräzipitationsexperimente

Nach 48 h Ko-Expression von pCI-FLAG-DFF45-Wildtyp bzw. pCI-FLAG-DFF45 Δ NLS mit pCI-HA-Importin α 1, α 3 oder α 5 in HEK293 (\varnothing 10 cm Gewebekulturschalen) wurden die Zellen in 400 μ l CelLytic M (Sigma) geerntet. Der Aufschluss erfolgte durch Inkubation der Zellen im CelLytic M bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Proteine befanden sich nach diesem Schritt im Überstand. Dieser wurde auf 50 μ l *EZview™ Red ANTI-HA® M2 Affinity Gel* gegeben und über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Um unspezifische Bindungen von Proteinen zu entfernen, erfolgten drei Waschschrte mit 400 μ l CelLytic M für 10 Minuten.

Danach wurden die *beads* aufgeteilt und auf zwei SDS-Gele aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine durch Western *blot* auf zwei PVDF-Membranen übertragen. Eine Membran wurde mit α -HA-Antikörpern, die andere Membran mit α -FLAG-Antikörpern inkubiert.

2.6.3 GST- *pull-down*-Experimente

Mit Hilfe von GST-*pull-down*-Experimenten wurde die Bindung von DFF an den Importin α /Importin β -Komplex untersucht.

Im Allgemeinen wurde dabei folgendermaßen verfahren:

DFF bzw. die Untereinheiten von DFF wurden im 2-3 fachen Überschuss über die verschiedenen Varianten von GST-Importin α eingesetzt. His-Importin β wurde äquimolar zu Importin α verwendet. Der GST-*pull-down* wurde in einem physiologischen Bindepuffer durchgeführt. Dieser wurde als 10 x Puffer hergestellt und 1:10 im Ansatz verdünnt.

10 x Bindepuffer: 200 mM HEPES, 20 mM MgAc, 1,1 M KAc, 50 mM NaAc, 10 mM EGTA, 10 mM DTT

Die Proteine wurden im Bindepuffer zusammen mit Glutathion-Sepharose über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungen durch dreimaliges Waschen mit 1 x Bindepuffer entfernt. Im Anschluss erfolgte eine Elution der an Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine mit Elutionspuffer, der 20 mM Glutathion enthielt. Ein Drittel der Eluate wurde durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Charakterisierung der Proteine erfolgte durch Gelfärbung mit Coomassie® *Brilliant blue* und durch Western *blot*.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten von DFF

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass beide Untereinheiten des DFF-Komplexes ein Kernlokalisierungssignal am C-Terminus beinhalten^{25,88}. In der C-terminalen Sequenz beider Proteine befinden sich Anhäufungen basischer Aminosäurereste. Diese sind charakteristisch für klassische Kernlokalisierungssignale. Durch Fusion der C-Termini von DFF45_(AS 306-331) bzw. CAD_(AS 326-344) an EGFP (*Enhanced Green Fluoreszenz Protein*) konnte eine Kernlokalisation des sonst diffus in der kompletten Zelle verteilten EGFP erreicht werden. Die Deletion der C-terminalen Sequenzen der DFF-Untereinheiten bewirkte eine Akkumulation der Proteine im Cytosol von HeLa-Zellen. Allerdings wurden im Rahmen dieser Arbeiten noch keine Untersuchungen zur Bedeutung einzelner basischer Aminosäurereste bezüglich des Kerntransportes durchgeführt. Aufgrund der Konsensus-Sequenz des Kernlokalisierungssignals am C-Terminus von DFF45/ICAD-L wurde angenommen, dass es sich um ein klassisches, zweiteiliges NLS handelt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Kernlokalisierungssignale beider Untereinheiten des DFF-Komplexes genau zu charakterisieren, um eine Klassifizierung in einteilig bzw. zweiteilig vornehmen zu können. Fluoreszenzmikroskopische Experimente mit Varianten von DFF40 und DFF45 mit Mutationen in der vermuteten Kernlokalisationssequenz wurden in diesem Labor bereits durchgeführt⁹⁰. Dazu wurden EGFP- bzw. DsRedMonomer-Fusionsproteine von DFF40 und DFF45 generiert, deren basische Aminosäurereste im C-Terminus gegen Alanin ausgetauscht wurden. Durch Expression in HeLa-Zellen und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung, konnte die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste für den Kerntransport der Proteine ermittelt werden.

3.1.1 Charakterisierung der Kernlokalisationssequenz der Nuklease CAD

3.1.1.1 Auswahl und Klonierung der Kernlokalisationssequenzmutanten von CAD

Betrachtet man den C-Terminus der humanen Nuklease DFF40, fallen zwei Ansammlungen basischer Aminosäurereste auf (siehe Abb. 3-1).

Eine detaillierte Untersuchung der Kernlokalisationssequenz von DFF40 ergab, dass nur das erste Cluster für die Kernlokalisation wichtige Aminosäurereste beinhaltet⁹⁰. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei DFF40 um ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal handelt. Allerdings entspricht die Konsensussequenz des NLS von DFF40 ebenfalls nicht der, eines klassischen einteiligen Kernlokalisierungssignals⁹⁷.

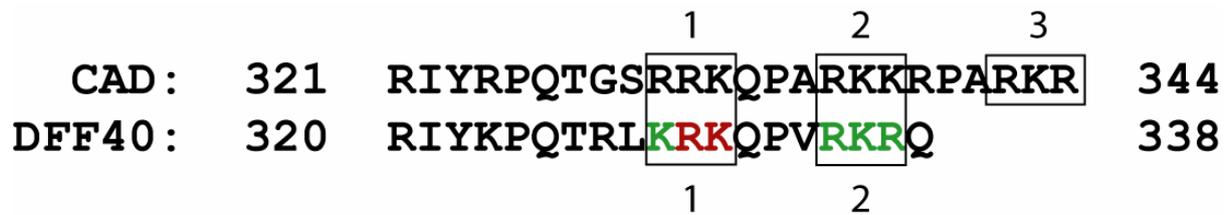


Abb. 3-1: Kernlokalisationssequenzen von CAD/DFF40: Gezeigt sind die C-Termini der humanen Nuklease DFF40 und der murinen Form der Nuklease, CAD. Die Cluster basischer Aminosäurereste sind mit Rahmen gekennzeichnet und nummeriert. Für den Kerntransport bedeutende Aminosäurereste sind rot dargestellt, unbedeutende in grün. Durch detaillierte Mutationsanalysen einzelner basischen Aminosäurereste von DFF40 konnte gezeigt werden, dass Cluster 2 für den Kerntransport keine Relevanz hat. Zusätzlich zu den homologen Clustern 1 und 2 befindet sich in CAD noch eine weitere Ansammlung basischer Aminosäurereste.

CAD beinhaltet neben den zu DFF40 homologen Clustern 1 und 2 noch ein weiteres Cluster basischer Aminosäurereste am C-Terminus. Zu Beginn dieser Arbeit existierten noch keine Informationen über die Bedeutung der homologen Cluster, sowie des zusätzlichen Clusters in CAD. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit C-terminale Deletionsmutanten von CAD als EGFP-Fusionen generiert. Dabei wurden schrittweise alle drei Cluster basischer Aminosäurereste deletiert, bis hin zur Deletion der C-terminalen Aminosäurereste 321 bis 344. Die Deletionen der einzelnen Varianten sind in Abbildung 3-2 dargestellt.

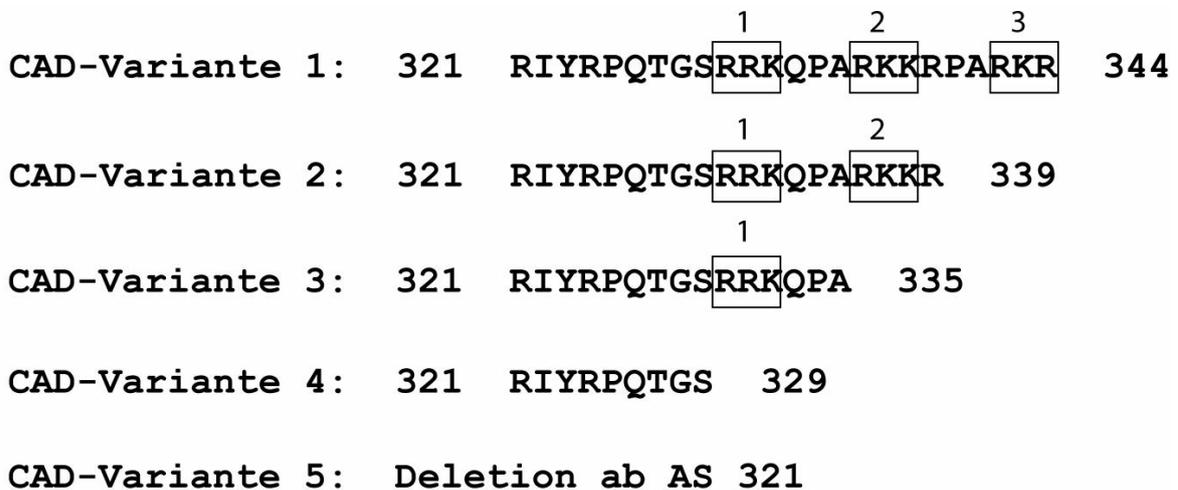


Abb. 3-2: C-terminale Deletionsvarianten der Nuklease CAD: Gezeigt ist der C-Terminus von CAD mit den entsprechenden Deletionen der Cluster basischer Aminosäurereste. Die Cluster sind durch Einrahmungen gekennzeichnet und nummeriert. Variante 1 stellt die Wildtypsequenz des C-Terminus von CAD dar. Die Deletion der Variante 5 geht über den Bereich der drei Cluster hinaus. Bei dieser Variante wurde der komplette C-Terminus, in dem ein NLS vermutet wurde, deletiert.

Da die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der CAD-Varianten in HeLa-Zellen stattfinden sollte, wurden die entsprechenden cDNA-Varianten von CAD mit Hilfe des eukaryontischen Vektors pEGFP-C1 kloniert und auf diese Weise mit einem N-terminalen

EGFP-tag versehen. Als Quelle für die cDNA-Sequenz von CAD wurde der prokaryontische Expressionsvektor pGEX-2T-mCAD benutzt⁹⁸. Die zur Klonierung eingesetzten Restriktionsenzyme sind unter 2.1.4 beschrieben.

3.1.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der EGFP-CAD-Varianten in HeLa-Zellen

Entgegen der anfänglichen Annahme, dass die Nuklease CAD/DFF40 erst nach der Entlassung aus dem DFF-Komplex durch Spaltung des Inhibitors ICAD/DFF45 durch Caspase-3 aus dem Cytosol in den Kern transportiert wird, ist inzwischen bekannt, dass der DFF-Komplex auch in nicht-apoptotischen Zellen im Kern lokalisiert ist^{25,27,88}.

Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Lokalisation der EGFP-CAD-Varianten durch Fluoreszenzmikroskopie eine gute Methode, um Rückschlüsse auf die Bedeutung der verschiedenen Cluster basischer Aminosäurereste im C-Terminus von CAD für den Kerntransport der Nuklease zu ziehen.

Die Mikroskopie wurde 24 h nach der Transfektion durchgeführt. Um den Zellkern optisch vom Cytoplasma abzuheben, erfolgte eine Kernfärbung mit dem Farbstoff Höchst 33342. Die Überexpression von CAD ohne die inhibitorische Untereinheit des DFF-Komplexes, die gleichzeitig ein Chaperon für die Nuklease darstellt, führt zur Aggregation von CAD in der kompletten Zelle. Aus diesem Grund wurde eine Kotransfektion von EGFP-CAD mit DsRedMonomer-DFF45 durchgeführt.

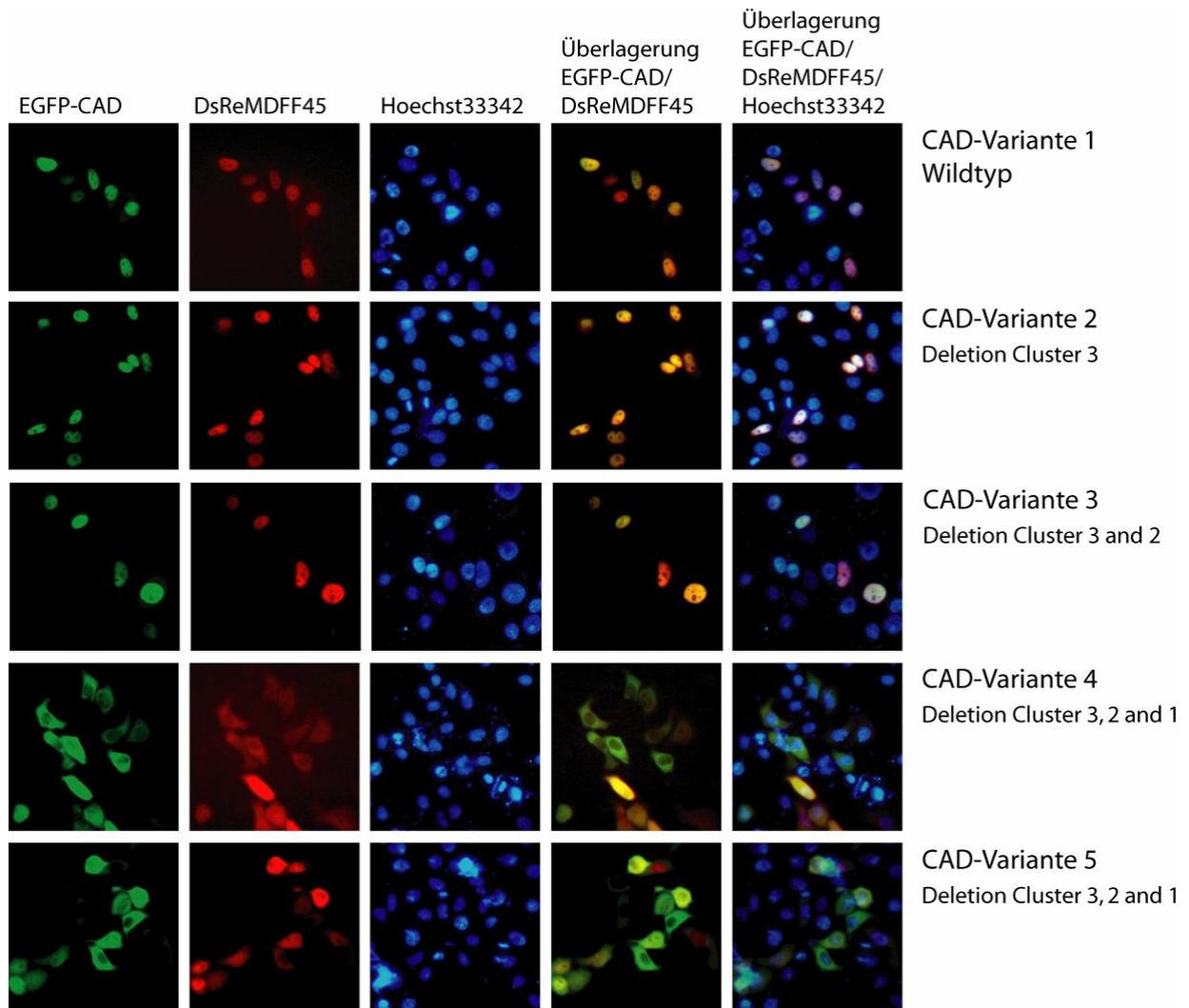


Abb. 3-3: Fluoreszenzmikroskopie von EGFP-CAD-Deletionsvarianten exprimiert in transient transfizierten HeLa-Zellen: Gezeigt ist die intrazelluläre Verteilung von EGFP-CAD-Deletionsvarianten in HeLa-Zellen 24 h nach der Transfektion mit entsprechenden Vektoren (pEGFP-C1-CAD-Deletionsmutanten und pCl-DsRedMonomer-DFF45 Wildtyp). Die Übereinanderlagerung der Fluoreszenz von EGFP-CAD (erste Spalte) und DsRedMonomer-DFF45 (zweite Spalte) zeigt eine deutlich Kollokalisierung von CAD-Variante 1-4 mit dem DFF45 Wildtyp. Im Fall der CAD-Variante 5, die die größte Deletion aufweist, kommt es teilweise zu einer Trennung der beiden Untereinheiten des DFF-Komplexes. Deutlich zu erkennen ist die Kernlokalisation der Varianten 1-3, Variante 4 und 5 hingegen sind im Cytoplasma lokalisiert.

Wie in Abbildung 3-3 zu erkennen ist, wurde eine Kollokalisierung von EGFP-CAD-Variante 1-4 und DsRedMonomer-DFF45 festgestellt. Bei Variante 5, die die größte C-terminale Deletion von Aminosäurerest 312-338, über die Cluster basischer Aminosäuren hinaus, aufweist, erkennt man, dass sich die Untereinheiten von DFF voneinander trennten, ein nukleärer Kotransport demnach gestört war. DsRedMonomer-DFF45 Wildtyp war im Zellkern zu finden, während EGFP-CAD-Variante 5 im Cytosol lokalisiert war. Des Weiteren ist deutlich zu erkennen, dass die EGFP-CAD-Varianten 2 und 3 (Deletionen von Cluster 3 bzw. Cluster 2 und 3) vergleichbar mit Wildtyp EGFP-CAD (Variante 1) im Kern lokalisiert waren. EGFP-CAD-Variante 4 und 5 hingegen waren zum größten Teil cytoplasmatisch lokalisiert.

Im Zuge der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde eine statistische Auswertung der Lokalisation der EGFP-CAD-Varianten zusammen mit DsRedMonomer-DFF45-Wildtyp durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden pro Variante mindestens 100 Zellen, in denen eine Expression der Gene für beide Untereinheiten von DFF erfolgte, auf die Lokalisation hin ausgewertet. Die zusammenfassende Statistik ist in Abbildung 3-4 dargestellt und spiegelt die oben beschriebenen Ergebnisse wider.

Lokalisation EGFP-CAD-Varianten und DsRedMonomer-DFF45 Wildtyp in HeLa-Zellen

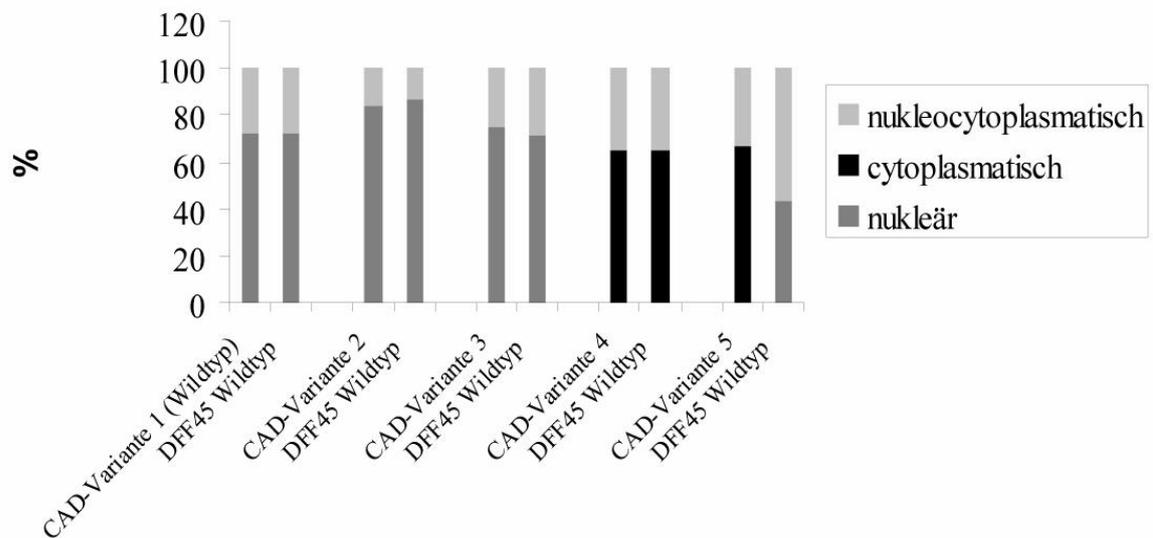


Abb. 3-4: Statistische Auswertung der Lokalisation der EGFP-CAD-Deletionsvarianten und DsRedMonomer-DFF45 Wildtyp in HeLa-Zellen: Es wurden pro zu untersuchender EGFP-CAD-Variante mindestens 100 Zellen auf die Lokalisation beider Untereinheiten von DFF hin ausgewertet. Dabei wurde zwischen ausschließlich nukleärer, ausschließlich cytoplasmatischer und nukleocytoplasmatischer Lokalisation unterschieden. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm dargestellt. EGFP-CAD-Varianten 1-4 und DsRedMonomer-DFF45 Wildtyp zeigten Kolo­kalisierung, während sich EGFP-CAD-Variante 5 und DsRedMonomer-DFF45 Wildtyp voneinander trennten. Die EGFP-CAD-Varianten 1, 2 und 3 sind zum größten Teil im Kern der HeLa-Zellen lokalisiert, die EGFP-CAD-Varianten 4 und 5 befinden sich mehrheitlich im Cytoplasma.

3.1.1.3 Bedeutung der Cluster basischer Aminosäurereste im C-Terminus von CAD im Vergleich mit DFF40

Aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Deletionsmutanten von EGFP-CAD lässt sich vermuten, dass, wie bei DFF40, nur Cluster 1 basische Aminosäurereste beinhaltet, welche für den Kerntransport von Bedeutung sind. Dafür spricht, dass die Deletion von Cluster 2 und 3 keinerlei Einfluss auf die Kernlokalisation von CAD hat, die bei diesen Varianten mit der des CAD Wildtyps vergleichbar ist. Erst die Deletion von Cluster 1

bewirkte eine weitgehende Verschiebung der Lokalisation von CAD vom Kern in das Cytoplasma der HeLa-Zellen. Dieses Ergebnis stimmt mit denen für die humane Nuklease DFF40 überein (siehe Abb. 3-5).

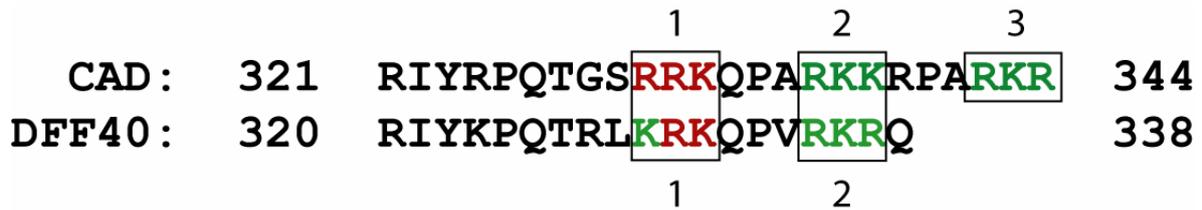


Abb. 3-5: Kernlokalisationssequenzen von CAD/DFF40: Gezeigt sind die C-Termini der humanen Nuklease DFF40 und der murinen Form der Nuklease CAD. Durch Fluoreszenzmikroskopie der EGFP-CAD-Varianten konnte gezeigt werden, dass, homolog zur humanen Nuklease DFF40, Cluster 1 für den Kerntransport von CAD von Bedeutung ist. Weder Cluster 2 noch das zusätzliche dritte C-terminale Cluster in CAD sind wichtig für die Kernlokalisierung der murinen Nuklease. Da nur Deletionsvarianten untersucht wurden kann über den Einfluss einzelner Aminosäurereste in CAD keine Aussage getroffen werden. Allerdings wurde durch Austausch einzelner Aminosäurereste in DFF40 gezeigt, dass nur zwei der drei basischen Reste tatsächlich für einen effektiven Kerntransport benötigt werden.

3.1.2 Charakterisierung der Kernlokalisationssequenz des Inhibitors ICAD-L/DFF45

3.1.2.1 Auswahl und Klonierung der Kernlokalisationssequenzmutanten von ICAD-L/DFF45

Der C-terminale Bereich des humanen Inhibitors DFF45 weist ebenso wie das homologe Protein der Maus, ICAD-L, zwei Ansammlungen basischer Aminosäurereste auf. Diese sind, wie bei einem klassischen zweiteiligen Kernlokalisierungssignal, durch zehn nicht-basische Aminosäurereste voneinander getrennt (siehe Abb. 3-6), was zu der Annahme führte, dass es sich bei DFF45/ICAD-L auch um ein solches handelt.



Abb. 3-6: Kernlokalisationssequenzen von ICAD-L/DFF45: Gezeigt sind die C-Termini des humanen Inhibitors DFF45 und der murinen Form ICAD-L. Detaillierte Untersuchungen anhand von Austauschen einzelner basischer Aminosäurereste ergaben, dass in DFF45 nur in Cluster 2 für den Kerntransport wichtige Aminosäurereste zu finden sind.

Anhand von Mutationsanalysen der basischen Aminosäurereste in der Kernlokalisationssequenz von DFF45 und anschließenden fluoreszenzmikroskopischen

Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle basischen Aminosäurereste in Cluster 2 im Kerntransport eine Rolle spielen, während das Lysin in Cluster 1 keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung hat⁹⁰. Die Annahme, dass DFF45 ein zweiteiliges NLS besitzt, konnte somit widerlegt werden.

Um diese Ergebnisse auch für ICAD-L zu bestätigen, wurde eine DsRedMonomer-fusionierte Variante hergestellt, in der beide Arginin-Reste in Cluster 1 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Des Weiteren wurde eine DsRedMonomer-Variante von DFF45 generiert, in der das Serin in Cluster 1 gegen Alanin ausgetauscht wurde, sowie eine Doppelaustauschmutante DFF45^{S312A/K313A}. Zwar gehört Serin nicht zu den basischen Aminosäureresten, die charakteristisch für Kernlokalisierungssignale sind, allerdings ist das Serin³¹² in DFF45 homolog zum basischen Arginin³¹² in ICAD-L und sollte aus diesem Grund ebenfalls auf die Bedeutung für den Kerntransport hin untersucht werden.



Abb. 3-7: Varianten von ICAD-L und DFF45 mit Austausch basischer Aminosäurereste in Cluster 1: Gezeigt sind die C-Termini von ICAD-L und DFF45. Aminosäurereste, die gegen Alanin ausgetauscht wurden, sind orange gekennzeichnet. Die Mutationen wurden in Cluster 1 vorgenommen, da dieses als potentieller Teil eines klassischen zweiteiligen Kernlokalisierungssignals erschien.

Da die Analyse der Varianten von ICAD-L und DFF45 durch Expression und anschließender Untersuchung der Lokalisation durch Fluoreszenzmikroskopie in HeLa-Zellen erfolgte, sollten die Proteine mit einer N-terminalen Fusion von DsRedMonomer versehen werden. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz von ICAD-L an pRSETb-ICAD-L⁹⁹ amplifiziert und mit Hilfe des Vektors pCI-DsRedMonomer kloniert. Die Mutagenese wurde schließlich an diesem Plasmid durchgeführt. Als *template* für die Mutagenese von DFF45 wurde der Vektor pCI-DsRedMonomer-DFF45 eingesetzt.

3.1.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der DsRedMonomer-DFF45/ICAD-L-Varianten in HeLa-Zellen

Um das Lokalisationsverhalten der einzelnen Varianten von DFF45 und ICAD-L und somit die Bedeutung des ersten Clusters basischer Aminosäuren für den Kerntransport untersuchen zu können, erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Verteilung dieser Varianten nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen.

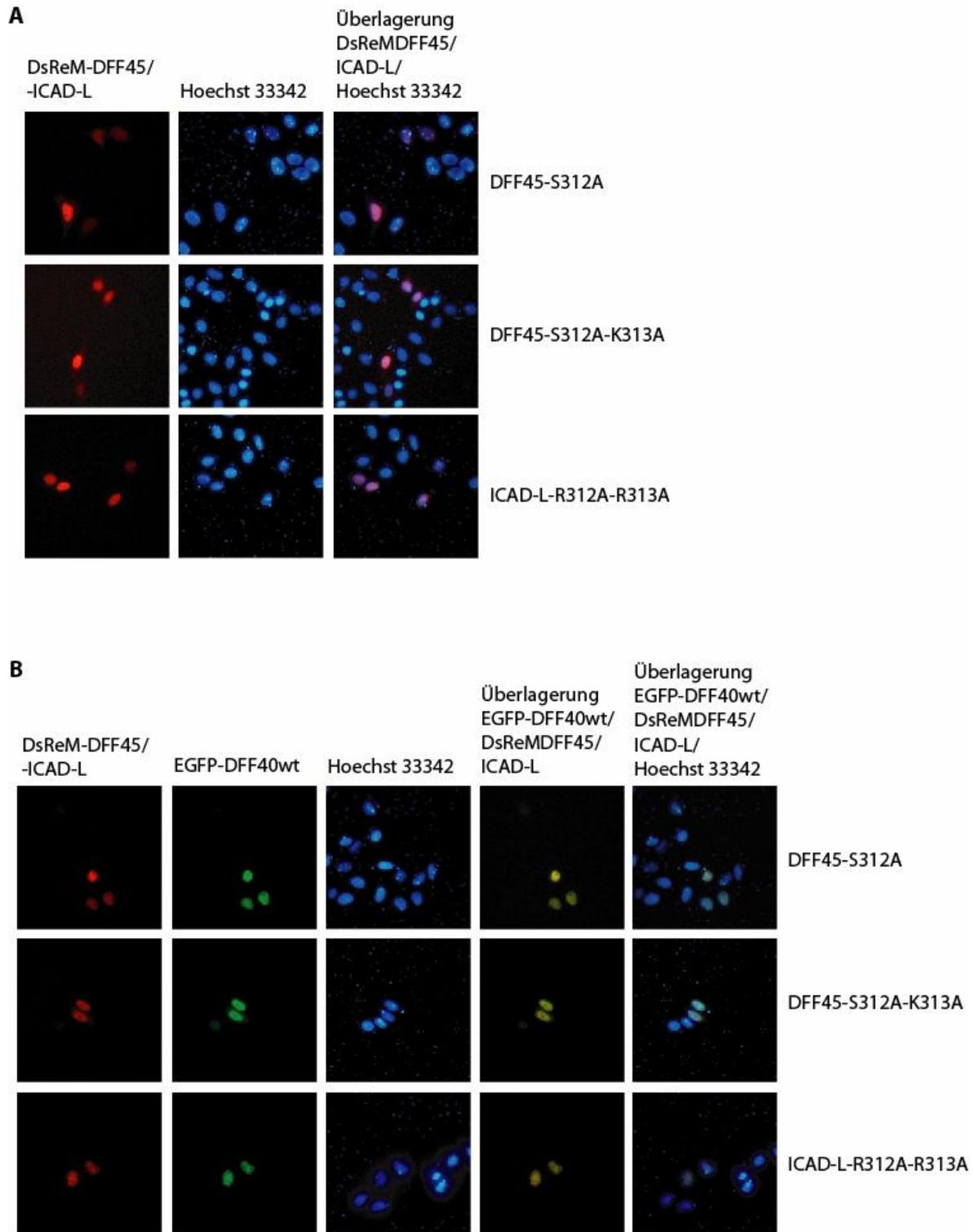


Abb. 3-8: Fluoreszenzmikroskopie der DsRedMonomer-DFF45/-ICAD-L-Varianten nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen: Gezeigt sind HeLa-Zellen 24h nach der Transfektion mit pCI-DsRedMonomer-DFF45/-ICAD-L zusammen mit pCI-EGFP-DFF40 Wildtyp (**A**) und ohne Kotransfektion der Nuklease (**B**). Es ist deutlich zu erkennen, dass alle Varianten von DFF45 und ICAD-L im Zellkern lokalisiert sind. Wurde die Nuklease EGFP-DFF40 kotransfiziert, konnte eine Kolo-kalisation von EGFP-DFF40 und DsRedMonomer-DFF45/-ICAD-L Varianten im Zellkern festgestellt werden (vierte und fünfte Spalte: Übereinanderlagerung der roten und grünen Fluoreszenz, sowie der Kernfärbung).

Wie in Abb. 3-8 deutlich zu erkennen ist, sind alle Varianten von DsRedMonomer-DFF45/ICAD-L ausschließlich im Zellkern lokalisiert.

Dieses Ergebnis konnte auch anhand einer statistischen Zählung belegt werden. Pro Experiment wurden dabei wieder 100 Zellen auf die Lokalisation der DsRedMonomer-DFF45/ICAD-L-Varianten hin untersucht. Abb. 3-9 zeigt das Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

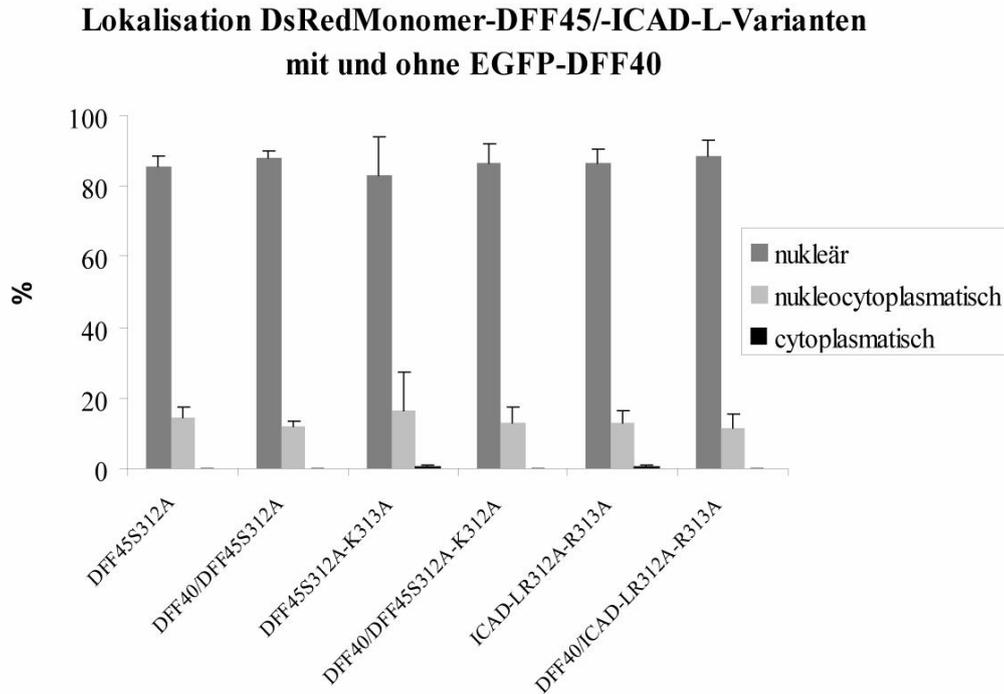


Abb. 3-9: Statistische Auswertung der Lokalisation der DsRedMonomer-DFF45/ICAD-L-Varianten in HeLa-Zellen: Gezeigt ist die Auswertung drei unabhängiger Zählungen von je 100 Zellen bezüglich der Lokalisation der DFF45/ICAD-L-Varianten, dargestellt als Balkendiagramm. Die Lokalisation der Varianten des Inhibitors mit und ohne Nuklease ist jeweils nebeneinander dargestellt. Eine Kernlokalisation aller Varianten ist deutlich zu erkennen.

3.1.2.3 Bedeutung der Cluster basischer Aminosäurereste im C-Terminus von DFF45/ICAD-L

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigt, dass das erste Cluster basischer Aminosäurereste keine Bedeutung für den Kerntransport hat. Der Austausch dieser Aminosäurereste zu Alanin hat keinen Einfluss auf die Kernlokalisation der Proteine. Die Konsensussequenz von Cluster 2 entspricht somit der eines klassisch einteiligen Kernlokalisationssignals.



Abb. 3-10: Kernlokalisationssequenzen von ICAD-L/DFF45: Gezeigt sind die C-Termini des humanen Inhibitors DFF45 und der murinen Form ICAD-L. Sowohl in DFF45 als auch in ICAD-L sind die basischen Aminosäurereste in Cluster 1 für den Kerntransport ohne Bedeutung. Über die Beteiligung einzelner Aminosäurereste in Cluster 2 von ICAD-L kann anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente keine Aussage getroffen werden, allerdings lässt die Homologie zu DFF45 darauf schließen, dass alle basischen Aminosäurereste in diesem Cluster für den Kerntransport bedeutend sind.

3.2 Charakterisierung des Kerntransportes von DFF durch Importine

3.2.1 Auswahl und Klonierung der Importin α -Varianten

Das Vorhandensein von Kernlokalisierungssignalen im C-Terminus der DFF-Untereinheiten wurde bereits 1998 und 2000 gezeigt und konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt und genauer charakterisiert werden^{25,88}. Der Kerntransport von Proteinen mit klassischen Kernlokalisierungssignalen wird von Rezeptorproteinen, den Importinen, durchgeführt¹⁰⁰. Aus diesem Grund wurde die Vermutung angestellt, dass Importine ebenfalls für den Kerntransport des DFF-Komplexes verantwortlich sind.

Die Familie der α -Importine gliedert sich in drei Subfamilien, die unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen. Aus jeder Unterfamilie wurde exemplarisch eine Importin α Variante ausgewählt, um die potentielle Bindung an DFF zu untersuchen. Dankenswerterweise wurden die Plasmide zur Expression der Importin α -Varianten als GST-Fusionen in *E. coli* von Prof. Dr. Julkunen (National Public Health Institute, Helsinki) zur Verfügung gestellt¹⁰¹.

Für die Expression der Importin α Varianten in eukaryontischen Zellen wurde die DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR vervielfältigt und dabei mit der kodierenden Sequenz für einen N-terminalen Hämagglutinin (HA)-Epitop-*tag* versehen. Die Klonierung erfolgte unter Verwendung des eukaryontischen Expressionsvektor pCI. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind unter 2.1.4 beschrieben.

Tabelle 3.1: Mitglieder der Importin α Unterfamilien und Auswahl der Varianten

Importin α Unterfamilie	Importin α Varianten	Importin α Expressionskonstrukte
1; Rch1-like subfamily	*Importin α 1	<ul style="list-style-type: none"> • GST-Importin α 1 zur Expression in <i>E. coli</i> • HA-Importin α 1 zur Expression in Säugerzellen
2; Qip1-like subfamily	*Importin α 3 Importin α 4	<ul style="list-style-type: none"> • GST-Importin α 3 zur Expression in <i>E. coli</i> • HA-Importin α 3 zur Expression in Säugerzellen
3; SRP1-like subfamily	*Importin α 5 Importin α 6 Importin α 7	<ul style="list-style-type: none"> • GST-Importin α 5 zur Expression in <i>E. coli</i> • HA-Importin α 5 zur Expression in Säugerzellen

* Importin α Varianten, die bezüglich der Bindung von DFF getestet wurden

3.2.2 Bindung von DFF45 an verschiedene Importin α -Varianten

Beim klassischen, NLS-vermittelten Kerntransport von Proteinen bindet das Cargo-Protein an das Adapterprotein Importin α . Importin α wiederum interagiert mit Importin β , welches den Durchtritt durch den *nuclear pore complex* vermittelt. Um zu untersuchen, ob der Kerntransport von DFF durch den Importin α/β -Komplex vermittelt wird, wurden Bindungsexperimente mit ausgewählten Varianten der Importin α Subfamilie und Untereinheiten des DFF-Komplexes durchgeführt.

3.2.2.1 GST-pulldown-Experimente mit DFF45 Wildtyp/DFF45 Δ NLS und Importin α 1, α 3 und α 5 produziert in *E. coli*

GST-pulldown Experimente wurden wie unter 2.6.3 beschrieben, durchgeführt. Zuerst wurde die inhibitorische Untereinheit des DFF-Komplexes, DFF45, auf Bindung an verschiedene Importin α Varianten getestet. Um zu zeigen, dass die Bindung spezifisch durch die Kernlokalisationssequenz vermittelt wird, wurde neben dem Wildtyp von His-FLAG-DFF45 auch eine Δ NLS-Variante von His-FLAG-DFF45 getestet, deren C-Terminus von Aminosäure 312 bis 331 deletiert war.

Der GST-pulldown wurde mit drei Importin α Varianten (Importin α 1, α 3, α 5) durchgeführt, stellvertretend für die drei Unterfamilien der Importine mit unterschiedlichen Substratspezifitäten (siehe Tab. 3.1). Die Bindung von Importin β an den Importin α -Cargo-Proteinkomplex sorgt für eine stärkere und spezifischere Bindung des Cargo-Proteins. Der GST-pulldown wurde sowohl mit den Importin α Varianten allein, als auch in Anwesenheit von Importin β durchgeführt, mit Ausnahme von Importin α 5. Bei dieser Variante war es aufgrund der geringen Konzentration von Importin α 5 nicht möglich, Importin β in den Ansatz zuzugeben.

Die Ergebnisse der GST-pulldown-Experimente sind in Abbildung 3-11 zusammengefasst.

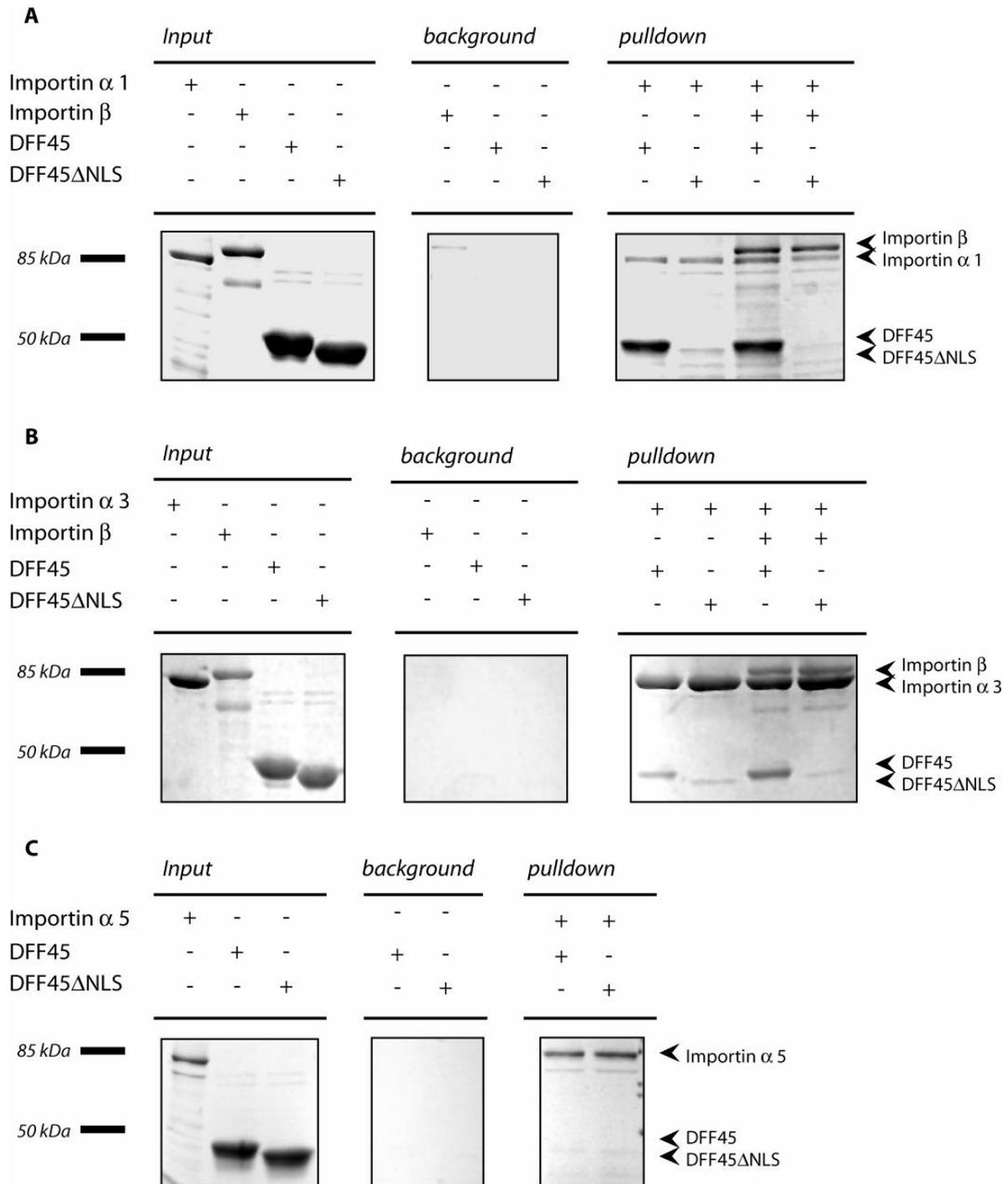


Abb. 3-11: GST-pulldown-Experiment mit verschiedenen Varianten von Importin α mit DFF45-Wildtyp und - Δ NLS: Gezeigt sind mit Coomassie gefärbte SDS-Trenngele nach Elektrophorese. Der *input* zeigt 10% der eingesetzten Proteinmenge, *background* zeigt die Menge His-FLAG-DFF45 Wildtyp, His-FLAG-DFF45 Δ NLS und His-Importin β , die unspezifisch an die Glutathion-Sepharose-Matrix bindet. Im *pulldown*-Experiment ist eine NLS-spezifische Bindung von DFF45 an Importin α 1 (A) und Importin α 3 (B) zu erkennen. Insbesondere bei Importin α 3 zeigte sich eine Verstärkung der Bindung von DFF45 Wildtyp durch die Anwesenheit von Importin β . Eine Bindung von DFF45 an Importin α 5 (C) konnte nicht festgestellt werden.

Im *GST-pulldown*-Experiment konnte gezeigt werden, dass DFF45 NLS-spezifisch an die Importin α Varianten 1 und 3 bindet, Importin α 5 zeigte keine Bindung von DFF45-Wildtyp oder der Δ NLS-Variante von DFF45. Im Falle von Importin α 3 konnte eine deutliche Verstärkung und Spezifizierung der Bindung von DFF45-Wildtyp durch die Anwesenheit von Importin β festgestellt werden.

3.2.2.2 Ko-Immunopräzipitation von DFF45-Wildtyp/DFF45 Δ NLS und Importin α 1, α 3 und α 5 koproduziert in HEK293-Zellen

Die Ko-Immunopräzipitationsexperimente mit HA-Importin α Varianten und FLAG-DFF45 Wildtyp und Δ NLS (Δ 313-331) aus HEK293-Zellen wurden, wie unter 2.6.2 beschrieben, durchgeführt. Getestet wurden die in Tabelle 3.1 angegebenen Importin α Varianten, die bereits im *GST-pulldown* als bakteriell produzierte GST-Fusionen untersucht wurden.

Die Immunopräzipitation wurde mit *EZview™ Red ANTI-HA® M2 Affinity Gel* durchgeführt. Die *beads* wurden nach mehrmaligem Waschen aufgeteilt und auf SDS-Gele aufgetragen, die im Anschluss an die Elektrophorese durch Western *blot* mit Antikörpern gegen das HA-Epitop der Importin α -Varianten und das FLAG-Epitop der DFF45-Varianten untersucht wurden. Abbildung 3-12 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Ko-Immunopräzipitation aller Varianten.

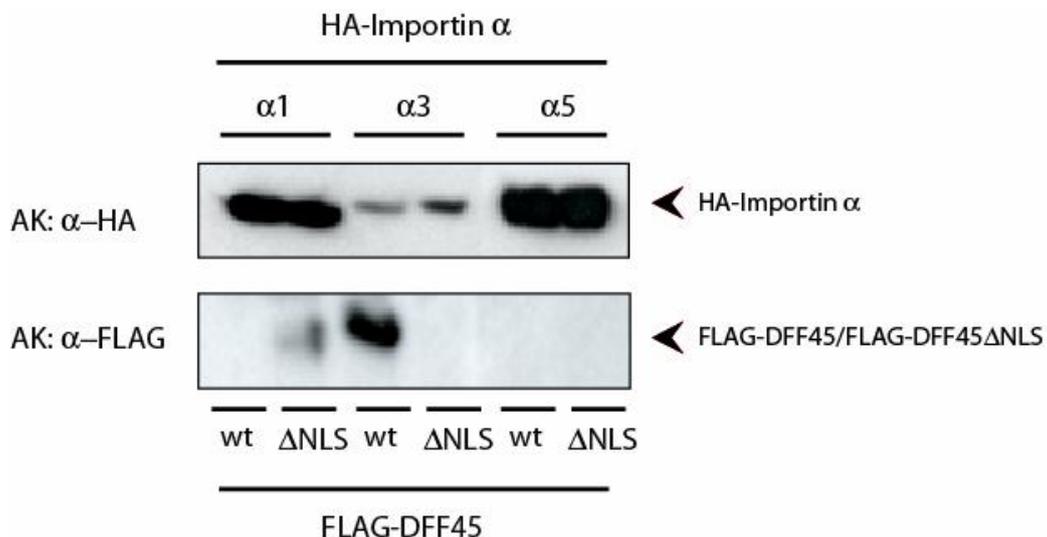


Abb. 3-12: Ko-Immunopräzipitation von HA-Importin α Varianten mit FLAG-DFF45-Wildtyp und Δ NLS, koproduziert in HEK293-Zellen: Dargestellt sind Western *blots* durchgeführt mit Antikörpern gegen HA- und FLAG-Epitope, fusioniert mit Importin α bzw. DFF45. Im Falle von Importin α 1 konnte keine Bindung von DFF45-Wildtyp, aber eine unspezifische Bindung von DFF45 Δ NLS festgestellt werden. Importin α 3 bindet DFF45-Wildtyp, nicht aber DFF45 Δ NLS, wie auch schon im *GST-pulldown*-Experiment gezeigt wurde. Ebenfalls dem *GST-pulldown* entsprechend wurde keine Bindung von DFF45 an Importin α 5 nachgewiesen.

Durch das Ko-Immunopräzipitationsexperiment von HA-Importin α -Varianten mit FLAG-DFF45-Wildtyp und Δ NLS konnte eine NLS-spezifische Bindung von DFF45 an Importin α 3 bestätigt werden. Wie bereits im GST-*pulldown*-Experiment, zeigte Importin α 5 keine Bindung von DFF45. Importin α 1 hingegen zeigte eine unspezifische Bindung von DFF45 Δ NLS.

3.2.3 Kompetitions-assay Importin α 1 und Importin α 3: GST-*pulldown*-Experiment mit DFF-Komplex und DFF45

Da sowohl Importin α 1, als auch Importin α 3 Bindung von DFF45 zeigten, wurde ein Kompetitions-assay durchgeführt, anhand dessen Rückschlüsse auf die Bindungspräferenz von DFF45 an die oben genannten Importin α Varianten gezogen werden konnte. In der Durchführung entsprach der GST-*pulldown* den Angaben unter 2.6.3. Neben GST-Importin α 3 wurde in einigen Ansätzen His-Importin α 1 im Überschuss zugegeben, so dass beide Importin α Varianten um die Bindung von DFF45 konkurrieren konnten. Durch mehrmaliges Waschen wurde His-Importin α 1 zusammen mit gebundenem DFF45, sowie ungebundener Inhibitor DFF45 entfernt.

Der Kompetitions-assay wurde ebenfalls mit DFF-Komplex durchgeführt. Die Reinigung von DFF ist unter 2.4.2 beschrieben. Durch die Thrombinspaltung, die den Elutionsschritt mit Glutathion ersetzte, wurde der GST-*tag* der Nuklease entfernt. Der DFF-Komplex setzt sich zusammen aus His-myc-DFF45/DFF40. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-13 gezeigt.

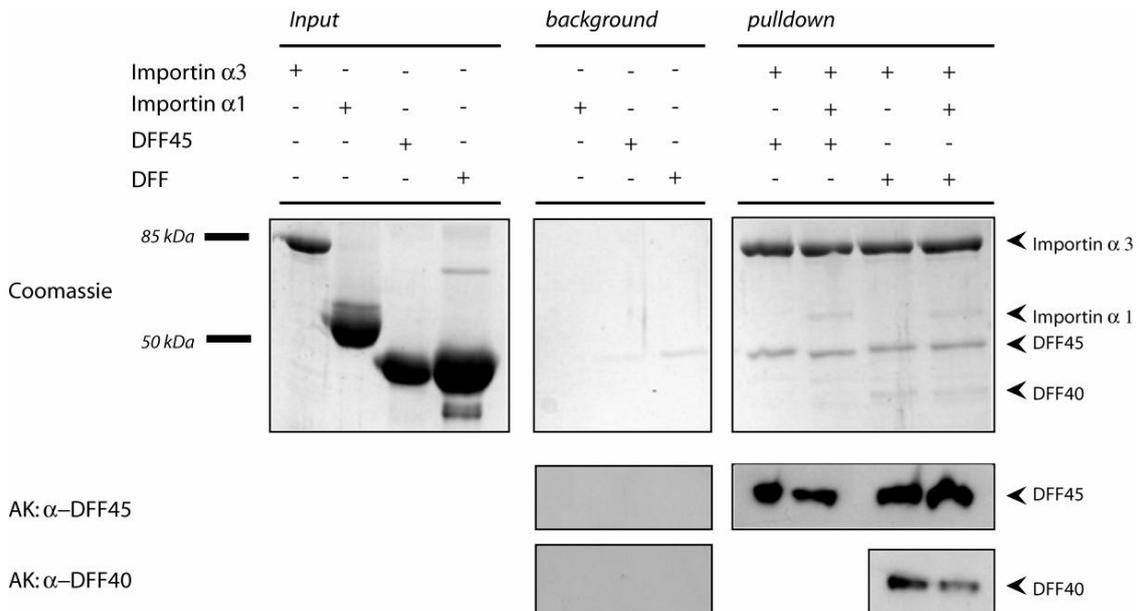


Abb. 3-13: Kompetitions-assay von Importin α 1 und Importin α 3; Konkurrenz um die Bindung von DFF45 und DFF: Gezeigt sind sowohl SDS-Trenngele nach Elektrophorese, mit Coomassie gefärbt, als auch Western blots mit Antikörpern gegen DFF45 und DFF40. Der *input* zeigt 10% der eingesetzten Proteinmenge, der *background* stellt unspezifische Bindungen von His-Importin α 1, His-Importin β , His-FLAG-DFF45 und His-myc-DFF45/DFF40 an die Glutathion-Sepharose-beads dar. Im *pulldown* zeigt sich, dass sowohl DFF45, als auch DFF-Komplex an GST-Importin α 3 allein bindet. Durch die Zugabe von His-Importin α 1 konnte keine Verringerung der Bindung von DFF45 und DFF-Komplex an GST-Importin α 3 beobachtet werden.

Wie in Abb. 3-13 deutlich zu erkennen ist, binden sowohl DFF45 als auch der DFF-Komplex an Importin α 3. Die Zugabe von His-Importin α 1 in äquimolarer Menge resultierte nicht in einer relativen Verringerung der Bindung von DFF45 und DFF an Importin α 3, was für eine Bindungspräferenz der Cargo-Proteine DFF45 und DFF an Importin α 3 gegenüber Importin α 1 spricht.

3.2.4 GST-pulldown-Experimente mit DFF- Δ NLS-Varianten und Importin α 3 Wildtyp

Da gezeigt werden konnte, dass DFF45 NLS-spezifisch an Importin α 3 bindet, die Importin α 3-Bindung durch Importin β verstärkt werden kann und im Kompetitions-assay mit Importin α 3 und Importin α 1 keine Präferenz für Importin α 1 festgestellt werden konnte, wurden die nachfolgenden Experimente mit Importin α 3 durchgeführt.

Um die Bindung des DFF-Komplexes an Importin α 3 genauer zu charakterisieren, wurden Varianten generiert, bei denen die Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten DFF45 und DFF40 systematisch entfernt wurden. Die verschiedenen Kombinationen sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Reinigung der DFF-Komplex-Varianten ist unter 2.4.2 beschrieben.

Tabelle 3.2: DFF- Δ NLS-Varianten, bakteriell produziert und im GST-*pulldown* mit Importin α 3 untersucht

DFF- Δ NLS-Varianten

DFF40 Wildtyp/His-myc-DFF45 Wildtyp

DFF40 Wildtyp/His-myc-DFF45 Δ 313-331

DFF40 Δ 323-338/His-myc-DFF45 Wildtyp

DFF40 Δ 323-338/His-myc-DFF45 Δ 313-331

Die Durchführung des GST-*pulldown*-Experiments entsprach den Angaben unter 2.6.3, allerdings war es bei diesem Experiment aufgrund der geringen Konzentration der DFF-Komplex-Varianten ebenfalls nicht möglich, Importin β zuzufügen. Abbildung 3-14 zeigt das Ergebnis des *pulldowns*.

ERGEBNISSE

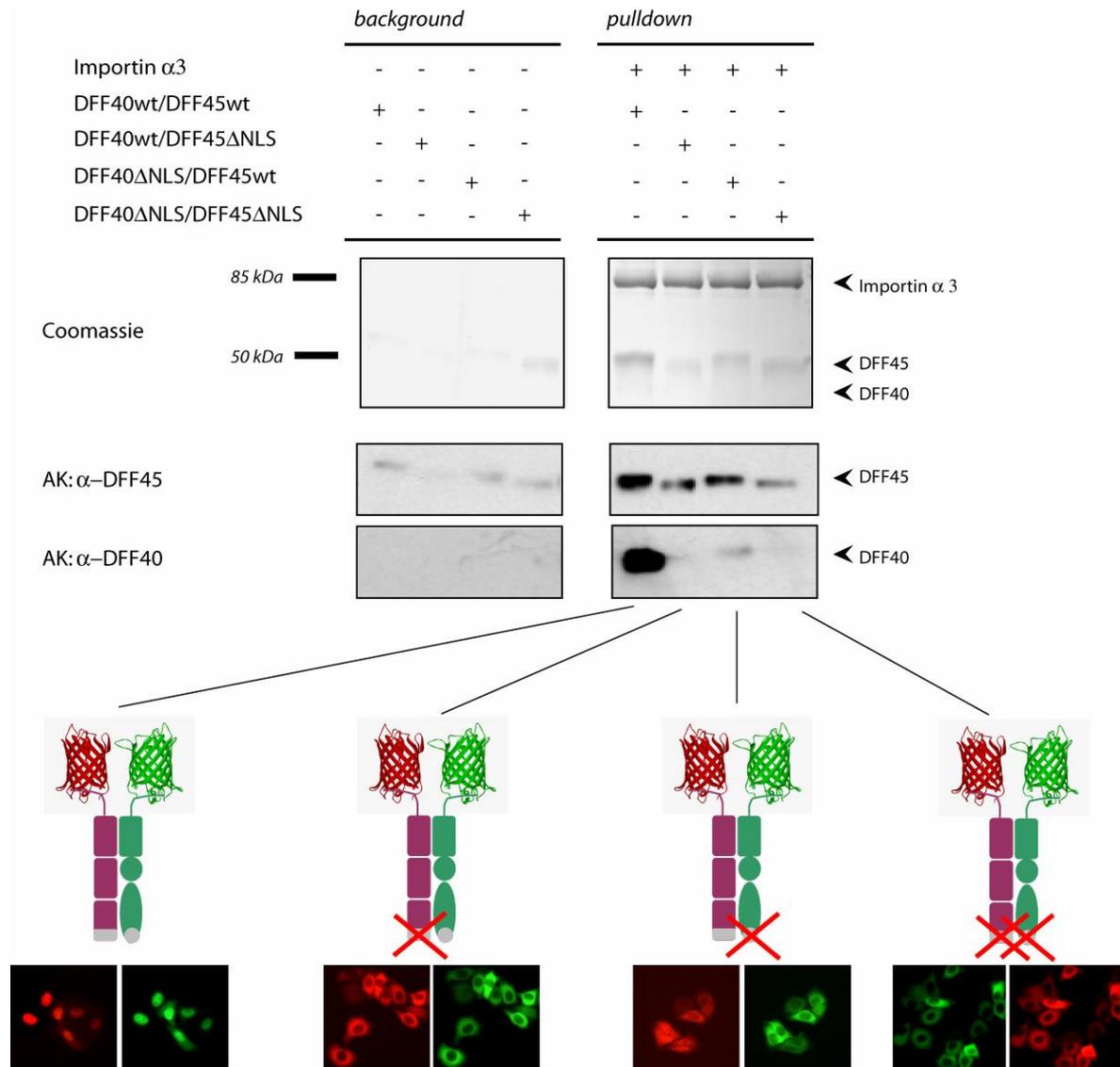


Abb. 3-14: GST-pulldown-Experiment mit Importin $\alpha 3$ und NLS-Deletionsvarianten des DFF-Komplexes:

Gezeigt sind mit *Coomassie* gefärbte SDS-Trenngele nach der Elektrophorese sowie *Western blots* durchgeführt mit Antikörpern gegen beide Untereinheiten des DFF-Komplexes, DFF40 und DFF45. Der *background* zeigt die unspezifische Bindung von DFF an die nicht mit GST-Importin $\alpha 3$ abgesättigte Glutathion-Sepharose. Der *pulldown* stellt die Bindung der verschiedenen DFF-Varianten mit systematischer Deletion der NLS-Region beider Untereinheiten an Importin $\alpha 3$ dar. Eine deutliche Bindung beider Untereinheiten zeigte sich nur im Falle von Wildtyp-DFF. Die Deletion der C-terminalen Kernlokalisationssequenzen bewirkte insgesamt eine Beeinträchtigung der Bindung des DFF-Komplexes an Importin $\alpha 3$. Wurde das NLS von DFF45 entfernt, konnte nur noch residuale Bindung von DFF45 jedoch keine Bindung von DFF40 festgestellt werden, unabhängig vom Vorhandensein der DFF40-Kernlokalisationssequenz. Im Falle der Variante DFF45-Wildtyp/DFF40 Δ NLS zeigte sich eine deutliche Bindung von DFF45 sowie auch eine Bindung der Nuklease, deren NLS deletiert war. Das Bindungsverhalten der DFF-Varianten an Importin $\alpha 3$ korreliert sehr gut mit der Lokalisation der Varianten in HeLa-Zellen.

Es ist zu erkennen, dass eine gute Bindung beider Untereinheiten nur im Falle von DFF-Wildtyp erreicht wurde. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Deletion des

Kernlokalisierungssignale einer der beiden Untereinheiten von DFF zu einer allgemeinen Schwächung der Bindung beider Untereinheiten an Importin α 3 führte. Dabei fiel auf, dass die Deletion des NLS von DFF45 einen größeren Einfluss auf die Bindung hat, was sich in einer nur noch residualen Bindung beider Untereinheiten äußerte. Im Falle der Variante DFF40 Δ NLS/DFF45 Wildtyp zeigte sich eine schwache Bindung beider Untereinheiten von DFF, trotz der Deletion des Kernlokalisierungssignales von DFF40.

3.2.5 Bindung von DFF an die primäre und sekundäre NLS-Bindestelle von Importin α 3

Importin α 3 verfügt, wie alle Mitglieder der Importin α Proteinfamilie, über zwei Bindestellen zur Beherbergung von Kernlokalisationssequenzen der Cargo-Proteine. Diese werden von zehn konservierten Armadillo-*repeat*-Motiven (*arm-repeats*) gebildet. Die Motive 2-5 bilden die primäre Bindestelle (*arm-repeat* 2-5), während die Motive 7 und 8 die sekundäre Bindestelle darstellen (*arm-repeat* 7-8).

Einteilige Kernlokalisationssequenzen werden teilweise von der primären, teilweise von der sekundären Bindestelle beherbergt, während ein klassisches, zweiteiliges Kernlokalisierungssignal beide Bindestellen benötigt^{78,79}.

Um experimentell zu ermitteln, welche Bindestelle von Importin α 3 für die Bindung der Untereinheiten des DFF-Komplexes verantwortlich ist, wurden GST-*pull-down*-Experimente mit Importin α 3 Varianten durchgeführt, deren primäre, sekundäre oder beide Bindestellen durch Mutationen konservierter Reste zerstört wurde.

3.2.5.1 Auswahl der Importin α 3 Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle

Ein *alignment* der Armadillo-*repeats* verschiedener Varianten der Importin α Proteinfamilie, welche die primäre und die sekundäre Bindestelle für Kernlokalisationssequenzen von Cargo-Proteinen bilden, zeigt eine strenge Konservierung eines Tryptophan- sowie eines Asparaginrestes in jedem *arm-repeat* mit Ausnahme von ARM-*repeat* 9 (siehe Abb. 3-15). Durch Austausch dieser Aminosäurereste in einem oder mehreren Armadillo-*repeats* gegen Alanin verliert die betroffene Bindestelle die Fähigkeit, Kernlokalisationssequenzen zu binden. Für GST-*pull-down*-Experimente mit Untereinheiten des DFF-Komplexes wurden drei Importin α 3 Mutanten ausgewählt, mit Mutationen in entweder primärer oder sekundärer Bindestelle, sowie als Kontrolle eine Variante, deren primäre und sekundäre Bindestelle gleichzeitig mutiert war (siehe Tab. 3.3). Freundlicherweise wurden die Plasmide zur Expression der Importin α 3 Varianten als GST-Fusionsproteine in *E. coli* von Prof. Dr. Julkunen (National Public Health Institute, Helsinki) zur Verfügung gestellt¹⁰².

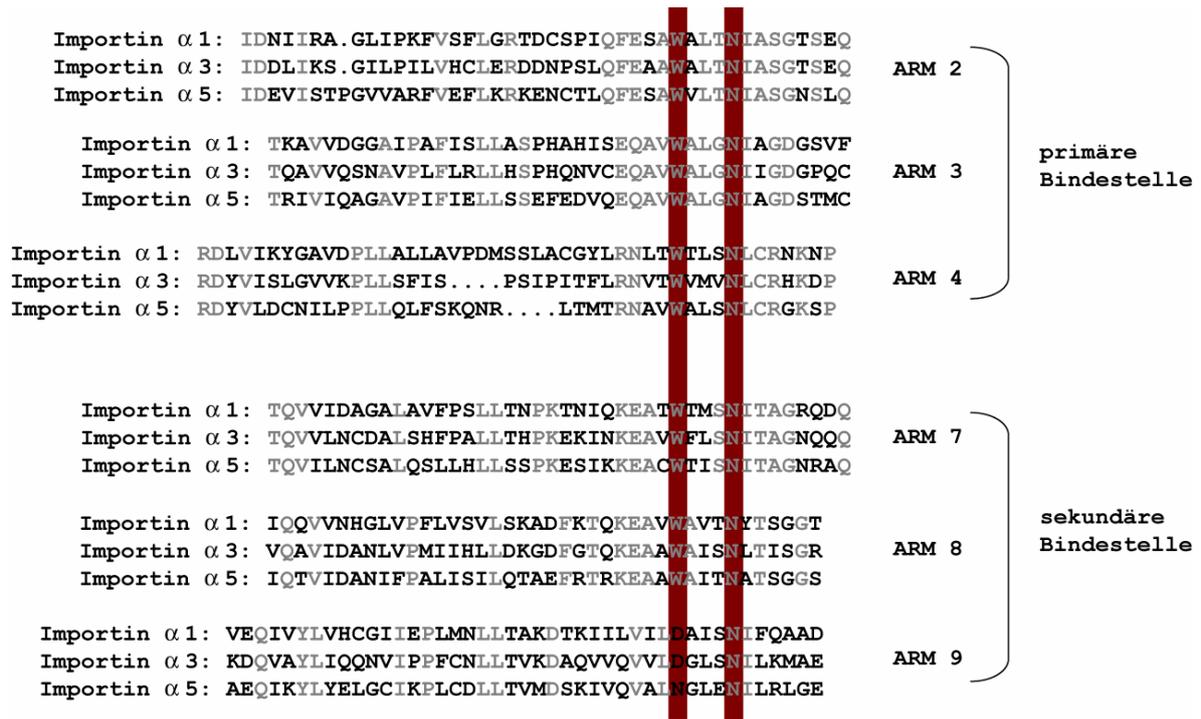


Abb. 3-15: Sequenzalignment der Armadillo-repeat-Motive verschiedener Importin α Varianten: Dargestellt sind die Armadillo-repeats der Importin α Varianten 1, 3 und 5. Arm-repeat 2-4 bilden die primäre NLS-Bindestelle, arm-repeat 7-9 bilden die sekundäre NLS-Bindestelle. Die in allen arm-repeats konservierten Aminosäurereste Tryptophan (W) und Asparagin (N) sind rot unterlegt. Weitere konservierte Aminosäurereste sind in grau dargestellt.

Tab. 3.3: Auswahl der Importin α 3-Varianten mit Mutationen in den NLS-Bindestellen

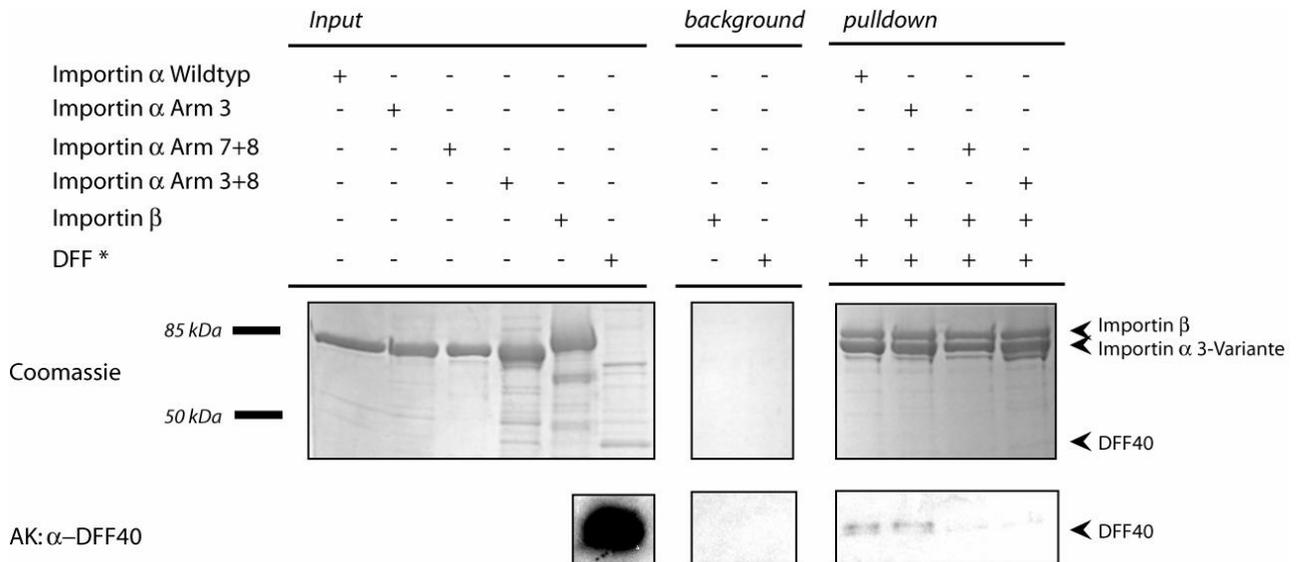
Importin α 3 Variante	Mutation	Betroffene NLS-Bindestelle
GST-Importin α 3-arm 3	Austausch des konservierten Tryptophan- und Asparaginrestes in Armadillo-repeat 3	Primäre Bindestelle
GST-Importin α 3-arm 7+8	Austausch des konservierten Tryptophan- und Asparaginrestes in Armadillo-repeat 7+8	Sekundäre Bindestelle
GST-Importin α 3-arm 3+8	Austausch des konservierten Tryptophan- und Asparaginrestes in Armadillo-repeat 3+8	Primäre und sekundäre Bindestelle

3.2.5.2 GST-pulldown-Experiment mit DFF40 und Importin α 3 Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle

Die Durchführung der GST-pulldown-Experimente entsprach der Beschreibung unter 2.6.3. Eingesetzt wurde der DFF-Komplex DFF40-Wildtyp/His-myc-DFF45 Δ NLS (Reinigung siehe 2.4.2). Zusätzlich wurde Caspase-3 zugefügt, um eine Aktivierung des Komplexes durch

ERGEBNISSE

Spaltung des Inhibitors zu erreichen. Da es sich um die Δ NLS-Variante von DFF45 handelte, konnte ausgeschlossen werden, dass die Spaltfragmente von DFF45 NLS-spezifisch die Bindestellen von Importin α 3 besetzten. Abb. 3-16 zeigt die Zusammenfassung des GST-*pull-down*-Experiments.



* aktiviert mit Caspase 3

Abb. 3-16: GST-*pull-down* Experiment mit Importin α 3-Varianten mit Mutationen in den NLS-Bindestellen und DFF40: Gezeigt sind Coomassie gefärbte SDS-Trenngele nach der Elektrophorese, sowie Western *blots* mit Antikörpern gegen DFF40. Der *input* zeigt 10% der eingesetzten Proteinmenge, im *background* wird unspezifische Bindung von His-Importin β sowie DFF40 an die Glutathion-Sepharose gezeigt. Der *pull-down* stellt die Bindung von DFF40 an den Importin α 3/ β -Komplex dar. Deutlich ist eine Bindung von DFF40 an Importin α 3-Wildtyp, sowie die Variante Importin α 3-arm-*repeat* 3 (Mutation in primärer Bindestelle) zu erkennen. Die Mutation der sekundären Bindestelle (Importin α 3-arm-*repeat* 7+8), sowie beider Bindestellen (Importin α 3-arm-*repeat* 3+8) führte dazu, dass DFF40 nicht an Importin α 3 binden konnte.

Im *pull-down* konnte eine Bindung von DFF40 an Importin α 3-Wildtyp und Importin α 3- arm 3 (Mutation der primären Bindestelle) nachgewiesen werden. Die Mutation der sekundären Bindestelle, sowie beider Bindestellen resultierte in einem Verlust der Bindungsfähigkeit von DFF40. Dies spricht dafür, dass DFF40 spezifisch an die sekundäre Bindestelle von Importin α 3 bindet.

3.2.5.3 GST-pulldown-Experiment mit DFF45 und Importin α 3 Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle

Für dieses *pulldown*-Experiment wurde His-FLAG-DFF45-Wildtyp eingesetzt. Die Durchführung entsprach der Beschreibung unter 2.6.3. Das Ergebnis des Experiments ist in Abb. 3-17 dargestellt.

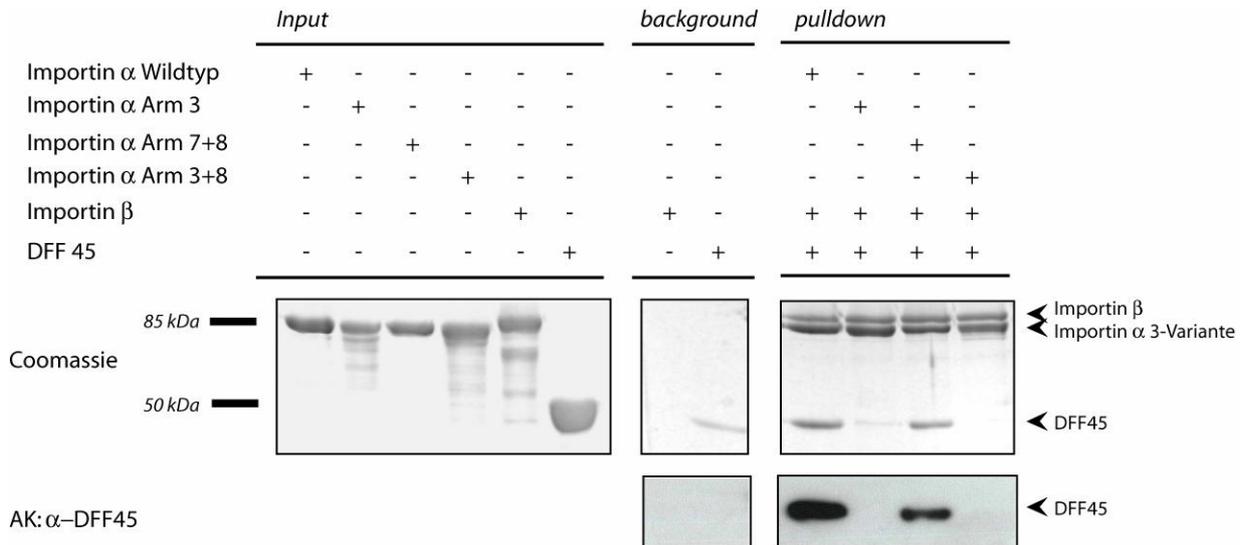


Abb. 3-17: GST-pulldown Experiment mit Importin α 3 Varianten mit Mutationen in den NLS-Bindestellen und DFF45: Gezeigt sind Coomassie gefärbte SDS-Trenngele, nach der Elektrophorese, sowie Western blots mit Antikörpern gegen DFF45. Der *input* zeigt 10% der insgesamt eingesetzten Proteinmenge, im *background* wird unspezifische Bindung von His-Importin β sowie FLAG-DFF45 an die Glutathion-Sepharose gezeigt. Der *pulldown* stellt die Bindung von DFF45 an die Importin α 3 Varianten dar. Neben der Bindung von DFF45 an Importin α 3 Wildtyp zeigte sich eine Bindung des Inhibitors an die Variante Importin α 3-arm-repeat 7+8 (Mutation in sekundärer Bindestelle). Die Importin α 3 Varianten arm-repeat 3 (Mutation in primärer Bindestelle) und arm-repeat 3+8 (Mutation in primärer und sekundärer Bindestelle) zeigten keinerlei Bindung von DFF45.

Im Falle von DFF45 konnte eine Bindung an Importin α 3-Wildtyp und Importin α 3-arm-repeat 7+8 (Mutation der sekundären Bindestelle) gezeigt werden. Die Mutation der primären Bindestelle, sowie die Mutation beider Bindestellen gleichzeitig führte zu einem kompletten Verlust der Bindung von DFF45. Daraus lässt sich schließen, dass das NLS von DFF45 von der primären Bindestelle von Importin α 3 beherbergt wird.

3.2.5.4 GST-pulldown-Experiment mit DFF und Importin α 3-Varianten mit Mutationen in primärer und sekundärer NLS-Bindestelle

Im Anschluss an die Untersuchung der einzelnen Untereinheiten von DFF auf Bindung an Importin α 3 Varianten mit Mutationen in den NLS-Bindestellen hin, wurde schließlich auch der DFF-Komplex getestet. Dazu wurde DFF40-Wildtyp/His-myc-DFF45-Wildtyp eingesetzt.

ERGEBNISSE

Die Reinigung des Komplexes ist unter 2.4.2 beschrieben. Abbildung 3-18 stellt zusammenfassend das Ergebnis des *pull-down*-Experiments dar.

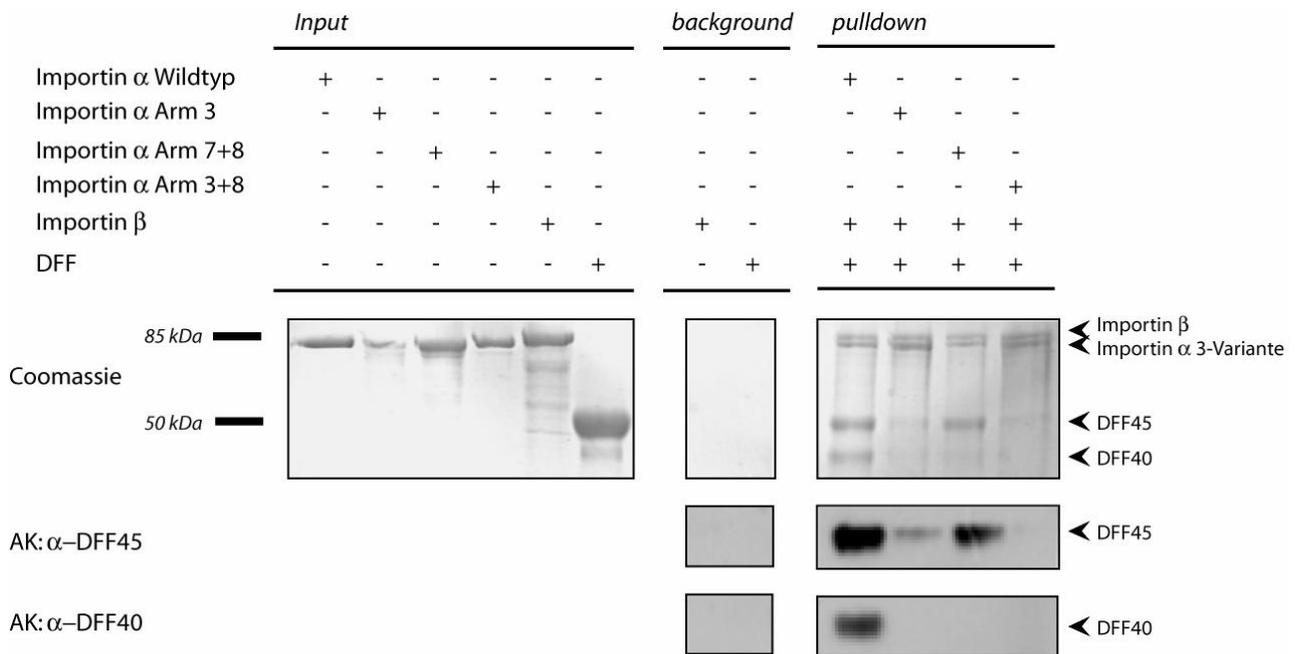


Abb. 3-18: GST-pull-down Experiment mit Importin α 3 Varianten mit Mutationen in den NLS-Bindestellen und DFF: Gezeigt sind SDS-Trenngele, mit Coomassie gefärbt, nach der Elektrophorese, sowie Western blots mit Antikörpern gegen DFF45 und DFF40. 10% der eingesetzten Proteinmengen ist als *input* gezeigt, unspezifische Bindungen von His-Importin β und DFF an die Glutathion-Sepharose-Matrix sind im *background* dargestellt. Der *pull-down* zeigt das Bindungsverhalten des DFF-Komplexes an Importin α 3-Varianten. Importin α 3 Wildtyp zeigte eine deutliche Bindung beider Untereinheiten von DFF. Die Mutation der primären Bindestelle, sowie die gleichzeitige Mutation von primärer und sekundärer Bindestelle führten dazu, dass beide Untereinheiten des DFF-Komplexes nicht mehr binden konnten. Des Weiteren konnte eine Bindung der inhibitorischen Untereinheit DFF45, nicht aber der Nuklease DFF40 an die Variante Importin α 3- arm-repeat 7+8 gezeigt werden.

Der *pull-down* zeigte, dass beide Untereinheiten von DFF an Importin α 3-Wildtyp binden. Die Mutation der primären und sekundären Bindestelle bewirkte einen Verlust der Bindung des DFF Komplexes. Allerdings zeigte Variante Importin α 3-arm-repeat 7+8 (Mutation der sekundären Bindestelle) eine deutliche Bindung von DFF45.

Wie im *input* deutlich zu erkennen ist, besteht in der Präparation des humanen DFF-Komplexes ein stöchiometrisches Missverhältnis zwischen Nuklease und Inhibitor, welcher im deutlichen Überschuss über die Nuklease vorliegt. Durch die Bindung des Komplexes an Importin α 3/Importin β gleicht sich dieses Missverhältnis aus. DFF40 und DFF45 liegen, gebunden an Importin α 3/Importin β als 1 : 1 Komplex vor. Überschüssiger DFF45 kann jedoch erwartungsgemäß an die Variante Importin α 3-arm-repeat 7+8 binden.

3.2.6 Kompetitions-assay DFF45 und DFF-Komplex: GST-pulldown-Experiment mit Importin α 3

Um zu untersuchen, ob DFF gegenüber DFF45 eine höhere Bindungsaffinität an Importin α 3 besitzt, wurde eine Kompetitions-assay mit beiden Komponenten durchgeführt.

Dabei wurde folgendermaßen verfahren:

Wie unter 2.4.2 beschrieben wurde ein GST-pulldown mit Importin α 3-Wildtyp und dem DFF-Komplex DFF40/His-myc-DFF45 angesetzt. Statt einer Elution wurden die Ansätze 3 x gewaschen. Im Anschluss wurde His-FLAG-DFF45 äquimolar, sowie im 3-fachen und 5-fachen Überschuss zugegeben und die Ansätze über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze wiederholt gewaschen, danach erfolgte die Elution mit Glutathionhaltigem Puffer. Die Eluate wurden durch SDS-Gelelektrophorese getrennt und durch einen anschließenden Western blot analysiert.

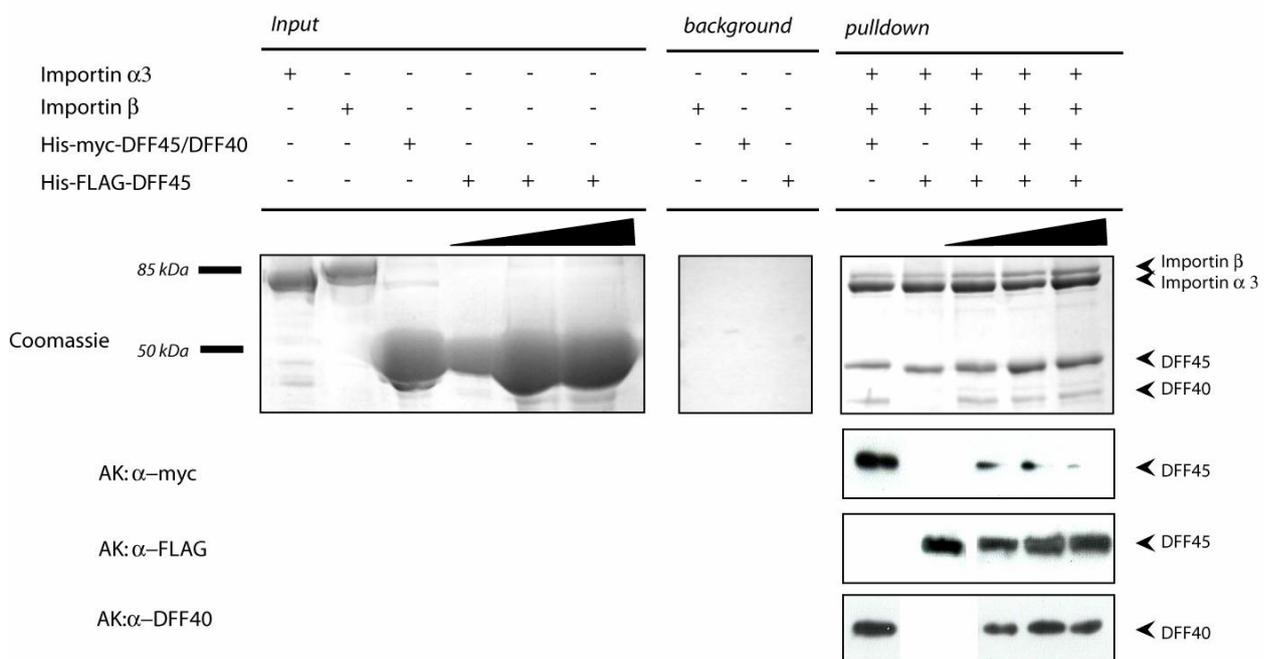


Abb. 3-19: Kompetitionsassay von DFF45 und DFF; Konkurrenz um die Bindung an Importin α 3: Gezeigt sind mit Coomassie gefärbte SDS-Trenngele nach der Elektrophorese, sowie Western blot Analysen mit Antikörpern gegen das Myc-, sowie das FLAG-Epitop und gegen DFF40. Der *input* zeigt 10% der eingesetzten Proteinmenge. His-FLAG-DFF45 wurde äquimolar, im 3-fachen, sowie im 5-fachen Überschuss über DFF eingesetzt (Zunahme DFF45 dargestellt durch schwarzen Balken). Der *background* stellt die unspezifische Bindung von His-Importin β , DFF (His-myc-DFF45/DFF40) und His-FLAG-DFF45 an die Glutathionsepharose dar. Der *pulldown* zeigt die Bindung von DFF und DFF45 an Importin α 3. Im Coomassie-gefärbten SDS-Trenngel ist zu erkennen, dass es, trotz der Zugabe von DFF45 im Überschuss, zu einer Bindung des DFF-Komplexes kommt, die mit der Bindung von DFF ohne Zugabe von DFF45 vergleichbar ist. Das Ergebnis der Western blot Analyse zeigt, dass es durch die Zugabe von His-FLAG-DFF45 zu einem Austausch der inhibitorischen Untereinheit

innerhalb des gebundenen DFF-Komplexes kommt. Die nachzuweisende Menge an His-myc-DFF45 nimmt sukzessive ab, während die Menge von gebundenem His-FLAG-DFF45 zunimmt.

Im GST-*pull-down*-Experiment konnte gezeigt werden, dass es durch die Titration steigender Mengen von DFF45 zu Importin α 3-gebundenem DFF zu keiner Verdrängung des DFF-Komplexes von Importin α 3 kam. Allerdings zeigte sich, dass es durch die Zugabe von freiem DFF45 zu einem Austausch der inhibitorischen Untereinheit von DFF kam.

3.2.7 Untersuchung des Kerntransportes von DFF als Tetramer

Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich bei DFF um einen heterodimeren Komplex aus DFF40 und DFF45 handelt, dessen Untereinheiten über die in beiden Proteinen vorhandene CIDE-N-Domäne dimerisieren³⁵. 2005 konnte der DFF-Komplex aus eukaryontischen Zellen als Tetramer DFF40₂/DFF45₂ isoliert werden³¹. Dies ließ vermuten, dass DFF in eukaryontischen Zellen als Tetramer DFF40₂/DFF45₂ vorliegt und in dieser Stöchiometrie vom Cytosol in den Zellkern transportiert wird.

3.2.7.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Kerntransportes von DFF als Tetramer

Zur Untersuchung der Stöchiometrie des Kerntransportes von DFF wurde ein Titrationsassay mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung durchgeführt.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden für die Expression von DFF kotransfiziert. Kombiniert wurden dazu EGFP-DFF40-Wildtyp mit entweder DsRedMonomer-DFF45-Wildtyp oder DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS.

Dabei wurde sich zu Nutze gemacht, dass der DFF-Komplex EGFP-DFF40-Wildtyp/DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS nahezu ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist. Dies bedeutet, dass die Deletion des Kernlokalisierungssignals einer Untereinheit von DFF zur Hemmung des Kerntransportes des vollständigen Komplexes führt.

Im Folgenden wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Konstrukten ein weiteres Konstrukt für die Expression von GST-DFF45-Wildtyp kotransfiziert. Unter der Annahme, dass das Vorhandensein intakter Kernlokalisierungssignale beider Untereinheiten von DFF zu einer Kernlokalisierung des Komplexes führt, kann anhand dieses Experimentes Rückschluss auf die Stöchiometrie des Kerntransportes von DFF gezogen werden. Wenn auf diese Weise gezeigt werden kann, dass in einer Zelle sowohl rote, als auch grüne Fluoreszenz im Zellkern vorhanden ist, muss es sich dabei um einen tetrameren Komplex aus (EGFP-DFF40-Wildtyp)₂ - DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS-GST-DFF45-Wildtyp handeln (siehe Abb.

3–20). Rote und grüne Fluoreszenz in einer Zelle wäre nicht möglich, wenn DFF als Dimer transportiert werden würde.

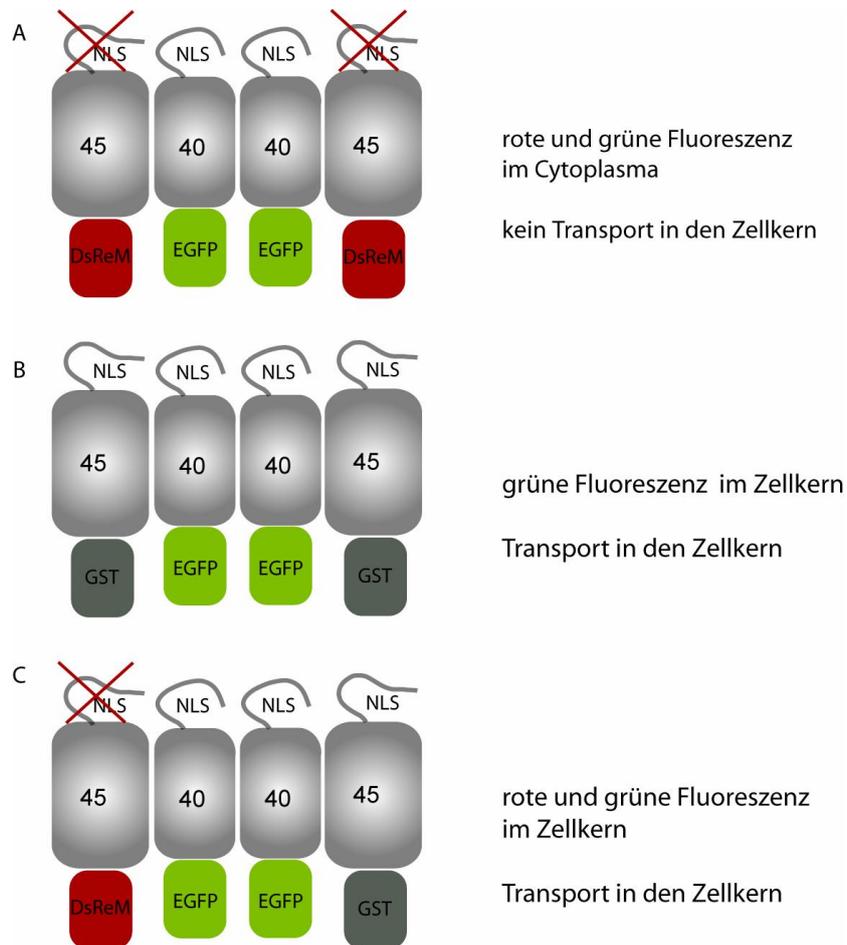


Abb. 3-20: Mögliche Tetramerbildung von DFF im Titrations-assay: In dieser Abbildung wurden die möglichen DFF-Tetramere, die sich während des Titrations-assays ausbilden konnten, schematisch dargestellt. Das in **A** dargestellte DFF-Tetramer kann nicht in den Zellkern transportiert werden, da nur DFF40 ein Kernlokalisierungssignal besitzt. Ein DFF-Tetramer aus EGFP-DFF40-Wildtyp/GST-DFF45-Wildtyp (**B**) kann in den Kern transportiert werden, allerdings weist es nur grüne Fluoreszenz auf. Das in **C** dargestellte DFF-Tetramer kann vermutlich aufgrund des Vorhandenseins von mindestens einem funktionellen Kernlokalisierungssignal beider Untereinheiten von DFF in den Zellkern transportiert werden, was sich an grüner und roter Fluoreszenz im Zellkern transfizierter HeLa-Zellen erkennen lässt. Grüne und rote Fluoreszenz im Zellkern in derselben HeLa-Zelle bedeutet, dass DFF in diesem Fall als Tetramer (**C**) transportiert wurde.

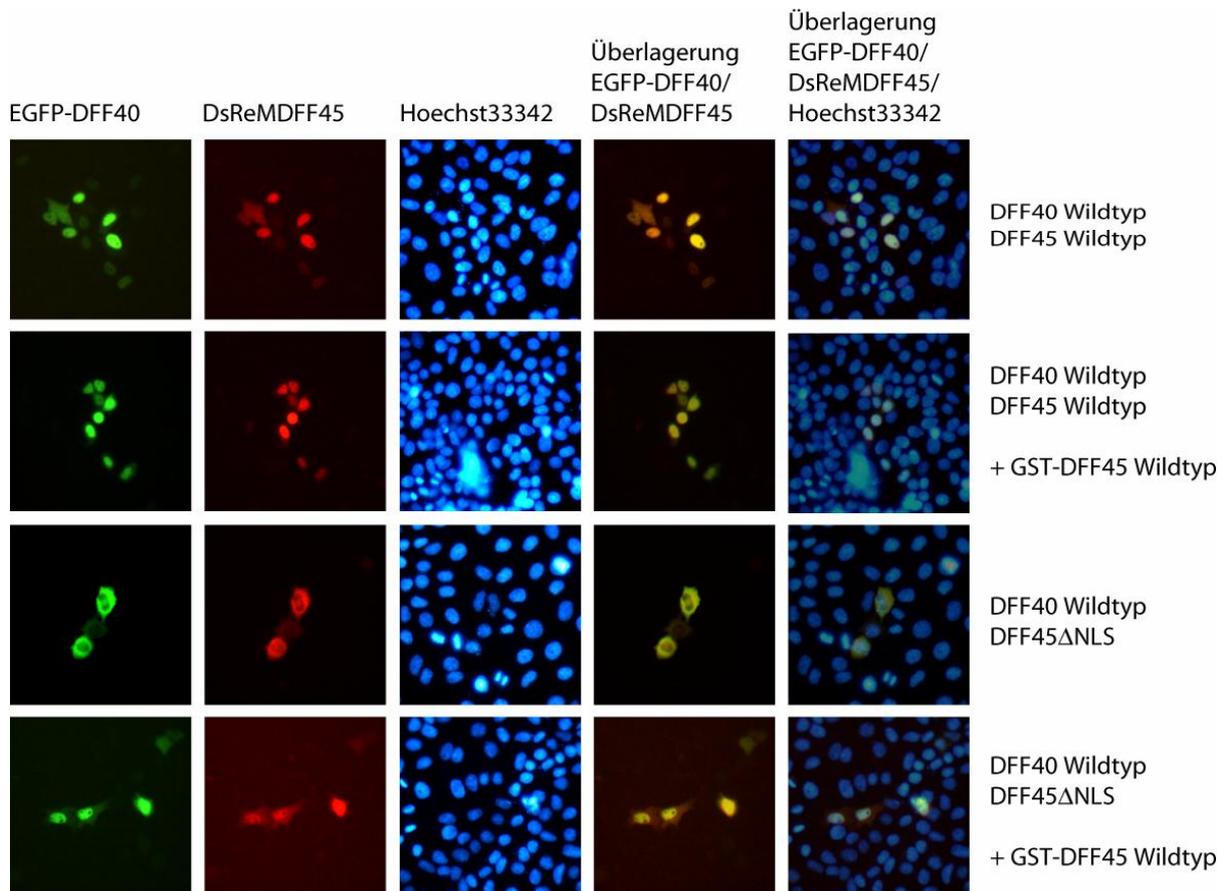


Abb. 3-21: Titrationsassay zur Untersuchung der Stöchiometrie des Kerntransportes von DFF: Gezeigt sind HeLa-Zellen 24h nach der Transfektion mit EGFP-DFF40 und verschiedenen Varianten von DsRedMonomer-DFF45. In einigen Ansätzen wurde zusätzlich ein GST-DFF45-Wildtyp-Konstrukt hinzutitriert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von GST-DFF45-Wildtyp in einer Verschiebung der Lokalisation des DFF-Komplexes vom Cytoplasma in den Zellkern resultiert.

Wie in Abb. 3-21 zu erkennen ist, befindet sich der DFF-Komplex aus den Untereinheiten EGFP-DFF40-Wildtyp/DsRedMonomer-DFF45ΔNLS im Cytoplasma. Die Kotransfektion von GST-DFF45-Wildtyp bewirkte in einigen Zellen eine Verlagerung der Lokalisation des DFF-Komplexes in den Zellkern, was an der roten und grünen Fluoreszenz im Kern zu erkennen ist. Dabei muss es sich um einen tetrameren Komplex handeln, der neben der DsRedMonomer-fusionierten DFF45-Variante ohne NLS auch GST-DFF45-Wildtyp enthielt. Die Transport-Maschinerie der Zelle ist offenbar in der Lage diesen DFF-Komplex als Tetramer in den Kern zu befördern, da neben den Kernlokalisierungssignalen von DFF40 ein funktionelles Kernlokalisierungssignal von DFF45 zugänglich ist.

Um diese Beobachtung statistisch auszuwerten, wurden Zellen auf die Lokalisation des DFF-Komplexes hin untersucht und gezählt. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden je 100 Zellen gezählt und statistisch ausgewertet.

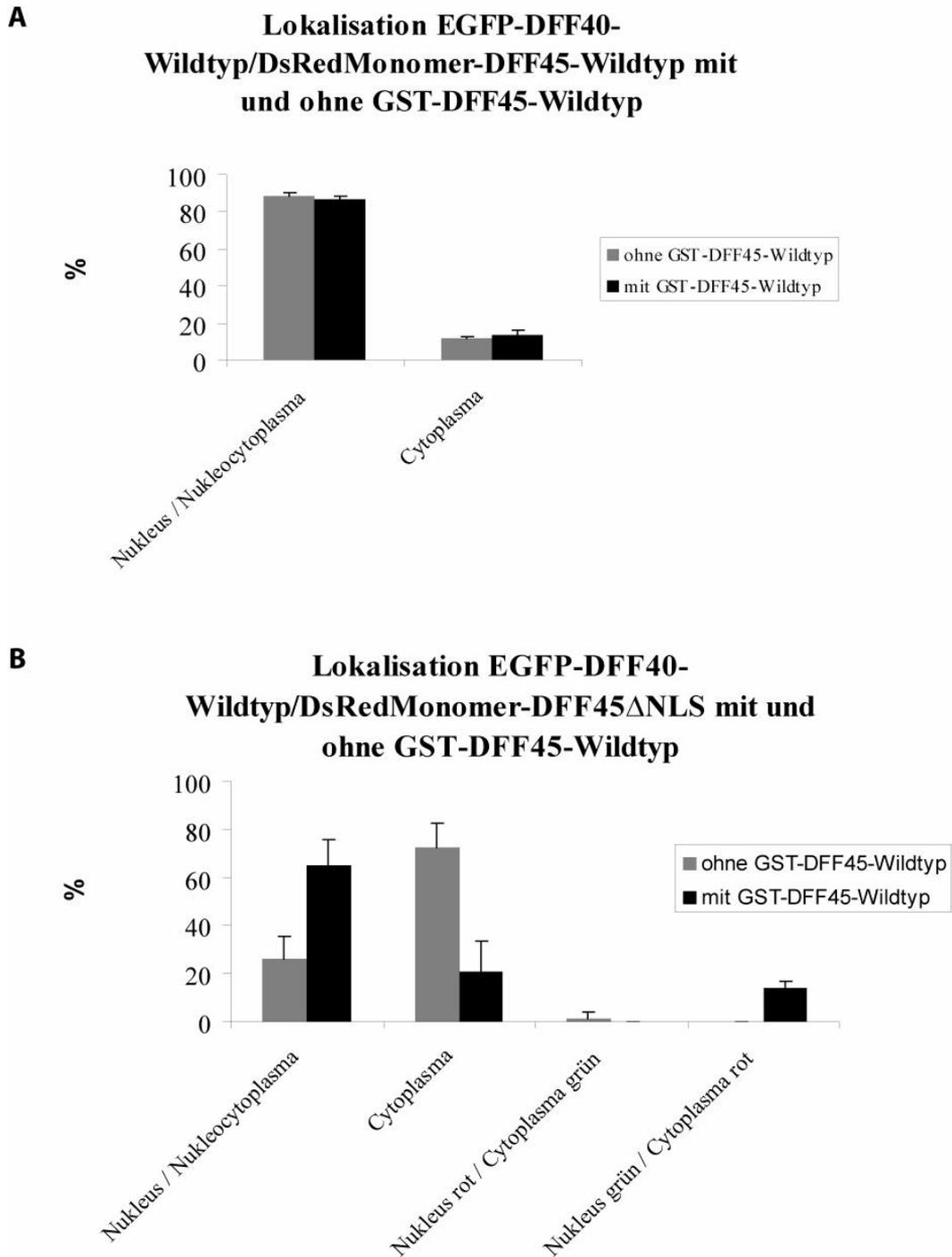


Abb. 3-22: Statistische Auswertung der Lokalisation von EGFP-DFF40/ DsRedMonomer-DFF45-Varianten mit und ohne GST-DFF45-Wildtyp in HeLa-Zellen: Gezeigt ist die Auswertung drei unabhängiger Zählungen von je 100 Zellen bezüglich der Lokalisation des DFF-Komplexes mit und ohne Kotransfektion von GST-DFF45-Wildtyp. DFF-Wildtyp (A) war zum größten Teil im Zellkern lokalisiert. Die Titration von GST-DFF45-Wildtyp hatte auf die Lokalisation des Komplexes keinen Einfluss. Im Vergleich dazu befand sich der Komplex EGFP-DFF40-Wildtyp/DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS hauptsächlich im Cytoplasma (B). Durch die Koexpression von GST-DFF45-Wildtyp wurde die cytoplasmatische Lokalisation tendentiell in den Zellkern verlagert. Bei einer kleinen Menge DFF-Komplex konnte keine Kolokalisation der beiden Untereinheiten festgestellt werden (Nukleus rot/Cytoplasma grün bzw. Nukleus grün/Cytoplasma rot).

Wie an der statistischen Auswertung zu erkennen ist, war der größte Teil des DFF-Komplexes EGFP-DFF40-Wildtyp/DsRedMonomer-DFF45-Wildtyp im Kern der HeLa-Zellen lokalisiert (89% Kernlokalisierung). Die Kotransfektion von GST-DFF45-Wildtyp beeinflusste dieses Ergebnis nicht (86% Kernlokalisierung).

Der DFF-Komplex aus den Untereinheiten EGFP-DFF40-Wildtyp/DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS befand sich zum größten Teil im Cytoplasma der Zelle (73% cytoplasmatische Lokalisation). Die Deletion der Kernlokalisationssequenz einer Untereinheit von DFF resultierte darin, dass der Komplex nicht mehr in den Kern transportiert wurde. Die Koexpression von GST-DFF45-Wildtyp (Kotransfektion äquimolarer Plasmidmengen) zu DsRed-Monomer-DFF45 Δ NLS bewirkte eine Verlagerung der Lokalisation eines großen Anteils von DFF vom Cytoplasma in den Zellkern. Ohne GST-DFF45-Wildtyp war nur etwa 26% des Komplexes im Zellkern lokalisiert. Durch die Kotransfektion von GST-DFF45-Wildtyp stieg der Anteil an kernlokalisiertem Komplex auf 65% an.

4 Diskussion

4.1 Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten von DFF

DFF ist ein heteromerer Komplex, der aus der apoptotischen Nuklease DFF40/CAD und deren Inhibitor und Chaperon DFF45/ICAD besteht. Apoptotische DNA-Fragmentierung findet im Kern der Zelle statt. Zur Ausübung der biologischen Funktion muss die Nuklease DFF40/CAD aus dem Cytoplasma, wo sie an den Ribosomen gebildet wird, in den Zellkern gelangen.

Bereits im Zuge der Entdeckung des DFF-Komplexes wurde über das Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals in der Nuklease DFF40/CAD spekuliert. Allerdings wurde angenommen, dass es durch die Bindung des Inhibitors DFF45/ICAD zu einer Maskierung des NLS der Nuklease kommt, mit der Konsequenz, dass das NLS nicht von der Kerntransport-Maschinerie der Zelle erkannt werden kann. Die Lokalisation des DFF-Komplexes wurde daher in nicht-apoptotischen Zellen im Cytoplasma vermutet²⁵. Diese Art der Zurückhaltung eines Proteins im Cytoplasma aufgrund von Maskierung des NLS durch ein inhibitorisches Protein wurde bereits für NF κ B durch I κ B beschrieben¹⁰³.

Im Zuge der Apoptose kommt es zur Aktivierung einer Caspase-Kaskade, was unter anderem dazu führt, dass Caspase-3 den Inhibitor DFF45/ICAD spaltet¹⁰⁴. Auf diese Weise wird die Bindung zwischen DFF40/CAD und DFF45/ICAD gelöst. Ursprünglich wurde vermutet, dass daraufhin das NLS der freien Nuklease DFF40/CAD zugänglich sei und der Transport des Proteins in den Kern stattfinden konnte.

Im Zuge weiterer Untersuchungen der Lokalisation von DFF konnte gezeigt werden, dass sich DFF45/ICAD-L auch in nicht-apoptotischen Zellen im Zellkern befindet^{27,87}. Später wurde nachgewiesen, dass beide Untereinheiten des DFF-Komplexes in nicht-apoptotischen Zellen im Zellkern lokalisiert sind⁸⁸. Durch Fusion der C-Termini beider Untereinheiten des DFF-Komplexes mit EGFP wurde erreicht, dass sich das ansonsten diffus in der gesamten Zelle verteilte EGFP nun im Zellkern sammelte. Auf diese Weise konnte das Vorhandensein von Kernlokalisierungssignalen sowohl in DFF40/CAD als auch in DFF45/ICAD-L nachgewiesen werden. Weiterhin wurde vermutet, dass als Voraussetzung für den Kerntransport des DFF-Komplexes die Kernlokalisierungssignale beider Untereinheiten von DFF vorhanden sein müssen. Eine genaue Charakterisierung der Bedeutung einzelner Aminosäurereste im C-Terminus von DFF40/CAD und DFF45/ICAD wurde im Rahmen der oben genannten Untersuchungen nicht durchgeführt.

4.1.1 Klassifizierung der Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten von DFF

Basierend auf den bereits bekannten Fakten bezüglich der Kernlokalisierungssignale von DFF40/CAD sowie DFF45/ICAD-L wurden Untersuchungen einzelner basischer Aminosäurereste im C-Terminus beider Untereinheiten des DFF-Komplexes durchgeführt. Kernlokalisierungssignale sind in vielen Proteinen zu finden, die im Zellkern lokalisiert sind und aufgrund ihrer Größe nicht durch Diffusion in den Kern gelangen können. Sie ermöglichen den gerichteten und kontrollierten Durchtritt von Kernproteinen durch den NPC (*nuclear pore complex*) in der Kernmembran. Die am besten charakterisierten Kernlokalisierungssignale beinhalten konservierte basische Aminosäurereste, die in Clustern zusammengeschlossen sind. Man unterscheidet einteilige Kernlokalisierungssignale, die ein einzelnes Cluster basischer Aminosäurereste aufweisen von zweiteiligen Kernlokalisierungssignalen, deren basische Aminosäurereste sich in zwei Cluster gliedern. Die Konsensussequenzen dieser klassischen Kernlokalisierungssignale sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

einteiliges NLS

Konsensus: $\overline{\text{K}} \text{R} \overline{\text{xR}}$ (Chelsky *et al.* 1989)
 SV40-NLS: **P****K**¹²⁸**K****R****K****V** (Kalderon *et al.* 1984)

zweiteiliges NLS

Konsensus: $\overline{\text{RK}}$ $\text{x}10-12 \text{3xK/R}$ aus 5 (Fontes *et al.* 2000)
 Nucleoplasmin-NLS: **K****R****P****A****A****T****K****K****A****G****Q****A****K****K****K** (Dingwall & Laskey, 1991)

Abb. 4-1: Konsensussequenzen von klassischen einteiligen und zweiteiligen Kernlokalisierungssignalen: Gezeigt sind die allgemeinen Konsensussequenzen von einteiligen und zweiteiligen Kernlokalisierungssignalen mit einem prominenten Beispiel. Rot gekennzeichnete Aminosäurereste sind für den Kernimport bedeutend. Von besonderer Bedeutung ist Lys¹²⁸ im SV40-NLS. Der Austausch dieses Restes bewirkt einen kompletten Verlust der Kernlokalisierung. Eine genaue Zuordnung der Konsensussequenz zu den basischen Resten im SV40-NLS ist nicht möglich. Die gewählte Zuordnung ist also nur als Beispiel anzusehen.

4.1.2 Die Kernlokalisationssequenz von CAD ist einteilig, entspricht aber nicht der klassischen Konsensussequenz

Die murine Nuklease CAD weist im C-Terminus drei Cluster basischer Aminosäurereste auf. Im humanen Homolog DFF40 findet man zwei Cluster basischer Aminosäurereste, die homolog zu den weiter N-terminal gelegenen Clustern in CAD sind. Ein drittes Cluster am

äußersten Ende des C-Terminus von CAD ist in der um sechs Aminosäurereste kürzeren Nuklease DFF40 nicht zu finden.

Da für DFF40 gezeigt werden konnte, dass nur ein Argininrest, gefolgt von einem Lysinrest im ersten C-terminalen Cluster für den Kerntransport von Bedeutung ist, wurde vermutet, dass die homologen basischen Aminosäurereste in CAD die gleiche Funktion erfüllen.

Dies konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Deletion des zusätzlichen, dritten Clusters, sowie die Deletion des zweiten und dritten Clusters im C-Terminus von CAD bewirkten keine Veränderung der nukleären Lokalisation des Proteins. Die Deletion aller drei Cluster basischer Aminosäurereste bewirkte jedoch eine Verlagerung der Lokalisation von CAD vom Nukleus in das Cytoplasma. Dies spricht dafür, dass sich die für den Kerntransport wichtigen Aminosäurereste in dem am weitesten N-terminal gelegenen Cluster 1 befinden. Aufgrund der Homologie zu DFF40 ist weiterhin anzunehmen, dass nur die entsprechenden Aminosäurereste Arg³³¹ und Lys³³² von Bedeutung sind und der sich N-terminal anschließende Argininrest 330 keine Funktion für den Kerntransport ausübt.

Aufgrund der chaperonen Aktivität des Inhibitors, die für die korrekte Faltung der Nuklease CAD unerlässlich ist, wurde eine Kotransfektion von DsRedMonomer-DFF45 vorgenommen. Durch die Fusion mit DsRedMonomer konnte die Lokalisation des Inhibitors ebenfalls untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass Nuklease und Inhibitor zum größten Teil (CAD-Varianten 1-4) kolokalisierten. Interessanterweise kolokalisierte CAD-Variante 4, die aufgrund der Deletion von Cluster 1, 2 und 3 im Cytoplasma lokalisiert war, ebenfalls mit dem Inhibitor DFF45. Dies zeigt, dass die Deletion des Kernlokalisierungssignals einer Untereinheit von DFF ausreicht, um den Kerntransport des kompletten Komplexes zu stören, oder, umgekehrt formuliert, das im Kontext des Komplexes ein einzelnes Kernlokalisierungssignal nicht ausreichend für einen effektiven Kerntransport ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Kernlokalisierungssignale der beiden Untereinheiten von DFF im Komplex voneinander abhängen. Die Kernlokalisationssequenz von DFF45 ist nicht ausreichend, um für den Kerntransport des Komplexes zu sorgen, obwohl sie ausreicht freien DFF45 effektiv in den Kern zu transportieren. Dies konnte ebenfalls für die Kernlokalisationssequenz von DFF40 beobachtet werden⁹⁰.

Im Falle der CAD-Variante 5 konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. Während DFF45 im Nukleus bzw. nukleocytoplasmatisch lokalisiert war, konnte der größte Teil der CAD-Variante 5 ausschließlich im Cytoplasma gefunden werden. Offensichtlich kam es aufgrund der Deletion des C-Terminus von CAD, die über die drei Cluster basischer Aminosäurereste hinausgeht, teilweise zu einer Trennung der Untereinheiten von DFF. Daraus lässt sich schließen, dass der Bereich, der sich N-Terminal an die Cluster basischer Aminosäurereste anschließt, eine Region beinhaltet, die eine Rolle bei der Interaktion von CAD und DFF45 spielt. Durch die Deletion wird die Bindung der Untereinheiten aneinander

Für DFF45 konnte anhand von Mutagenesestudien gezeigt werden, dass nur das größere weiter C-terminal gelegenen Cluster basische Aminosäurereste beinhaltet, die für den Kerntransport von DFF45 respektive des DFF-Komplexes essentiell sind. Der Austausch des Lysinrestes³¹³ in Cluster 1 hatte, wie durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden konnte, keine Auswirkungen auf die nukleäre Lokalisation von DFF45⁹⁰. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass es sich bei DFF45 nicht, wie die Konsensussequenz vermuten ließ, um ein zweiteiliges NLS handelt. Um diese Untersuchung zu vervollständigen, wurde in dieser Arbeit ein Austausch des benachbarten Serienrestes in Position 312, sowie ein gleichzeitiger Austausch von Ser³¹² und Lys³¹³ vorgenommen. Die Tatsache das Serin, das eine polare Seitenkette besitzt, nicht zu den basischen Aminosäureresten zählt, spricht gegen eine Bedeutung des Aminosäurerestes Ser³¹² für den Kerntransport von DFF45. Da sich aber im murinen Ortholog ICAD-L in der homologen Position 312 ein Argininrest befindet, konnte eine Beteiligung von Ser³¹² am Kerntransport in DFF45 nicht ausgeschlossen werden. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Einzel- und Doppelmutanten zeigte sich, dass beide mit DsRedMonomer fusionierte Varianten von DFF45 nahezu ausschließlich im Zellkern von HeLa-Zellen lokalisiert waren. Cluster 1 konnte somit als für den Kerntransport von DFF45 unbedeutend charakterisiert werden. Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, das DFF45 ein einteiliges und kein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal enthält.

Aufgrund der Homologie der Cluster basischer Aminosäurereste zwischen DFF45 und ICAD-L wurde vermutet, dass die entsprechenden basischen Argininreste in Cluster 1 von ICAD-L ebenfalls keine Bedeutung für den Kerntransport haben. Um dies zu bestätigen, wurden die Argininreste 312 und 313 gleichzeitig gegen Alanin ausgetauscht und die Lokalisation der DsRedMonomer-fusionierten Doppelmutante fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Durch die eingeführte Mutation wurde die nukleäre Lokalisation von ICAD-L nicht beeinflusst. Eine Bedeutung der basischen Aminosäurereste 312 und 313 für den Kerntransport von murinem ICAD-L und die Existenz zweiteiliger Kernlokalisationssequenzen in DFF45/ICAD-L konnte somit ausgeschlossen werden.

Das Lokalisationsverhalten der Varianten von DFF45 und die ICAD-L-Variante wurden isoliert und im Kontext des DFF-Komplexes, also in An- und in Abwesenheit von DFF40 untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Lokalisation der Inhibitorvarianten, die sowohl isoliert betrachtet, als auch als Untereinheit des DFF-Komplexes im Zellkern lokalisiert waren.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Kernlokalisationssequenzen von DFF45 und ICAD-L als klassisch einteilig definiert werden können. Die Konsensussequenz wird in allen Kriterien von Cluster 2 erfüllt. Im Falle von ICAD-L lässt sich weiterhin folgern, dass die einzelnen

Aminosäurereste in Cluster 2 von ICAD-L gleiche Funktionen im Kerntransport übernehmen wie die des gleichen Clusters in DFF45.

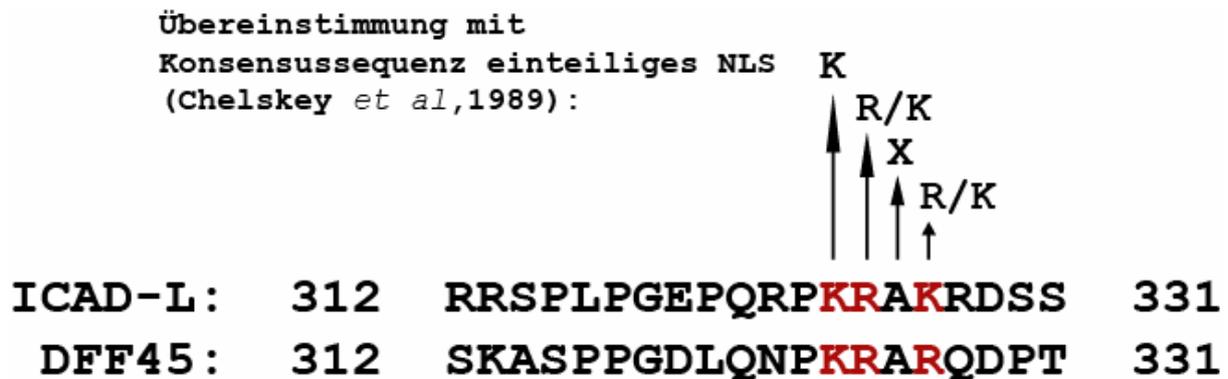


Abb. 4-3: Vergleich zwischen ICAD-L/DFF45 NLS-Konsensussequenz und Konsensussequenz des klassisch einteiligen NLS nach Chelskey: Gezeigt ist der C-Terminus von ICAD-L/DFF45, für den Kerntransport wichtige Aminosäuren sind rot dargestellt und liegen in einem Cluster. Die Konsensussequenz des klassisch einteiligen NLS nach Chelskey stimmt völlig mit der Kernlokalisationssequenz von ICAD-L/DFF45 überein.

4.2 Kerntransport von DFF durch Importine: Bindung durch das Adapterprotein Importin α 3

Der Transport von Makromolekülen aus dem Cytosol in den Zellkern eukaryontischer Zellen, wird hauptsächlich durch lösliche Rezeptorproteine, so genannte Importine, bewerkstelligt. Die Proteinfamilie der Importine gliedert sich in zwei Subfamilien, α -Importine und β -Importine. Diese erfüllen unterschiedliche Funktionen beim Kerntransport. Während Importin α als Adaptermolekül fungiert, welches über das Kernlokalisierungssignal das Cargoprotein bindet, vermittelt Importin β den Durchtritt durch den *nuclear pore complex*. Importin β bindet an den Komplex aus Cargo-Protein und Importin α , woraufhin der trimere Komplex in den Nukleus transportiert werden kann.

Während von Importin β nur eine Isoform bekannt ist, umfasst die humane Importin α -Familie sechs Mitglieder, die sich wiederum aufgrund der Sequenzübereinstimmung in drei Unterfamilien gliedern. Die Sequenzübereinstimmung von Mitgliedern einer Unterfamilie beträgt mindestens 80 %, Mitglieder verschiedener Unterfamilien besitzen etwa 50 % Sequenzübereinstimmung.

Die verschiedenen Importin α -Isoformen zeigen verschiedene Substratspezifitäten bezüglich der Cargo-Proteine. Dies konnte für unterschiedliche Substrate durch entsprechende Studien gezeigt werden. Ein prominentes Beispiel ist RCC1, der Nukleotid-Austausch Faktor für die GTPase Ran^{83,105}. Anhand von *in vitro nuclear protein import assays* konnte gezeigt werden, dass RCC1 ausschließlich durch Importin α 3 in den Kern transportiert wird. Diese strikte

Beschränkung eines Substrates auf eine Importin α -Isoform ist allerdings nicht die Regel. Häufig sind mehrere Importin α -Isoformen in der Lage, ein bestimmtes Cargo-Protein zu binden und in den Kern zu transportieren. Die Substratspezifität gewinnt dann an Bedeutung, wenn mehrere Substrate in Konkurrenz angeboten werden.

Als anderes Extrem ist Nucleoplasmin zu nennen, ein am Aufbau der Nucleosomen durch Interaktion mit Histon H2A und H2B beteiligtes Protein. Nucleoplasmin kann von allen Importin α -Isoformen in den Kern transportiert werden.

Andererseits konnte anhand von siRNA *knockdown*-Experimenten, in denen sukzessive alle Importin α -Varianten depletiert wurden, gezeigt werden, dass die Funktion einer Importin α -Variante nicht von einer anderen übernommen werden kann¹⁰⁶. Aus diesem Grund ist die Spezifität für ein gewisses Substrat als bedeutend anzusehen.

Um herauszufinden, welche Importin α -Isoform für den Kerntransport von DFF verantwortlich ist, wurden Bindungs-assays mit je einer Importin α Variante (Importin α 1, - α 3 und - α 5) aus allen drei Unterfamilien durchgeführt.

Dabei konnte eine NLS-vermittelte Bindung von DFF45 an Importin α 1 und Importin α 3 festgestellt werden. Insbesondere im Falle von Importin α 3 fiel auf, dass die Zugabe von Importin β zu einer Verstärkung der Bindung von DFF45 führte. Dies deutet auf die spezifische Bindung des DFF45-NLS an die primäre Bindestelle von Importin α 3 hin. In Abwesenheit von Importin β bindet eine NLS-ähnliche Sequenz der Importin β Bindedomäne (IBB-Domäne) von Importin α an die primäre NLS-Bindestelle von Importin α . Auf diese Weise kommt es zur Autoinhibition des Moleküls. Cargo-Proteine müssen die autoinhibitorische Sequenz verdrängen, um selbst mit der primären Bindestelle assoziieren zu können. In Anwesenheit von Importin β ist die Bindestelle bereits frei von der autoinhibitorischen Sequenz, da die gesamte IBB-Domäne mit Importin β komplexiert ist.

Importin α 5 zeigte keinerlei Bindung von DFF45. Die eingesetzte Importin α 5 besitzt allerdings eine Mutation des Tryptophanrestes in *arm-repeat* 3, welches die Bindung von basischen Aminosäureresten in der primären Bindestelle vermittelt. Dies könnte ebenfalls ein Grund für die ausbleibende Bindung von DFF45 sein. Da aber die humane Isoform von Importin α 5 in Bindungs-assays durchgeführt von Neimanis *et al.* ebenfalls keinerlei Bindung von DFF40 und DFF45 zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass DFF45 nicht an Importin α 5 bindet⁸⁹.

Im Ko-Immunopräzipitationsexperiment, durchgeführt mit den drei oben genannten Isoformen von Importin α exprimiert in 293-Zellen, konnten die Ergebnisse des Bindungs-assay für die rekombinanten Importine α 3 und α 5 bestätigt werden. Allerdings zeigte sich bei den Koimmunpräzipitationen keine NLS-spezifische Bindung von Importin α 1, sondern eine schwache, unspezifische Bindung von DFF45 Δ NLS.

Da die NLS-spezifische Bindung von DFF45 an Importin α 3 in zwei unabhängigen assays mit Proteinen unterschiedlicher Quellen bestätigt werden konnte, die NLS-spezifische Bindung von DFF45 an Importin α 1 sich aber nur im Bindungs-assay durchgeführt mit rekombinantem Protein aus *E. coli* zeigte, wurde angenommen, dass Importin α 3 vorwiegend für den Transport von DFF verantwortlich ist. Zudem zeigte nur Importin α 3 eine Importin β stimulierte Verstärkung der DFF45 Bindung. Importin α 1 scheint jedoch auch in der Lage zu sein, DFF45 zu binden und somit vermutlich auch den Transport zu vermitteln. Die Bindung von DFF an Importin α 1 aus *Xenopus laevis* konnte ebenfalls von Neimanis *et al.*, 2007 in verschiedenen Bindungsexperimenten gezeigt werden⁸⁹. Importin α 3 scheint aber eine bedeutendere Rolle im Kerntransport von DFF zu spielen. Dafür spricht ebenfalls, dass sowohl DFF45 als auch der DFF-Komplex im Konkurrenzexperiment mit Importin α 1 und Importin α 3 eine Bindungspräferenz für Importin α 3 zeigten. Trotz der Zugabe eines dreifachen Überschusses von His-Importin α 1 über GST-Importin α 3 konnte keine Abnahme in der Bindung von DFF45 und DFF festgestellt werden.

Wie oben bereits erwähnt ist es nicht ungewöhnlich, dass ein Substrat von mehreren Importin α -Isoformen gebunden und in den Kern transportiert werden kann.

Da Importin α 3 als für die Bindung und somit auch für den Kerntransport hauptverantwortliche Importin α -Isoform ermittelt werden konnte, wurde die weitere Charakterisierung des Kerntransportes von DFF mit dieser Isoform durchgeführt.

Um die NLS-spezifische, gleichzeitige Bindung beider Untereinheiten des DFF-Komplexes an Importin α 3 zu analysieren, wurde ein Bindungs-assay mit verschiedenen Varianten von DFF durchgeführt, bei denen entweder eine Deletion der C-terminalen Kernlokalisationssequenz der einen oder der anderen Untereinheit vorlag. Als Kontrollen wurden auch der Wildtyp von DFF, sowie eine Variante mit Deletionen beider Kernlokalisationssequenzen von DFF getestet. Anhand vorangegangener Lokalisationsstudien in HeLa-Zellen mit DFF40/CAD und DFF45/ICAD-L, fusioniert mit fluoreszierenden Proteinen, konnte gezeigt werden, dass für den effektiven Transport in den Zellkern das Vorhandensein beider Kernlokalisierungssignale von DFF notwendig ist. Im Bindungsexperiment mit den verschiedenen Deletionsvarianten von DFF konnte dies bestätigt werden. Eine Deletion von nur einem NLS der Untereinheiten von DFF resultierte insgesamt in einer starken Reduktion der Bindung eines solchen Komplexes an Importin α 3. Die Deletion des Kernlokalisierungssignals von DFF45 bewirkt eine größere Beeinträchtigung der Bindung des DFF-Komplexes an Importin α 3. Wurde das NLS von DFF40 deletiert, konnte eine kleine Menge beider Untereinheiten von DFF noch an Importin α 3 binden. Dieses Ergebnis spiegelt absolut die Resultate der Lokalisationsstudien mit NLS-Mutanten von DFF40 und DFF45 wider⁹⁰. Auch hier zeigte sich, dass die Deletion bzw. Mutation des DFF45-NLS zu einem kompletten Ausschluss des DFF-Komplexes aus dem Zellkern führte,

während im Falle einer Deletion bzw. Mutation des DFF40-NLS eine teilweise nukleäre Lokalisation des Komplexes beobachtet werden konnte.

4.2.1 DFF45 besetzt die primäre, DFF40 die sekundäre Bindestelle von Importin α 3

Importin α Moleküle bestehen aus einer N-terminalen Importin β -Bindedomäne (IBB-Domäne) und einer C-terminalen NLS-Bindedomäne, die aus zehn Wiederholungen sogenannter Armadillo-*repeat*-Motive (*arm-repeats*) gebildet wird. Jeder Armadillo-*repeat* umfasst etwa 40 Aminosäurereste, die drei α -Helices bilden. So stellt die NLS-Bindedomäne eine sehr gleichmäßige, α -helikale Struktur mit zwei Bindestellen für basische Aminosäurereste dar. Die N-terminale Bindestelle wird von Armadillo-*repeats* 2-4 gebildet und als primäre Bindestelle bezeichnet. Arm-*repeat* 7-9 bilden die C-terminale Bindestelle für Kernlokalisierungssignale, die auch als sekundäre Bindestelle bezeichnet wird. Die Interaktion zwischen basischen Aminosäureresten klassischer Kernlokalisationssequenzen und den NLS-Bindestellen in der *arm-repeat*-Domäne wird hauptsächlich durch polare Interaktionen mit einem Asparaginrest sowie hydrophobe Interaktionen mit einem Tryptophanrest vermittelt. Diese Asparagin- und Tryptophanreste sind in allen Importin α -Isoformen hoch konserviert und sind jeweils in Helix 3 eines Armadillo-*repeat*-Motivs lokalisiert^{78,107}.

Da gezeigt werden konnte, dass der DFF-Komplex von Importin α 3 NLS-spezifisch gebunden wird, stellte sich die Frage nach der Topologie und Stöchiometrie der Bindung von DFF und Importin α 3.

Anhand von Bindungsuntersuchungen mit Importin α 3-Varianten mit Mutationen des Asparagin- und Tryptophanrestes ausgesuchter *arm-repeats* in entweder primärer oder sekundärer Bindestelle konnte die Topologie der Bindung des DFF-Komplexes an primäre und sekundäre Bindestelle ermittelt werden.

Bindungsexperimente mit den einzelnen Untereinheiten von DFF zeigten, dass DFF40 ausschließlich mit der sekundären Bindestelle von Importin α 3 interagiert, während DFF45 nahezu ausschließlich die primäre Bindestelle besetzt. Dies korreliert mit den bekannten Bindungseigenschaften der NLS-Bindestellen in α -Importinmolekülen. Es ist bekannt, dass Kernlokalisationssequenzen, die der Konsensussequenz eines klassischen, einteiligen NLS entsprechen, in beide Bindestellen beherbergt werden können, allerdings zeigt sich meist eine Bindungspräferenz für die primäre Bindestelle. DFF45 besitzt alle Sequenzeigenschaften eines klassisch einteiligen Kernlokalisierungssignals und wird daher von der primären Bindestelle gebunden.

Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass die sekundäre Bindestelle neben klassisch einteiligen Kernlokalisierungssignalen auch nicht-klassische Kernlokalisierungssignale binden kann. Diese müssen über zumindest ein paar basische Aminosäurereste verfügen¹⁰⁸.

Damit erfüllt DFF40 alle Bedingungen eines nicht-klassischen NLS, welches von der sekundären Bindestelle gebunden werden kann. Ein weiteres bekanntes Beispiel für ein nicht-klassisches NLS, welches von der sekundären Bindestelle von Importin α 3 gebunden wird, ist das Influenza A Virus Nucleoprotein mit der NLS-Sequenz: TKRSxxxM¹⁰⁹. Auch in dieser Sequenz sind, wie bei DFF40, zwei aufeinander folgende basische Aminosäurereste zu finden. Es liegt nahe, dass die Bindung dieser nicht klassischen NLS-Sequenzen auf ähnlichen strukturellen Voraussetzungen beruht.

Interessanterweise können die Untereinheiten von DFF einzeln und unabhängig voneinander von Importin α 3 gebunden und somit in den Zellkern transportiert werden. Man könnte sich vorstellen, dass der freie Inhibitor DFF45 in den Zellkern transportiert wird, um dort als *back-up* zur Verfügung zu stehen, um versehentlich aktivierte Nuklease zu „reinhinibieren“ oder für diese als stabilisierendes Chaperon zu wirken.

Der Transport aktivierter Nuklease in den Zellkern könnte dann an Bedeutung gewinnen, wenn es im frühen Stadium der Apoptose, in dem die Kernmembran noch intakt ist, Caspase-3 Moleküle aber schon aktiviert wurden, zu einer Aktivierung von gerade an den Ribosomen gebildeten DFFs im Cytoplasma kommt. DFF40 kann dann aufgrund der Bindung an Importin α 3 auch ohne den Inhibitor in den Zellkern transportiert werden und apoptotische DNA-Fragmentierung ausführen.

4.2.2 Die Kernlokalisationssequenzen von DFF40 und DFF45 imitieren bei der Bindung des Komplexes an Importin α 3 ein klassisches zweiteiliges NLS

Mittels der vorangegangenen Bindungs-assays durchgeführt mit den einzelnen Untereinheiten von DFF konnte ermittelt werden, dass DFF40 mit der primären Bindestelle und DFF45 mit der sekundären Bindestelle von Importin α 3 assoziiert. Es ist anzunehmen, dass die Bindung des DFF-Heterodimers ebenfalls durch Interaktionen der Nuklease DFF40 mit der sekundären Bindestelle und des Inhibitors DFF45 mit der primären Bindestelle vermittelt wird. Auf diese Weise könnte ein Importin α 3-Molekül mit einem DFF-Heterodimer einen trimeren Komplex bilden, indem es die beiden in DFF enthaltenen Kernlokalisationssignale in primärer und sekundärer Bindestelle beherbergt. Die Bandenstärke der einzelnen Komponenten des Importin α 3/ β -DFF-Komplexes, gezeigt in Abb. 3-13, spricht ebenfalls für ein Verhältnis Importin α : Importin β : DFF40 : DFF45 von 1 : 1 : 1 : 1.

In beiden Untereinheiten des DFF-Komplexes konnte im C-Terminus ein Kernlokalisationsignal mit basischen Aminosäureresten gefunden werden. Durch Deletion des einen oder des anderen Kernlokalisationssignals von DFF stellte sich heraus, dass beide für einen effektiven Transport des Komplexes in den Zellkern essentiell sind. Daraus lässt

sich schließen, dass nur dann eine ausreichend starke Bindung des DFF-Komplexes an Importin $\alpha 3$ stattfinden kann, wenn beide Kernlokalisierungssignale des Komplexes vorhanden sind, die Kernlokalisierungssignale von DFF also voneinander abhängen und im Zuge der Bindung an Importin $\alpha 3$ mindestens funktionell miteinander interagieren müssen.

Betrachtet man die Cluster basischer Aminosäurereste in den C-Termini von DFF40 und DFF45 unter dem oben erläuterten Aspekt der gegenseitigen Abhängigkeit und der spezifischen Bindung des DFF40-NLS an die sekundäre Bindestelle und des DFF45-NLS an die primäre Bindestelle, fällt auf, dass auf diese Weise die Konsensussequenz eines klassischen zweiteiligen NLS gebildet wird (siehe Abb. 4-3). DFF40 liefert zwei basische Aminosäurereste, die das kleinere Cluster eines zweiteiligen NLS darstellen, welches von der sekundären Bindestelle gebunden wird, DFF45 besitzt, wie das größere Cluster im zweiteiligen NLS, drei positiv geladene Aminosäurereste, die von der primären Bindestelle gebunden werden. Die Bindung eines DFF-Heterodimers an Importin $\alpha 3$ wird auf diese Weise von einem imitierten klassisch-zweiteiligen NLS vermittelt.

Über die Ausbildung des Linkers kann anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nur spekuliert werden. Im klassischen zweiteiligen NLS besitzt der Linker zwischen den Clustern basischer Aminosäurereste eine Länge von 10-12 beliebigen Aminosäureresten. Da Kernlokalisierungssignale antiparallel zur Aminosäuresequenz des Importin α -Moleküls gebunden werden, wäre es möglich, dass der dem Cluster C-terminal folgende Rest von DFF40/CAD (7 bzw. 12 Aminosäurereste) als Linker im imitierten zweiteiligen NLS des DFF-Komplexes fungiert. Zwar entspricht die Menge von 7 Aminosäureresten nicht exakt der Konsensussequenz, es konnte aber gezeigt werden, dass die Linkerregion gegenüber Mutationen, sowie Verlängerungen oder Deletionen relativ tolerant ist⁶⁰. Des Weiteren ist es auch möglich, dass der N-Terminal an das DFF45 Cluster angrenzende Bereich den Linker bildet. Denkbar wäre auch, dass in diesem Falle eines nachgeahmten zweiteiligen Kernlokalisierungssignals mit der intermolekularen Verteilung der Cluster basischer Aminosäurereste über zwei Moleküle keine Linkerregion nötig ist. Um darüber genauere Aussagen treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

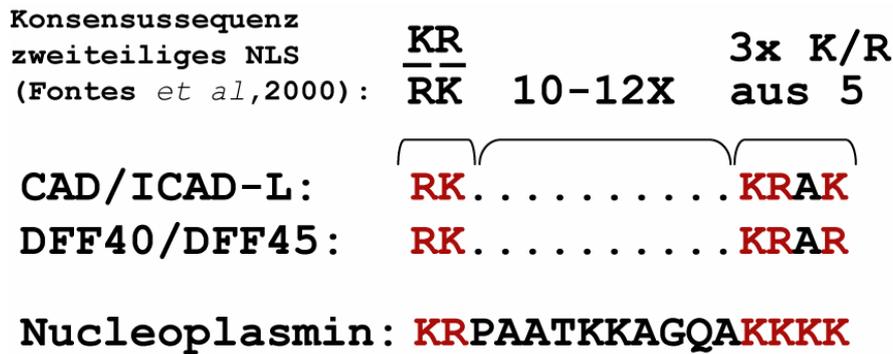


Abb. 4-4: Vergleich zwischen imitiertem zweiteiligem NLS von CAD/ICAD-L bzw. DFF40/DFF45 und Konsensussequenz des klassisch zweiteiligen NLS nach Dingwall sowie dem Beispiel Nucleoplasmin: Gezeigt ist ein *alignment* der basischen Aminosäurereste des klassischen zweiteiligen NLS von Nucleoplasmin mit den basischen Aminosäureresten von CAD/ICAD-L bzw. DFF40/DFF45. Die dem ersten Cluster basischer Aminosäuren eines zweiteiligen Kernlokalisationssignals entsprechenden Reste werden von DFF40/CAD bereitgestellt, die basischen Aminosäurereste des zweiten Clusters liefert DFF45 bzw. ICAD-L. Die Linkerregion ist mit Punkten dargestellt, da über diese anhand der durchgeführten Experimente keine Aussage getroffen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beide Untereinheiten ein NLS im C-Terminus aufweisen, wobei es sich bei DFF40/CAD um ein nicht-klassisches NLS mit zwei wichtigen basischen Aminosäureresten handelt und bei DFF45/ICAD-L um ein klassisches einteiliges NLS mit drei wichtigen basischen Aminosäureresten. Beide Kernlokalisationssequenzen sind in der Lage, die Bindung der jeweiligen isolierten Untereinheit von DFF an Importin $\alpha 3$ zu vermitteln. Im Falle von DFF40 erfolgt die Bindung an die sekundäre, im Falle von DFF45 an die primäre NLS-Bindestelle. Die Bindung des DFF-Komplexes benötigt hingegen das Vorhandensein beider Kernlokalisationssequenzen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Bindungsmodus der Untereinheiten bezüglich der Positionen beibehalten wird und DFF auf diese Weise ein klassisch zweiteiliges, intermolekulares NLS imitiert, welches von einem Molekül Importin $\alpha 3$ gebunden wird. Deshalb sind beide Cluster basischer Aminosäurereste für die Bindung des Komplexes notwendig.

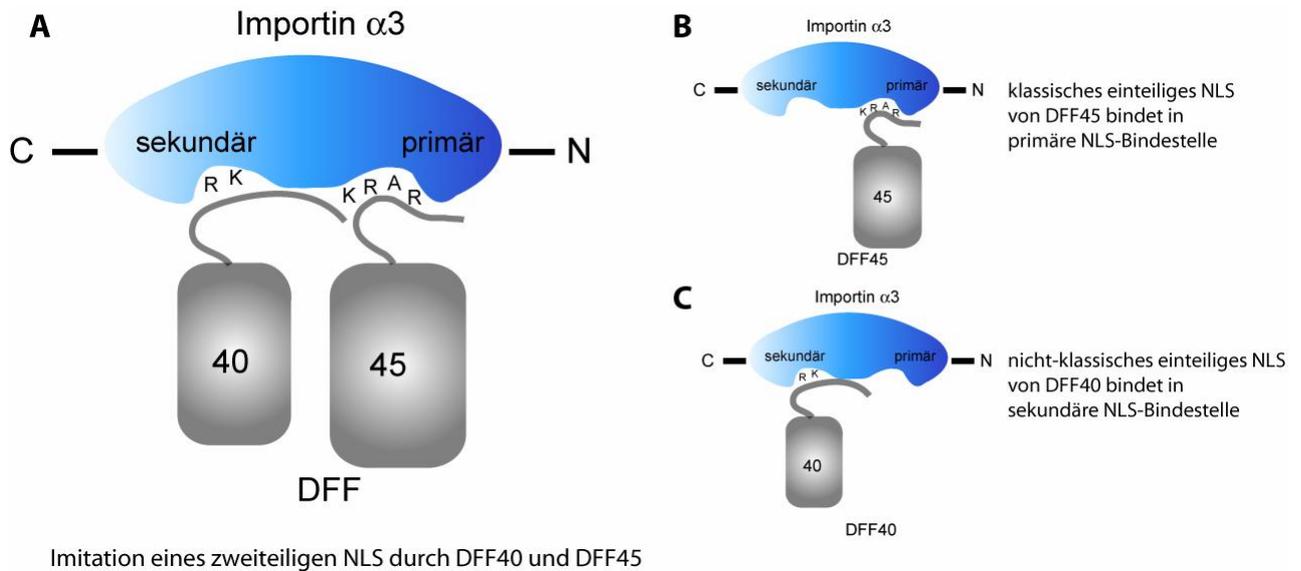


Abb. 4-5: NLS-vermittelte Bindung von DFF an Importin $\alpha 3$: Gezeigt ist ein Modell der Bindung von DFF an Importin $\alpha 3$ (A). Die Bindung wird von Arg³³⁰ und Ly³³¹ in DFF40 sowie Lys³²⁴, Arg³²⁵ und Arg³²⁷ in DFF45 vermittelt, die der Konsensussequenz eines klassisch zweiteiligen NLS entsprechen. Auch die einzelnen Untereinheiten werden von Importin $\alpha 3$ gebunden. Dabei bindet DFF45 mit einem klassisch einteiligen NLS in die primäre Bindestelle (B), während DFF40 durch ein nicht-klassisches NLS von der sekundären Bindestelle gebunden werden kann (C).

Diese Art der perfekten Imitation eines klassisch zweiteiligen Kernlokalisierungssignals von zwei Molekülen, die ein Dimer bilden, ist bisher noch für kein anderes Protein beschrieben worden. Das Phänomen der gegenseitigen Abhängigkeit zweier NLS-Elemente, verteilt über zwei Moleküle konnte allerdings bereits bei STAT-Molekülen (*signal transducers and activators of transcription*) beobachtet werden¹¹⁰. STAT-Monomere werden im Zuge der Aktivierung phosphoryliert, was in einer Dimerisierung resultiert. Durch die STAT-Dimerbildung wird die Bindung an Importin $\alpha 5$ und somit der Kerntransport ermöglicht, wobei NLS-Elemente in jeder Untereinheit des Dimers benötigt werden. Im Gegensatz zu DFF wird ein STAT-Dimer aber gleichzeitig von zwei Molekülen Importin $\alpha 5$ gebunden.

4.2.3 DFF hat gegenüber DFF45 eine höhere Bindungsaffinität zu Importin $\alpha 3$

Eine weitere interessante Beobachtung konnte im Zuge des GST-pulldown-Experiments mit DFF und Importin $\alpha 3$ -Varianten mit Mutationen in den NLS-Bindestellen gemacht werden. Betrachtet man den *input* von DFF, so stellt man fest, dass in der Proteinpräparation ein großer Überschuss an DFF45 über DFF40 vorliegt. Dies ist mit der Instabilität der Nuklease zu erklären, von der ein großer Teil während des aufwendigen Reinigungsprozesses verloren geht (siehe 2.4.2). Es befand sich daher ein großer Teil freier Inhibitor in der Präparation. Durch die Bindung eines DFF-Heterodimers an ein Molekül Importin $\alpha 3$ wird ein

solches Missverhältnis von DFF40 und DFF45 jedoch ausgeglichen. Die Variante Importin α 3-arm-*repeat* 7+8 (Mutation in sekundärer Bindestelle) war in der Lage, DFF45 in der primären NLS-Bindestelle zu binden. Daraus lässt sich schließen, dass der DFF-Komplex im Vergleich zu DFF45 gegenüber Importin α 3 eine höhere Bindungsaffinität besitzt. Importin α 3-Wildtyp interagiert ausschließlich mit dem DFF-Komplex, Importin α 3-arm 7+8 hingegen konnte den DFF-Komplex nicht binden, weil zur Bindung des intermolekularen zweiteiligen Kernlokalisationssignals das Vorhandensein von intakter primärer und sekundärer NLS-Bindestelle nötig ist. Da aber die primäre Bindestelle, die für die Bindung des DFF45-NLS zuständig ist, nicht mutiert war, konnte der in der Präparation vorhandene, überschüssige freie Inhibitor, der in Konkurrenz mit dem DFF-Komplex von Wildtyp Importin α 3 mit einer geringeren Affinität gebunden wird, von der Variante Importin α 3-arm-*repeat* 7+8 gebunden werden.

Um die Bindungsaffinitäten von DFF und DFF45 genauer zu charakterisieren, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch ein 5-facher Überschuss an DFF45 über den DFF-Komplex nicht in der Lage war, den DFF-Komplex aus der Bindung an Importin α 3 zu verdrängen. Stattdessen konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Zwar blieb DFF als Komplex an Importin α 3 gebunden, doch zeigte sich im Western *blot*, dass es zu einem konzentrationsabhängigen Austausch der inhibitorischen Untereinheit His-myc-DFF45 durch die Zugabe des Überschusses an His-FLAG-DFF45 kam. Diese Art des Austausches der DFF45/ICAD-L Untereinheit innerhalb des Komplexes konnte ferner im Zuge anderer Untersuchungen, durchgeführt in diesem Labor (Stefanie Reh, unveröffentlicht) beobachtet werden. Es ist vorstellbar, dass *in-vivo* ein Austausch zwischen der langen Isoform des Inhibitors DFF45/ICAD-L und der kurzen Isoform DFF35/ICAD-S stattfindet. DFF35/ICAD-S ist eine *splice*-Variante des Inhibitors, die am C-Terminus, inklusive des NLS, verkürzt ist. Das Protein ist in der Lage, die Nuklease vollständig in der DNase-Funktion zu hemmen, übt aber nur eine eingeschränkte chaperone Funktion für CAD/DFF40 aus⁴⁷. Der Austausch zwischen DFF45/ICAD-L und DFF35/ICAD-S nach der Entstehung der Nuklease am Ribosom mit Hilfe des Chaperons DFF45/ICAD-L würde zu einem *recycling* des Chaperons DFF45/ICAD-L führen. Es ist allerdings zu bedenken, dass es, durch das Fehlen des NLS in DFF35/ICAD-S statt zu einer ausschließlich nukleären Lokalisation zu einer homogenen Verteilung des DFF-Komplexes in der Zelle kommt. Ein Teil dieses Komplexes befindet sich also im Cytoplasma der Zelle. Nuklease, die durch Caspase-3-Aktivierung aus dem Komplex DFF40/CAD-DFF35/ICAD-S im Cytoplasma entlassen wird, könnte, wie im Bindungs-assay gezeigt werden konnte, an Importin α 3 binden und in den Kern transportiert werden.

4.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass DFF als Tetramer DFF40₂/DFF45₂ transportiert wird

Anfänglich wurde angenommen, dass DFF in eukaryontischen Zellen als Heterodimer aus einer Untereinheit DFF40/CAD und einer Untereinheit DFF45/ICAD-L vorliegt. Es konnte, u. a. anhand von *nuclear magnetic resonance spectroscopy* gezeigt werden, dass die N-terminale CIDE-Domäne, die in beiden Untereinheiten vorhanden ist, für die Dimerisierung der beiden Komponenten verantwortlich ist^{35,37}. Weiter ist über die Interaktion zwischen DFF40/CAD und DFF45/ICAD-L wenig bekannt. Leider war es bis jetzt nicht möglich, die Kristallstruktur des vollständigen DFF-Komplexes zu ermitteln und auf diese Weise die offenen Fragen bezüglich Bindung, Inhibition und Stöchiometrie zu klären. Die Kristallisation der Nuklease allein zeigte, dass das aktivierte Enzym als Dimer vorliegt³². Interessanterweise konnte der DFF-Komplex in folgenden Untersuchungen von Lechardeur *et al.* als Tetramer mit der Stöchiometrie DFF40₂/DFF45₂ isoliert werden³¹. Es stellte sich deshalb die Frage nach der Stöchiometrie von DFF während des Kerntransportes. Durch vorangegangene Experimente konnte aufgeklärt werden, dass ein DFF-Heterodimer an ein Molekül Importin α 3 bindet. Es war aber anhand der Bindungsversuche nicht auszuschließen, dass unter Beibehaltung einer Stöchiometrie DFF zu Importin α 3 von 1:1, ein Tetramer DFF40₂/DFF45₂ durch zwei Moleküle Importin α 3 in den Zellkern transportiert wird.

Um diese Theorie zu untersuchen, wurde ein *in-vivo-assay* mit Ko-Expression unterschiedlicher Varianten von DsRedMonomer-DFF45 (mit und ohne Kernlokalisationssequenz) und EGFP-DFF40 durchgeführt (siehe 3.2.7.1), mit dem es möglich war, DFF-Komplexe nachzuweisen, die mindestens zwei Untereinheiten von DFF45 beinhalten müssen, um durch aktiven Transport als Tetramer in den Zellkern gelangt sein zu können. Es handelte sich dabei um Komplexe aus DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS/GST-DFF45-Wildtyp zusammen mit EGFP-DFF40. Nur in dieser Kombination ist ein Transport in den Zellkern durch Importine möglich, da mindestens je eine Kernlokalisationssequenz der beiden Untereinheiten im Komplex vorhanden ist.

Es ist anzunehmen, dass sich entsprechend der beiden inhibitorischen Untereinheiten zwei Untereinheiten EGFP-DFF40 in diesem Komplex befinden und DFF als tetramerer Komplex in den Zellkern transportiert wurde. Allerdings ist anhand dieses Experiments nicht auszuschließen, dass es sich um trimere Komplexe aus DsRedMonomer-DFF45 Δ NLS/GST-DFF45-Wildtyp/EGFP-DFF40-Wildtyp handelt.

4.3 Kerntransport-Modell von DFF

Unter Einbeziehung aller bisher erlangten Erkenntnisse über den Kerntransport von DFF durch Importine ergibt sich folgendes Modell:

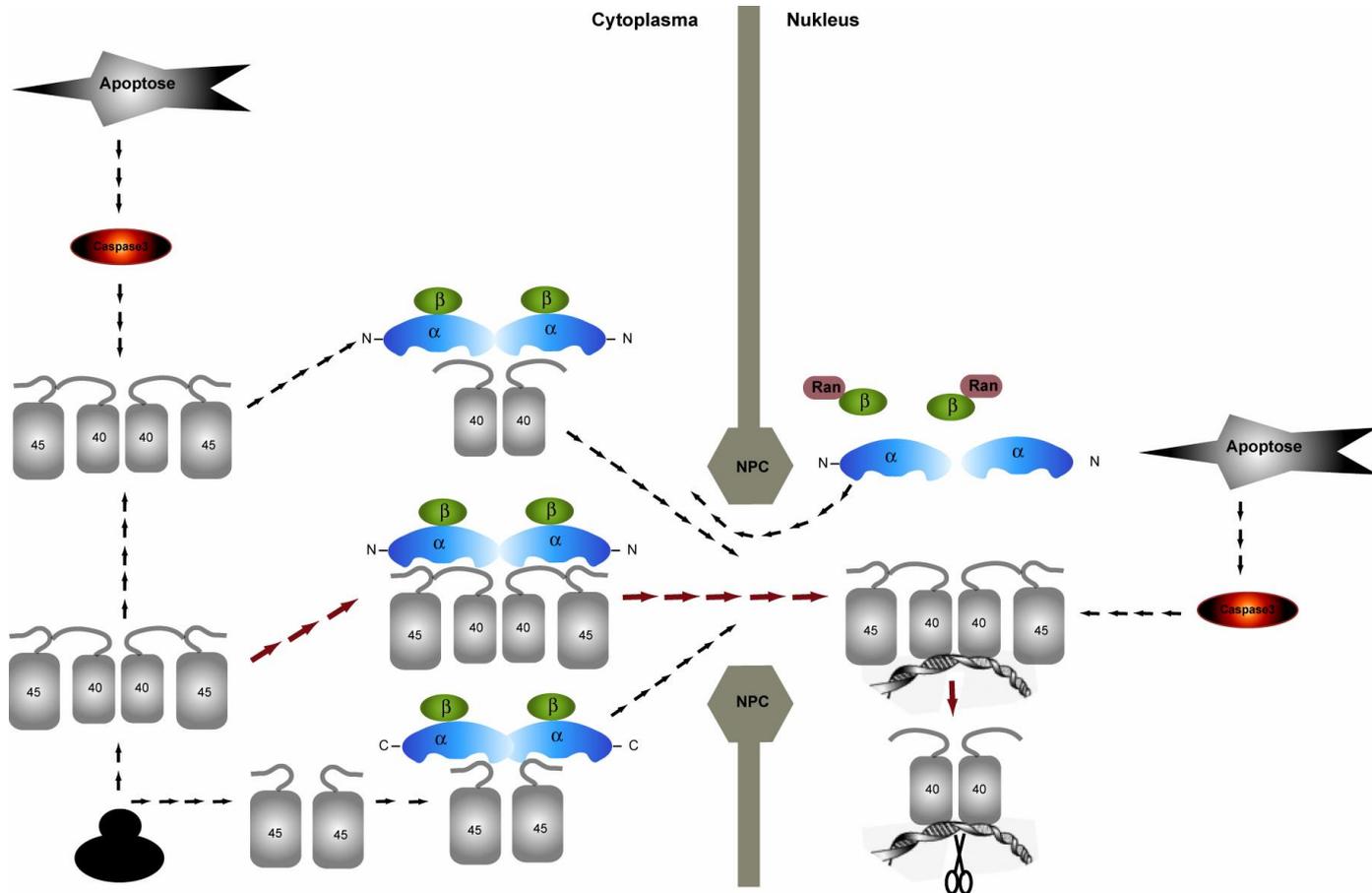


Abb. 4-6: Modell des Kerntransports von DFF: DFF entsteht an den Ribosomen im Cytoplasma und wird als Tetramer DFF40₂/DFF45₂ durch Importin α3/β in den Kern transportiert. Je ein Molekül Importin α3 (mit gebundenem Importin β) bindet an ein Heterodimer DFF40/DFF45, wobei die C-terminalen Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten ein intermolekular zusammengesetztes, klassisch zweiteiliges NLS imitieren. Der komplette Komplex aus DFF und Rezeptorproteinen wird daraufhin in den Zellkern transportiert. Dort dissoziieren die Rezeptorproteine, vermittelt durch die Bindung der GTPase Ran an Importin β und kehren für den erneuten Transport von Cargo-Proteinen zurück ins Cytoplasma. DFF ist in der Lage, auch im nicht-aktivierten Zustand an die DNA zu binden. Wird Apoptose ausgelöst, kommt es zur Aktivierung von *downstream*-Caspasen, u.a. Caspase-3, welche DFF45 spalten und auf diese Weise DFF40 aus dem Komplex entlassen. Dies resultiert in der Spaltung des Chromatins im Zellkern durch DFF40.

Wird DFF40 im Zuge der Apoptose durch die Spaltung von DFF45 durch Caspase-3 im Cytoplasma aktiviert, kann diese von der sekundären Bindestelle von Importin α3 via eines nicht-klassischen NLS am C-Terminus, welches im Komplex mit DFF45 das erste, kleinere Cluster basischer Aminosäuren des imitierten zweiteiligen Kernlokalisationssignal darstellt, gebunden und in den Zellkern transportiert werden. Da aktivierter DFF40 als Dimer vorliegt³², ist es wahrscheinlich, dass die Nuklease als Dimer in den Zellkern transportiert wird. Allerdings ist eine Oligomerisierung von mehr als zwei CAD-Molekülen nicht auszuschließen.

DFF45 kann ebenfalls als freies Protein in den Zellkern transportiert werden. Die Bindung wird durch ein klassisch einteiliges NLS, welches im Komplex das größere, zweite Cluster des imitierten NLS darstellt, an die primäre Bindestelle von Importin α 3 vermittelt. DFF45 liegt als Dimer vor, wie anhand von Gelfiltrationsexperimenten mit gereinigtem DFF45 gezeigt wurde, deshalb ist anzunehmen, dass DFF45 auch *in-vivo* ein Homodimer bildet und als solches von der Kernimportmaschinerie der Zelle transportiert wird.

4.4 Aussichten

Die Kernlokalisierungssignale der Untereinheiten in DFF sowie der Transport des DFF-Komplexes durch Moleküle der Karyopherin β Proteinfamilie (Importin α und β) konnte durch diese Arbeit und durch weitere Untersuchungen anderer Forschergruppen ausführlich und genau charakterisiert werden.

Für die Zukunft wünschenswert wären weitere Untersuchungen bezüglich des Oligomerenstatus von DFF, da gerade über dieses Thema in der Literatur sehr kontrovers diskutiert wird. Ob DFF *in vivo* als Heterodimer oder als Tetramer vorliegt und in den Zellkern transportiert wird, ist nicht völlig klar. Einerseits gibt es deutliche Hinweise auf das Vorhandensein von DFF-Tetrameren DFF40₂/DFF45₂, andererseits ist auch die Existenz von Heterodimeren DFF40/DFF45 möglich. Natürlich wäre auch das Vorhandensein beider Formen von DFF denkbar.

Des Weiteren ist der Austausch der Untereinheiten im DFF-Komplex eine interessante Beobachtung, die weiter verfolgt werden sollte. Es sollte untersucht werden, ob es zu einem Untereinheiten-Austausch zwischen der langen und der kurzen Isoform des Inhibitors DFF45 kommt und DFF45 auf diese Weise *recycelt* wird.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde ist das Dissoziieren der Untereinheiten des DFF-Komplexes im Zuge des Kerntransports, aufgrund der Deletion des Bereiches der N-terminal das NLS von CAD flankiert. Es ist bekannt, dass die Interaktion von DFF40 und DFF45 hauptsächlich über die N-terminale CIDE-Domäne vermittelt wird. Allerdings scheint die C-terminale Domäne dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen, die Kernlokalisationssequenzen der Untereinheiten des DFF-Komplexes, der murinen Nuklease CAD und des humanen und murinen Inhibitors DFF45/ICAD-L, anhand von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu klassifizieren. Bereits zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass im C-Terminus beider DFF-Untereinheiten Kernlokalisations-signale, geprägt von basischen Aminosäureresten, zu finden sind. Es war allerdings nicht klar, ob es sich um ein- oder zweiteilige Kernlokalisations-signale handelt. Um dies herauszufinden, wurden EGFP- und DsRedMonomer-fusionierte Deletionsmutanten, sowie Mutanten mit Austausch einzelner basischer Aminosäuren generiert und die Lokalisation in eukaryontischen Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei konnte ermittelt werden, dass DFF40/CAD ein nicht-klassisches NLS beinhaltet, welches zwei benachbarte basische Aminosäuren beinhaltet, die für den Kerntransport von Bedeutung sind. In DFF45/ICAD-L wurde ebenfalls ein Cluster bedeutender basischer Aminosäuren gefunden, dessen Konsensussequenz der eines klassisch einteiligen Kernlokalisations-signals entspricht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für den effektiven Transport des DFF-Komplexes die Kernlokalisations-signale beider Untereinheiten vorhanden sein mussten. Wie aufgrund des Vorhandenseins basischer Kernlokalisations-signale vermutet wurde, konnte bestätigt werden, dass der heterodimere Komplex aus Importin α und Importin β den Kerntransport von DFF bewerkstelligt, wobei Importin $\alpha 3$ als maßgebliche Isoform der Importin α -Proteinfamilie ermittelt werden konnte. Durch Bindungsversuche mit Importin $\alpha 3$ -Varianten mit Mutationen in jeweils einer der beiden Bindestellen für Kernlokalisations-signale wurde die Topologie der Bindung von DFF untersucht. Es zeigte sich, dass DFF40 an die sekundäre und DFF45 an die primäre Bindestelle bindet, was vermuten lässt, dass ein Heterodimer aus DFF40/DFF45 von einem Importin $\alpha 3$ -Molekül gebunden wird. Die Cluster basischer Aminosäuren in DFF40 und DFF45 imitieren dabei in perfekter Weise die Konsensussequenz eines klassisch zweiteiligen NLS. Beide Untereinheiten von DFF konnten auch einzeln von Importin $\alpha 3$ gebunden und somit vermutlich auch transportiert werden. Ergebnisse eines fluoreszenzmikroskopischen assays, basierend auf unterschiedlicher Fluoreszenzfarbe der beiden Untereinheiten von DFF, unterstützen die Annahme, dass DFF *in vivo* als Tetramer DFF40₂/DFF45₂ in den Zellkern transportiert wird.

Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Ergebnisse konnte folgendes Kerntransportmodell aufgestellt werden: DFF wird als Tetramer DFF40₂/DFF45₂ von je zwei Molekülen Importin $\alpha 3$ /Importin β in den Kern transportiert, wobei ein Importin α -Molekül einen Heterodimer aus DFF40 und DFF45 über C-terminale Kernlokalisations-signale an die primäre und sekundäre NLS-Bindestelle bindet. Beide Untereinheiten von DFF können auch

ZUSAMMENFASSUNG

einzelnen transportiert werden. DFF45 könnte im Zellkern als *back-up* Inhibitor und Chaperon für versehentlich aktivierte Nuklease DFF40 dienen. DFF40, welches im Zuge der Apoptose teilweise im Cytoplasma aktiviert wird, kann in den Zellkern transportiert werden.

6 Anhang

6.1 Modell Importin α , gebunden mit NLS-Peptiden von DFF40 und DFF45

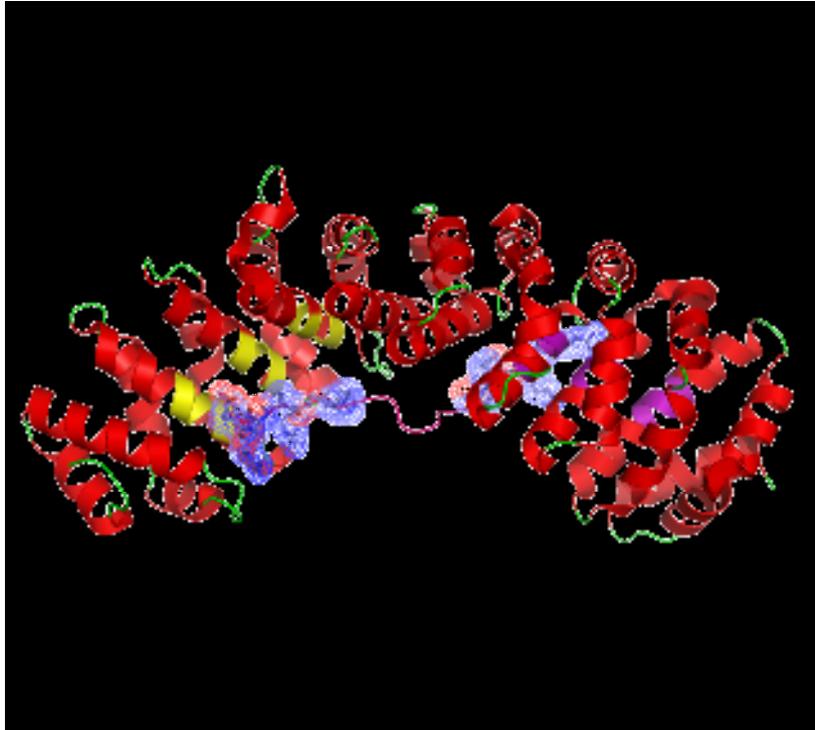


Abb. 6-1: Modell Importin α mit basischen Aminosäuren von DFF45 in primärer Bindestelle und DFF40 in sekundärer Bindestelle: Gezeigt ist die NLS-Bindedomäne von murinem Importin α 2. Mit Hilfe von *PyMol* wurden die basischen Aminosäuren der Kernlokalisationssequenzen, die als für den Kerntransport bedeutend ermittelt werden konnten in die primäre und sekundäre Bindestelle von Importin α modelliert. Als Vorlage wurde die Bindung des Nukleoplasmin-NLS verwendet.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro- (10^{-6})
Ω	Ohm
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Alanin oder Ampere oder Adenin
AAP	Agaroseauftragspuffer
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ad	auffüllen auf
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AMP	Ampicillin
Apaf-1	<i>apoptosis activating factor-1</i>
Arm	Armadillo
AS	Aminosäure(n)
BAX	<i>Bcl2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>

Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin oder Celsius
ca.	circa
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAD	<i>caspase activated DNase</i>
Cdc2	<i>cell division cycle2</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
d	desoxy-
D	Aspartat
Da	Dalton
DFF	<i>DNA fragmentation factor</i>
d.h.	das heißt
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP-Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
ds	<i>double stranded</i>
DsReM	<i>DsRedMonomer</i>
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ect.	ecetera
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EndoG	Endonuklease G
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
FasL	<i>Fas ligand</i>
g	Gramm
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GrpE	<i>glucose-regulated protein E</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H	Histidin
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IBB	Importin β Bindedomäne
ICAD	<i>inhibitor of CAD</i>
I κ B	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo($\times 10^3$)basenpaare
K	Lysin
k	kilo
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
lin	<i>linear DNA</i>
m	milli- (10^{-3})
M	molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MD	Mega Dalton
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-Monohydrat
Me ²⁺	zweiwertiges Metallion
min	Minute
n	nano- (10^{-9})
N	Asparagin
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-B</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NTA	Nitrilo-Tri-Essigsäure
NusA	<i>N utilization substance A</i>
oc	<i>open circle DNA</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Poly Ethylen Glycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHTrP	<i>parathyroid hormone-related protein</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUMA	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>

S	Serin
sc	<i>supercoiled DNA</i>
sec	Sekunde
SDS	Natrium(<i>sodium</i>)dodecylsulfat
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
ss	<i>single stranded</i>
STE	<i>saline-Tris-EDTA</i>
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet	Tetracyclin
tBid	<i>truncated Bid</i>
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	<i>tween-tris-buffered saline</i>
TSS	<i>transformation storage solution</i>
T	Tyrosin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
ü.N.	über Nacht
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumenanteile
wt	Wildtyp
W	Watt
z.B.	Zum Beispiel

6.3 Pufferverzeichnis

Puffer für Gelelektrophoresen

TBE-Puffer:

100 mM Tris, pH 8.3
 100 mM Borsäure
 2.5 mM EDTA

TPE-Puffer:

80 mM Tris-Phosphat, pH 8.0
 2 mM EDTA

Laemmli-Laufpuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA

Agaroseauftragspuffer (AAP):

250 mM EDTA
25 % (w/v) Saccharose
1.2 % (w/v) SDS
0.1 % (w/v) Bromphenolblau

mit NaOH auf pH 8.0 einstellen

Laemmli-Auftragspuffer (LAP):

160 mM Tris-HCl, pH 6.8
2 % (w/v) SDS
5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
40 % (v/v) Glycerin
0.1% (w/v) Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung:

0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue-G250
2% (w/v) Phosphorsäure
5% (w/v) Aluminiumsulfat
10% (v/v) Ethanol

Puffer für Western blots

Transferpuffer:

50 mM Tris
40 mM Glycin
0.05 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Methanol

Waschpuffer (TTBS):

100 mM Tris-HCl, pH 7.5
150 mM NaCl
0.1 % Tween 20

Blockpuffer:

4 % (w/v) Magermilch gelöst in TTBS

Lösungen für mikrobiologische Arbeiten:

LB-Medium:

10 g Caseinhydrolysat
5 g Hefextrakt
10 g NaCl
mit NaOH auf pH 7.5 einstellen
ad 1l H₂O

TSS-Lösung:

LB-Medium mit:
40 % (w/v) PEG 6000
5 % (v/v) DMSO
50 mM MgCl₂
pH 6.0-6.5

STE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA

Reinigungspuffer für DFF:

GST-DFF40/HismycDFF45 über Gluthathion-Sepharose:

1. Aufschluss- und Waschpuffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 % Glycerin
5 mM DTT
0.01 % Tritron X 100

2. Elutionspuffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 % Glycerin
5 mM DTT
0.01 % Tritron X 100
20 mM Glutathion

His-FLAG-DFF45 über Ni²⁺-NTA-Agarose:

1. Aufschluss- und Waschpuffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 mM Imidazol
1 mM DTT

2. Elutionspuffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
200 mM Imidazol
1 mM DTT
0.01 % Tritron X 100

3. Dialysepuffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 % Glycerin
5 mM DTT
0.01 % Chaps

Reinigungspuffer für Importine:

His-Importin β über Ni²⁺-NTA-Agarose:

1. Aufschluss- und Waschpuffer:

50 mM Tris, pH 7.5
200 mM NaCl
5 mM MgCl₂
4 mM DTT
20 mM Imidazol
1 mM PMSF

2. Elutionspuffer:

50 mM Tris, pH 7.5
200 mM NaCl
5 mM MgCl₂
4 mM DTT
200 mM Imidazol
1 mM PMSF

GST-Importin α über Gluthathion-Sepharose:

1. Aufschluss- und Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7,4
150 mM NaCl
5 mM EDTA
1 % Triton X 100

+ 5 mg x ml⁻¹ Lysozym (nur im Aufschlusspuffer)

2. Elutionspuffer:

50 mM Tris, pH 7,5
200 mM NaCl
5 mM MgCl₂
4 mM DTT
20 mM Glutathion
1 mM EGTA
1 mM PMSF

3. Dialysepuffer:

10 mM Tris, pH 7.0
50 mM KCl
1 mM EDTA
0.01% Triton
10% Glycerin
1 mM PMSF
1 mM DTT

10 x Bindepuffer für *pull-down*-Experimente :

200 mM HEPES
20 mM MgAc
1,1 M KAc
50 mM NaAc
10 mM EGTA
10 mM DTT

Puffer für MonoQ 5/5:

- 1. Hochsalz**
- 20 mM HEPES
- 10 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 400 mM NaCl
- 1 mM DTT

- 2. Niedrigsalz**

- 20 mM HEPES
- 10 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 400 mM NaCl
- 1 mM DTT

allgemeine Puffer:

- 1. PBS**

- 10 mM Na₃PO₄ * 2H₂O, pH 7.4
- 1.7 mM KH₂PO₄
- 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl

6.4 Literaturverzeichnis

- 1 J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, *British journal of cancer* **26** (4), 239 (1972).
- 2 M. C. Raff, B. A. Barres, J. F. Burne et al., *Science (New York, N.Y)* **262** (5134), 695 (1993); M. Raff, *Nature* **396** (6707), 119 (1998).
- 3 D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer, *Cell* **96** (2), 245 (1999).
- 4 V. A. Fadok, D. R. Voelker, P. A. Campbell et al., *J Immunol* **148** (7), 2207 (1992).
- 5 D. V. Krysko, G. Denecker, N. Festjens et al., *Cell death and differentiation* **13** (12), 2011 (2006).
- 6 D. V. Krysko, T. Vanden Berghe, K. D'Herde et al., *Methods (San Diego, Calif)* **44** (3), 205 (2008).
- 7 E. M. Johnson, Jr., *Neurobiology of aging* **15 Suppl 2**, S187 (1994).
- 8 C. J. Reed, *Seminars in hematology* **37** (4 Suppl 7), 9 (2000).
- 9 Z. Huang, *Oncogene* **19** (56), 6627 (2000).
- 10 N. N. Danial and S. J. Korsmeyer, *Cell* **116** (2), 205 (2004).
- 11 K. M. Boatright, M. Renatus, F. L. Scott et al., *Molecular cell* **11** (2), 529 (2003).
- 12 J. M. Adams and S. Cory, *Science (New York, N.Y)* **281** (5381), 1322 (1998).
- 13 K. Nakano and K. H. Vousden, *Molecular cell* **7** (3), 683 (2001).
- 14 S. J. Riedl and G. S. Salvesen, *Nature reviews* **8** (5), 405 (2007).
- 15 C. Falschlehner, C. H. Emmerich, B. Gerlach et al., *The international journal of biochemistry & cell biology* **39** (7-8), 1462 (2007).
- 16 M. R. Sprick and H. Walczak, *Biochimica et biophysica acta* **1644** (2-3), 125 (2004).
- 17 M. Woo, R. Hakem, M. S. Soengas et al., *Genes & development* **12** (6), 806 (1998).
- 18 K. Kuida, T. S. Zheng, S. Na et al., *Nature* **384** (6607), 368 (1996).

- 19 A. H. Wyllie, *Nature* **284** (5756), 555 (1980).
- 20 K. Samejima and W. C. Earnshaw, *Nature reviews* **6** (9), 677 (2005).
- 21 L. Y. Li, X. Luo, and X. Wang, *Nature* **412** (6842), 95 (2001).
- 22 D. Shiokawa, Y. Shika, and S. Tanuma, *The Biochemical journal* **376** (Pt 2), 377 (2003).
- 23 M. L. Gaido and J. A. Cidlowski, *The Journal of biological chemistry* **266** (28), 18580 (1991).
- 24 P. Widlak and W. T. Garrard, *Journal of cellular biochemistry* **94** (6), 1078 (2005).
- 25 M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama et al., *Nature* **391** (6662), 43 (1998).
- 26 X. Liu, H. Zou, C. Slaughter et al., *Cell* **89** (2), 175 (1997).
- 27 X. Liu, P. Li, P. Widlak et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (15), 8461 (1998).
- 28 J. Zhang, X. Liu, D. C. Scherer et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (21), 12480 (1998).
- 29 D. Lechardeur, M. Xu, and G. L. Lukacs, *The Journal of cell biology* **167** (5), 851 (2004); C. Korn, S. R. Scholz, O. Gimadutdinow et al., *The Journal of biological chemistry* **280** (7), 6005 (2005).
- 30 P. Widlak, J. Lanuszewska, R. B. Cary et al., *The Journal of biological chemistry* **278** (29), 26915 (2003).
- 31 D. Lechardeur, S. Dougaparsad, C. Nemes et al., *The Journal of biological chemistry* **280** (48), 40216 (2005).
- 32 E. J. Woo, Y. G. Kim, M. S. Kim et al., *Molecular cell* **14** (4), 531 (2004).
- 33 B. Yan, H. Wang, Y. Peng et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (5), 1504 (2006).
- 34 S. Konishi, H. Ishiguro, Y. Shibata et al., *Cancer* **95** (12), 2473 (2002).
- 35 N. Inohara, T. Koseki, S. Chen et al., *The Journal of biological chemistry* **274** (1), 270 (1999).
- 36 P. Zhou, A. A. Lugovskoy, J. S. McCarty et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** (11), 6051 (2001).
- 37 T. Otomo, H. Sakahira, K. Uegaki et al., *Nature structural biology* **7** (8), 658 (2000).
- 38 K. Uegaki, T. Otomo, H. Sakahira et al., *Journal of molecular biology* **297** (5), 1121 (2000).
- 39 C. Korn, S. R. Scholz, O. Gimadutdinow et al., *Nucleic acids research* **30** (6), 1325 (2002).
- 40 W. Yang, J. Y. Lee, and M. Nowotny, *Molecular cell* **22** (1), 5 (2006).
- 41 P. Widlak, *Acta biochimica Polonica* **47** (4), 1037 (2000).
- 42 P. Widlak, P. Li, X. Wang et al., *The Journal of biological chemistry* **275** (11), 8226 (2000).
- 43 J. Gu, R. P. Dong, C. Zhang et al., *The Journal of biological chemistry* **274** (30), 20759 (1999).
- 44 H. Kanouchi, H. Nishizaki, Y. Minatogawa et al., *Apoptosis* **10** (3), 651 (2005).
- 45 J. S. McCarty, S. Y. Toh, and P. Li, *Biochemical and biophysical research communications* **264** (1), 181 (1999).
- 46 K. Fukushima, J. Kikuchi, S. Koshiba et al., *Journal of molecular biology* **321** (2), 317 (2002).
- 47 S. R. Scholz, C. Korn, O. Gimadutdinow et al., *Nucleic acids research* **30** (14), 3045 (2002).
- 48 T. Misteli, *Cell* **128** (4), 787 (2007).
- 49 T. Gunther, *Magnes Res* **19** (4), 225 (2006).
- 50 K. Weis, *Cell* **112** (4), 441 (2003).
- 51 I. W. Mattaj and L. Englmeier, *Annual review of biochemistry* **67**, 265 (1998).

- 52 D. D. Newmeyer, D. R. Finlay, and D. J. Forbes, *The Journal of cell biology* **103** (6 Pt
1), 2091 (1986).
- 53 N. Pante and M. Kann, *Molecular biology of the cell* **13** (2), 425 (2002).
- 54 D. Gorlich and U. Kutay, *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 607
(1999).
- 55 I. G. Macara, *Microbiol Mol Biol Rev* **65** (4), 570 (2001).
- 56 A. H. Corbett, D. M. Koepp, G. Schlenstedt et al., *The Journal of cell biology* **130** (5),
1017 (1995).
- 57 P. Kalab, K. Weis, and R. Heald, *Science (New York, N.Y)* **295** (5564), 2452 (2002).
- 58 J. Becker, F. Melchior, V. Gerke et al., *J Biol Chem* **270** (20), 11860 (1995).
- 59 L. J. Terry, E. B. Shows, and S. R. Wentz, *Science (New York, N.Y)* **318** (5855), 1412
(2007).
- 60 C. Dingwall and R. A. Laskey, *Trends in biochemical sciences* **16** (12), 478 (1991).
- 61 D. Kalderon and A. E. Smith, *Virology* **139** (1), 109 (1984).
- 62 R. E. Lanford and J. S. Butel, *Cell* **37** (3), 801 (1984).
- 63 C. Dingwall, J. Robbins, S. M. Dilworth et al., *The Journal of cell biology* **107** (3),
841 (1988).
- 64 J. Robbins, S. M. Dilworth, R. A. Laskey et al., *Cell* **64** (3), 615 (1991).
- 65 S. T. Nath and D. P. Nayak, *Molecular and cellular biology* **10** (8), 4139 (1990).
- 66 P. Silver, I. Sadler, and M. A. Osborne, *The Journal of cell biology* **109** (3), 983
(1989).
- 67 C. Y. Xiao, S. Hubner, and D. A. Jans, *J Biol Chem* **272** (35), 22191 (1997).
- 68 F. Shirakawa and S. B. Mizel, *Molecular and cellular biology* **9** (6), 2424 (1989).
- 69 J. Davey, N. J. Dimmock, and A. Colman, *Cell* **40** (3), 667 (1985).
- 70 Z. Sheng, J. A. Lewis, and W. J. Chirico, *J Biol Chem* **279** (38), 40153 (2004).
- 71 Y. M. Chook and G. Blobel, *Current opinion in structural biology* **11** (6), 703 (2001).
- 72 J. Huber, U. Cronshagen, M. Kadokura et al., *The EMBO journal* **17** (14), 4114 (1998).
- 73 D. Gorlich, S. Kostka, R. Kraft et al., *Curr Biol* **5** (4), 383 (1995).
- 74 G. Cingolani, C. Petosa, K. Weis et al., *Nature* **399** (6733), 221 (1999).
- 75 I. R. Vetter, A. Arndt, U. Kutay et al., *Cell* **97** (5), 635 (1999).
- 76 G. Cingolani, J. Bednenko, M. T. Gillespie et al., *Molecular cell* **10** (6), 1345 (2002).
- 77 D. Gorlich, P. Henklein, R. A. Laskey et al., *The EMBO journal* **15** (8), 1810 (1996).
- 78 E. Conti, M. Uy, L. Leighton et al., *Cell* **94** (2), 193 (1998).
- 79 J. Moroianu, G. Blobel, and A. Radu, *Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America* **93** (13), 6572 (1996).
- 80 B. Kobe, *Nature structural biology* **6** (4), 388 (1999).
- 81 J. Moroianu, G. Blobel, and A. Radu, *Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America* **92** (6), 2008 (1995).
- 82 M. Rexach and G. Blobel, *Cell* **83** (5), 683 (1995).
- 83 M. Kohler, C. Speck, M. Christiansen et al., *Molecular and cellular biology* **19** (11),
7782 (1999).
- 84 M. Kohler, S. Ansseau, S. Prehn et al., *FEBS letters* **417** (1), 104 (1997).
- 85 N. Fischer, E. Kremmer, G. Lautscham et al., *J Biol Chem* **272** (7), 3999 (1997).
- 86 Y. Miyamoto, N. Imamoto, T. Sekimoto et al., *J Biol Chem* **272** (42), 26375 (1997).
- 87 K. Samejima and W. C. Earnshaw, *Experimental cell research* **243** (2), 453 (1998).
- 88 D. Lechardeur, L. Drzymala, M. Sharma et al., *The Journal of cell biology* **150** (2),
321 (2000).
- 89 S. Neimanis, W. Albig, D. Doenecke et al., *The Journal of biological chemistry* **282**
(49), 35821 (2007).
- 90 C. Linke, (2005).
- 91 S.R. Scholz, (2004).

- 92 C. T. Chung, S. L. Niemela, and R. H. Miller, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** (7), 2172 (1989).
- 93 U. K. Laemmli, *Nature* **227** (5259), 680 (1970).
- 94 H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (9), 4350 (1979).
- 95 H. C. Birnboim and J. Doly, *Nucleic acids research* **7** (6), 1513 (1979).
- 96 R. A. McPherson, *Clinical chemistry* **41** (8 Pt 1), 1065 (1995).
- 97 D. Chelsky, R. Ralph, and G. Jonak, *Molecular and cellular biology* **9** (6), 2487 (1989).
- 98 G. Meiss, O. Gimadutdinow, B. Haberland et al., *Journal of molecular biology* **297** (2), 521 (2000).
- 99 F. Durrieu, K. Samejima, J. M. Fortune et al., *Curr Biol* **10** (15), 923 (2000).
- 100 L. F. Pemberton and B. M. Paschal, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **6** (3), 187 (2005).
- 101 T. Ilmarinen, K. Melen, H. Kangas et al., *The FEBS journal* **273** (2), 315 (2006).
- 102 R. Fagerlund, L. Kinnunen, M. Kohler et al., *J Biol Chem* **280** (16), 15942 (2005).
- 103 P. A. Ganchi, S. C. Sun, W. C. Greene et al., *Molecular biology of the cell* **3** (12), 1339 (1992).
- 104 N. A. Thornberry, *British medical bulletin* **53** (3), 478 (1997).
- 105 B. Talcott and M. S. Moore, *J Biol Chem* **275** (14), 10099 (2000).
- 106 C. Quensel, B. Friedrich, T. Sommer et al., *Molecular and cellular biology* **24** (23), 10246 (2004).
- 107 M. R. Fontes, T. Teh, and B. Kobe, *Journal of molecular biology* **297** (5), 1183 (2000).
- 108 K. Melen, R. Fagerlund, J. Franke et al., *J Biol Chem* **278** (30), 28193 (2003).
- 109 P. Wang, P. Palese, and R. E. O'Neill, *Journal of virology* **71** (3), 1850 (1997).
- 110 R. Fagerlund, K. Melen, L. Kinnunen et al., *J Biol Chem* **277** (33), 30072 (2002).