Die apoptotischen Endonukleasen Endonuklease G und Deoxyribonuklease IIa Heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung

# Die apoptotischen Endonukleasen Endonuklease G und Deoxyribonuklease IIa Heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung

## Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Patrick Schäfer geboren am 01.08.1974 in Mülheim an der Ruhr

Giessen, 2007

Diese Arbeit ist meiner Mutter Renate Cookman gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs "Biochemie von Nukleoproteinkomplexen" am Institut für Biochemie (FB08) der Justus-Liebig-Univerität Giessen in der Zeit vom April 2003 bis Februar 2007 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:	Prof. Dr. Alfred M. Pingoud Institut für Biochemie, FB08 der Justus-Liebig-Universität Giessen Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Giessen
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Gabriele Klug Institut für Mikrobiologie, FB08 der Justus-Liebig-Universität Giessen Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen

Tag der Promotion: 16.04.2007

# I. Publikationen

- Schäfer P<sup>1</sup>, Scholz SR<sup>1</sup>, Gimadutdinow O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, Pingoud A, Meiss G. Structural and Functional Characterization of Mitochondrial EndoG, a Sugar Non-specific Nuclease, which Plays an Important Role During Apoptosis. J. Mol. Biol. **338**, 217-28 (2004)
- 2. Schäfer P, Cymerman IA, Bujnicki JM, Meiss G. Human lysosomal DNase IIalpha contains two requisite PLD-signature (HxK) motifs: Evidence for a pseudodimeric structure of the active enzyme species. Protein Sci. **16**, 82-91 (2007)

<sup>1</sup>: Erstautorteilung

# II. Danksagungen

Zuerst möchte ich Herrn Professor Dr. Alfred M. Pingoud für die Übernahme des Referates und die Unterstützung dieser Arbeit danken. Und dafür, dass seine Begeisterung für Wissenschaft einen dazu verleiten kann, auftretende Probleme mal ganz anders zu betrachten.

Frau Professor Dr. Gabriele Klug danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates.

Dem Nukleasen-Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Gregor Meiss: Vielen Dank für all die Hilfe und alles, was Du mir beigebracht hast.

Den ehemaligen Mitarbeitern der Nukleasen-Arbeitsgruppe, Christian und Ute sei an dieser Stelle gedankt für Ihre "Starthilfe".

Danke an "Frau Kollegin Wibke" für die Gesellschaft beim gemeinsamen Zellen Splitten.

Danke an Steffi für die gute Laune und das Kümmern um so viele Sachen.

Danke an all die, die mit mir in einem Raum zusammen gearbeitet und darüber hinaus so viel mit mir gelacht haben: Benedikt, Iwona, Inn, Martina, Oleg, Heike, Marika, Francois, Christoph, mein Praktikant Karsten und Frau Backes.

Allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie (auch vielen Ehemaligen), insbesondere Katja, Tobi und Ina, will ich hier für ein wahrhaft angenehmes Arbeitsklima danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Genetik danke ich dafür, dass ich bei ihnen die Zellkultur blockieren durfte.

Meiner gesamten Familie, fern und nah, jung und alt, möchte ich dafür danken, dass sie immer für mich da sind. Insbesondere meinem Vater und Silvia, die mich gesponsored haben.

Zum Schluss, möchte ich noch meiner lieben Anke danken. Danke für die wunderbare Zeit, die ich mit Dir (und Pitu) erlebt habe.

# III. Inhaltsverzeichnis

I	Publik	catio	nen	V
Π	Danks	sagui	ngen	VI
Π	I Inhal	tsvez	zeichnis	VII
1	Einl	eitun	1g	1
	1.1	Apo	ptose	1
	1.2	Apo	ptotische DNA-Fragmentierung	3
	1.3	Sign	alwege zur apoptotischen DNA-Fragmentierung durch zelleigene Nukleasen	5
	<b>1.4</b> 1.4.1	Die l Er	Endonuklease G (EndoG)	<b>8</b>
	<b>1.5</b> 1.5.1	Die I	Desoxyribonuklease IIα (DNase IIα) Nase IIα (humane) Eckdaten	10 12
	1.6	Ziels	setzung dieser Arbeit	12
2	Mat	eriali	ien und Methoden	14
	2.1	Mat	erialien	14
	2.1.1	Ge	eräte	14
	2.1.2	Cł	hemikalien	15
	2.1.3	Ki	itts	16
	2.1.4	Er	nzyme	16
	2.1.5	Aı	ntikörper	18
	2.1.6	M	aterialien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen	18
	2.1.7	Ve	erwendete eukaryotische Zelllinien	18
	2.2	Mik	robiologische Arbeiten	19
	2.2.1	Nä	ährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen	— 19
	2.2.2	Ε.	coli Stämme	19
	2.2.3	Pl	asmid-Vektoren Konstruktion für Endonuklease G	20
	2.2.4	Pl	asmid-Vektoren Konstruktion für DNase IIa	20
	2.2.5	Tr	ansformation von E. coli	20
	2.2	2.5.1	Bereitung elektrokompetenter E. coli Zellen	21
	2.2	2.5.2	Bereitung TSS-kompetenter E. coli Zellen	21
	2.2	2.5.3	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	22
	2.2	2.5.4	TSS-Transformation von <i>E. coli</i>	-22
	2.2	2.5.5	Verfahren mit <i>E. coli</i> nach einer Transformation	22
	2.3	Mole	ekularbiologische Methoden	$-\frac{23}{22}$
	2.3.1	EI	ektrophoresen und Western <i>blot</i>	$-\frac{23}{23}$
	2.	3.1.1	Analytische Geleiektorphorese	-23
	2	3.1.2	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	-24
	2	3.1.3 2.1.4	Western blot	<u> </u>
	232	5.1.4 Pl	asmid-DNA-Isolation	-24
	2.3.2	Fr	rmittlung von DNA Konzentrationen	$-\frac{23}{26}$
	2.5.5 234	ום	NA Manipulation	$-\frac{20}{26}$
	2.5.4	3.4.1	Restrictionsspaltung von DNA	$-\frac{20}{26}$
	2	3.4.2	Ligation von Restriktionsfragmenten	$-\frac{20}{26}$
	2.3.5	0	ligonukleotide	$-\frac{-0}{27}$
	2.3.6	PC	CŘ	27
	2.1	3.6.1	PCR-Standardbedingungen	27
	2.	3.6.2	In-vitro-Mutagenese mittels inverser PCR	28
	2.4	Exp	ression von EndoG	29
	2.4.1	Ň	erwendetes Expressionssystem	29

	2.4.2	Expression der EndoG Varianten	_ 29
	2.4.3	Plasmid-Spaltassay mit EndoG	30
,	2.5 E	xpression und Reinigung von DNase Πα	_ 31
	2.5.1	Handhabung der zur Expression von humaner DNase IIa verwendeten Zellen	31
	2.5.2	Verwendetes Expressionssystem	31
	2.5.3	DNA-Transfer in Säugerzellen	_ 32
	2.5.3	.1 Transfektionen für präparative Proteinherstellung aus Säugerzellen	_ 32
	2.5.3	.2 Transfektionen zur Analyse von Lokalisationen überexprimierter Proteine in	22
	Saug	erzellen	$-\frac{32}{22}$
	2.3.4	Mikroskopische Untersuchungen überexprimierter Proteine	- <u>33</u>
	2.5.4	Proteinrainigung und Proteinnröngration	$-\frac{33}{33}$
	2.3.3	1 Frote und Aufschluß transfizierter HEK-293-T-Zellen	$-\frac{33}{33}$
	2.5.5	Peinigung von DNase II a durch Affinitätschromatographie	$-\frac{33}{34}$
	2.5.5		
	2.6 C	harakterisierung von Proteinen	_ 35
	2.6.1	Gelfiltration	$-\frac{35}{26}$
	2.6.2	Pulldown-Experimente	$-\frac{36}{26}$
	2.0.3	1 Uuparahramizitätsassay naah Masas Kunitz	$-\frac{30}{26}$
	2.0.3	Plasmid Snaltassay     Discut Snaltassay	$-\frac{30}{36}$
	2.0.5		_ 30
3	Ergebi	nisse	38
,	3.1 R	ekombinante Endonuklease G	38
	3.1.1	Klonierung von Endonuklease G	$-\frac{1}{38}$
	3.1.2	Überexpression von EndoG in Bakterien	38
	3.1.3	Überexpression von EndoG in Bakterien als NusA-Fusionsprotein zur Vermeidung der Bildu	ung
	von incl	usion bodies	39
	3.1.4	Rückfaltung von His <sub>6</sub> -EndoG durch rasches Verdünnen in einem Renaturierungspuffer	40
	3.1.5	Chemische Rückfaltung von His <sub>6</sub> -EndoG auf einer Ni <sup>2+</sup> -NTA Säule durch Gebrauch von	
	Deterge	nzien und künstlichen Chaperonen	41
	3.1.6	Rückfaltung von His <sub>6</sub> -EndoG mit dem iFOLD <sup>1M</sup> Kit	_ 42
	3.1.7	Zusammenfassung des Kapitels 3.1	45
	3.2 R	ekombinante humane DNase IIa	46
	3.2.1	Klonierung von humaner DNase IIa	- 46
	3.2.2	Überexpression von DNase II a in Säugerzellen	46
	3.2.3	Desoxyribonukleaseaktivitätsnachweis von DNase II $\alpha$ -FH	48
	3.2.4	Inhibition der Nukleaseaktivität von DIIa durch Wolframat	48
	3.2.5	Lokalisation von DNase IIa in der Zelle	50
	3.2.6	Sequenzalignment-orientierte Analyse von DNase IIa durch alanine scanning	51
	3.2.6	.1 Mutagenese konservierter Reste in humaner DNase II $\alpha$	52
	3.2.7	Expression, Reinigung und Nachweis von DNase IIa Mutanten	53
	3.2.8	Nukleaseaktivitätsassays mit DNase IIα-FH wt und Mutanten	<sup>-</sup> 54
	3.2.8	.1 Kunitzassay mit DNase IIα-FH wt und Mutanten	54
	3.2.8	.2 Plasmid-Spaltassays mit DNase II $\alpha$ -FH wt und Mutanten	55
	3.2.9	Gelfiltration zur Untersuchung der aktiven Spezies rekombinanter DNase II $\alpha$	56
	3.2.10	Coimmunopräzipitationsassays von DNase II\alpha-HA und DNase II\alpha -FH Fusionsproteinen	59
	3.2.11	Zusammenfassung des Kapitels 3.2	61
4	Diskus	sion	63
	41 F	ndanuklesse G	63
•	411	Expression von EndoG in Bakterien: das Problem der <i>inclusion bodies</i>	- 63
	412	EndoG als Fusionsprotein mit NusA	- 65
	4.1.3	Rückfaltung von EndoG aus <i>inclusion bodies</i>	- 66
	4.1.3	.1 Anwendung einer veröffentlichten Rückfaltungsstrategie für EndoG	66
	4.1.3	.2 Blitzartige Verdünnung von denaturierter EndoG	67

	4.1.3.3 Der Einsatz von künstlichen Chaperonen zur Renaturierung und Reaktivierung von	
	Endou	- 67
4	4.1.3.4 Der Einsatz des iFOLD Kits um eine Kenaturierungsbedingung für EndoG zu finden_ 4.1.4 Aussichten für EndoG	_ 08 _ 69
4.2	DNase IIa	71
4	A.2.1 C-terminale Fusionsproteine humaner DNase IIα werden in Lysosomen transportiert und sind	•
k	atalytisch aktiv	_ 72
4	A.2.2 Sequenz- und modellorientierte Analyse von DNase Πα	_ 72
	4.2.2.1 Die Aminosäurereste H295, H113 und H130 sind essentiell für die Aktivität der humane	en
	DNase IIa	73
	4.2.2.2 Die Aminosäuren K115, K297, D311, N313, S131, K230 und Q155 können gegen Alan	in
	ausgetauscht werden, ohne eine komplette Inaktivierung der DNase IIa zu bewirken	_ 75
4	E.2.3 Gelfitrationsexperimente und Communopräzipitationsassays mit rekombinanter humaner	= <
1	DNase IIa unterstützen die Annahme, dass DNase IIa als eine einzelne Polypeptidkette aktiv ist	_ 76
4	h.2.4 Das aktive Zentrum und der Spaltmechanismus der humanen lysosomalen DNase Πα	- 77
4	A.2.5 Aussichten für DNase II $\alpha$	_ 79
5 2	Zusammenfassung	_80
6	Anhana	81
0 7		_01
6.1	Abkürzungsverzeichnis	_ <b>8</b> 1
6.1 6.2	Abkürzungsverzeichnis	_ 81 _ 84
6.1 6.2 6.3	Abkürzungsverzeichnis Verwendete PCR-Primer Verzeichnis von Lösungen und Puffern	_ 81 _ 84 _ 87
6.1 6.2 6.3	Abkürzungsverzeichnis	. 81 . 84 . 87 . 87
6.1 6.2 6.3 F	Abkürzungsverzeichnis	_ 81 _ 84 _ 87 _ 87 _ 88
6.1 6.2 6.3 F	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Lösungen für mikrobiologische Arbeiten	. 81 . 84 . 87 . 87 . 87 . 87 . 88 . 89
6.1 6.2 6.3 F F I	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Lösungen für mikrobiologische Arbeiten         Puffer für Arbeiten mit EndoG	. 81 . 84 . 87 . 87 . 87 . 87 . 88 . 89 . 90
6.1 6.2 6.3 F F I F	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Lösungen für mikrobiologische Arbeiten         Puffer für Arbeiten mit EndoG         Puffer für Arbeiten mit DNase IIα	<b>81 84 87 87 87 87 87 87 87 87</b>
6.1 6.2 6.3 F F I F F 6.4	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Sungen für mikrobiologische Arbeiten         Puffer für Arbeiten mit EndoG         Puffer für Arbeiten mit DNase IIa         Aminosäuresequenzen von boviner EndoG und humaner DNase IIa	<b>81 84 87 87 87 87 87 87 87 87</b>
6.1 6.2 6.3 F F F 6.4 6.5	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Lösungen für mikrobiologische Arbeiten         Puffer für Arbeiten mit EndoG         Puffer für Arbeiten mit DNase IIa         Modelle boviner EndoG und humaner DNase IIa	<b>81 84 87 87 87 87 87 87 87 87</b>
6.1 6.2 6.3 F F I F 6.4 6.5 6.6	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Lösungen für mikrobiologische Arbeiten         Puffer für Arbeiten mit EndoG         Puffer für Arbeiten mit DNase IIa         Aminosäuresequenzen von boviner EndoG und humaner DNase IIa         Modelle boviner EndoG und humaner DNase IIa         Verwendete Plasmide	. 81 . 84 . 87 - 88 - 87 - 88 - 88 - 90 - 90 - 90 - 92 . 92 . 93
6.1 6.2 6.3 F F F 6.4 6.5 6.6 6.7	Abkürzungsverzeichnis         Verwendete PCR-Primer         Verzeichnis von Lösungen und Puffern         Puffer für Gelelektrophoresen         Puffer für Western blots         Sösungen für mikrobiologische Arbeiten         Puffer für Arbeiten mit EndoG         Puffer für Arbeiten mit DNase IIa         Aminosäuresequenzen von boviner EndoG und humaner DNase IIa         Verwendete Plasmide         Die iFold <sup>TM</sup> -Matrix	. 81 . 84 . 87 . 87 . 87 . 87 . 87 . 87 . 90 . 90 . 90 . 92 . 92 . 93 . 97

## 1 Einleitung

## 1.1 Apoptose

Der Begriff "Apoptose" ist ein aus dem Griechischen abgeleitetes Wort, das mit "vorzeitigem Herabfallen", ähnlich dem Laubfall der Bäume im Herbst, übersetzt werden kann. Entstanden ist er 1972, als die Pathologen Kerr, Wyllie und Currie dem von Ihnen beobachteten Phänomen, dass Körperzellen anscheinend Signale von außen empfingen und sich daraufhin selbst vernichteten, diesen Namen gaben<sup>1</sup>. Vorher benutzte man den Begriff "Programmierter Zelltod", der 1965 von Lockshin und Williams eingeführt worden war, die diesen Prozess bei Insekten untersuchten<sup>2</sup>. Diese Bezeichnung ist sehr passend, da dieser Zelltod, wie Horvitz *et al.* 1983 es durch Untersuchungen an Mutanten des Wurms *Caenorhabditis elegans* zu verstehen gaben, genetisch gesteuert wird<sup>3</sup>. Das erste Protein (Bcl-2), das wichtig ist für die Apoptose wurde schließlich 1988 entdeckt<sup>4</sup>.

In den letzten Jahren ist die Apoptose zu einem der am intensivsten untersuchten Forschungsgebiete geworden. So ist der Nobelpreis für Medizin im Jahr 2002, für die Pionierarbeit auf dem Gebiet der Entwicklungsgenetik und des programmierten Zelltodes in *Caenorhabditis elegans* gemeinsam an S. Brenner, R. Horvitz und J. Sulston verliehen worden.

Insbesondere im Zusammenhang mit der Krebsentstehung und verschiedenen Autoimmunerkrankungen steht die Apoptoseforschung im Mittelpunkt. Ein Ziel der Krebsforschung ist es, kontrollierte Apoptose bei entarteten Krebszellen auszulösen.

Interessanterweise nutzen auch Krebszellen den Apoptosemechanismus um ihrerseits Abwehrzellen des Organismus auszuschalten. So findet man auf der Oberfläche von einigen Tumorzellen den Fas(CD95)-Liganden, ein Apoptose-auslösendes Protein. Diesen Mechanismus bezeichnet man als "*tumor counterattack*" oder auch "*Fas counterattack*"<sup>5</sup>.

Die Apoptose bzw. der programmierte Zelltod ist ein fundamentaler Prozess, der bei der Entwicklung und der Homöostase der Gewebe von Metazoen eine wichtige Rolle spielt. Durch Apoptose wird die Anzahl der Zellen kontrolliert und infizierte, mutierte oder beschädigte Zellen können beseitigt werden<sup>6</sup>. Auch Strukturen, die während der Entwicklung überflüssig werden, wie z.B. das schwimmhautartige Gewebe zwischen den Fingern und Zehen während der Enbryonalentwicklung von Säugern (s. Abb. 1-1) oder der Schwanz der Kaulquappe bei der Metamorphose zum Frosch, können durch Apoptose eliminiert werden<sup>7,8</sup>.



1 mm

Abb. 1-1: Apoptose bei der Embryonalentwicklung der Maus: Gezeigt sind zwei embryonale Mauspfoten, die 26 h auf Agaroseplattformen kultiviert wurden. Die linke Pfote wurde nicht weiter behandelt, während die rechte mit einem Apoptoseinhibitor (zVAD-fmk) behandelt wurde. Man erkennt, dass das interdigitale Gewebe der rechten Pfote nicht beseitigt wurde, während bei der linken dieses durch Apoptose entfernt wurde und größere Ausbuchtungen (angedeutet durch rote Pfeile) entstanden sind. (Aus Jacobsen *et al.*, J. Cell. Biol. 133 (5), 1041-1051, 1996)

Zellen, die durch den programmierten Zelltod sterben weisen charakteristische äußere Merkmale auf. Solche Zellen runden sich ab, verlieren Microvilli, schrumpfen, ihr Zellkern verdichtet sich, es kommt zur Chromatinkondensation und die Membran bildet Bläschen (*membrane-blebbing*), wobei die so genannten *apoptotic bodies* entstehen, die sich von der Zelle abschnüren und trennen<sup>9</sup>. Der apoptotische Prozeß endet mit der schnellen Resorption der apoptotischen Zelle durch benachbarte Zellen<sup>8</sup>.

Eine andere Form des Zelltodes ist die Nekrose. Die Nekrose ist ein eher passiver Vorgang, bei der es sich um einen unkontrollierten Prozeß handelt, der z.B. als Folge einer akuten Verletzung stattfindet. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen schwellen nekrotische Zellen an und platzen, wobei sie ihren Inhalt über Nachbarzellen verschütten und damit schädliche Entzündungen verursachen können.

Ein weiteres Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes ist die Fragmentierung der DNA, welche am Ende von komplexen Signalkaskaden steht und von Nukleasen ausgeführt wird. Ausgelöst wird die Apoptose durch diverse Faktoren, wie FasL (*Fas ligand*), TNF (*tumor necrosis factor*), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), genotoxische Agenzien wie Medikamente zur Krebsbehandlung und  $\gamma$ -Strahlung sowie oxidativen Stress<sup>10,11</sup>.

# **1.2 Apoptotische DNA-Fragmentierung**

Wie bereits erwähnt, ist ein Kennzeichen der Apoptose die Degradierung der zellulären DNA. Dafür sind zwei unterschiedliche und voneinander unabhängige Systeme beschrieben worden, die beide nacheinander stattfinden. Zuerst findet eine zellautonome DNA-Fragmentierung statt, bei der Nukleasen der sterbenden Zelle selbst eine Rolle spielen. Anschließend kommt es zum DNA-Abbau durch die lysosomale DNase II $\alpha$ , nachdem sterbende Zellen von Fresszellen (Macrophagen) phagocytiert wurden (s. Abb. **1-2**)<sup>10,11</sup>.



#### Phagocytierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen

Abb. 1-2: Apoptotische DNA-Fragmentierung: Nachdem Zellen einen apoptotischen Stimulus erhalten haben, wird eine Kaskade von Caspasen aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von zelleigenen Proteasen und Nukleasen führt. Die hier beteiligten Enzyme sind CAD, GAAD, DNase  $\gamma$ , Cyclophilin E, DNase I und EndoG. Dabei wird die DNA auf etwa 200 Basenpaare lange Stücke abgebaut (Zellautonome DNA-Fragmentierung). Sterbende Zellen exponieren Phosphatidylserin an der Zelloberfläche als ein Signal für Makrophagen, sie zu phagocytieren. In den Makrophagen werden die Zellen (grün) von Lysosomen (blau) aufgenommen, und ihre DNA wird durch DNase II $\alpha$  weiter degradiert. Ebenfalls am Verdau von extrazellulärer DNA beteiligt ist sekretierte DNase I (*waste-management*). Modifiziert nach Nagata S., Annu. Rev. Immunol. 2005; 23:853-75

Der erste Teil der apoptotischen DNA-Fragmentierung, bei der Nukleasen der sterbenden Zelle beteiligt sind, ist an sich schon in zwei Stufen unterteilt. Zuerst wird die chromosomale DNA in 50 kb-300 kb große Fragmente gespalten. Diese Fragmente stellen chromosomale DNA-Schleifen, die von der Kernmatrix abgeschnitten wurden, dar<sup>12</sup>. In der Literatur sind eine Reihe von Faktoren und Enzymen mit Nukleaseaktivität angegeben, von denen man annimmt, dass sie an diesem Prozeß beteiligt sind. Zu nennen wären da Topoisomerase II $\alpha$ , CAD (*caspase-activated DNase*) bzw. DFF (*DNA fragmentation factor*), AIF (*apoptosis inducing factor*) und EndoG (Endonuklease G). Es existieren mehrere Modelle von der Art und Weise, in der diese Enzyme bei dieser Form der DNA-Fragmentierung eine Rolle spielen. Eines besagt, dass CAD und Topoisomerase II $\alpha$ , die an der Basis der chromosomalen DNA-Schleifen lokalisiert ist, dabei interaktiv zusammenarbeiten. Dabei wird angenommen, dass Topoisomerase II $\alpha$  lediglich eine unterstützende, aber nicht notwendige Funktion hat<sup>10</sup>. Es wurde aber auch gezeigt, dass Topoisomerase II $\alpha$  selbständig, also ohne CAD, die chromosomalen DNA-Schleifen spalten kann<sup>13</sup>.

Die zweite Stufe der apoptotischen, chromosomalen DNA-Spaltung ist die internukleosomale Spaltung. Dabei werden die von der Kernmatrix abgeschnittenen DNA-Schleifen zu oligonukleosomalen DNA-Fragmenten degradiert. Die Ziele der hier wirkenden apoptotischen DNasen sind die Linkerregionen, welche die einzelnen Nukleosome verbinden. Dementsprechend haben die dabei entstehenden Spaltprodukte eine Länge von ca. 200 bp (das entspricht in etwa der Anzahl von Basenpaaren in einem Nukleosom) und einem vielfachen von 200 bp, was zu einer so genannten DNA-Leiter führt. Der Begriff "DNA-Leiter" leitet sich von dem Erscheinungsbild der Spaltprodukte auf einem Gel nach elektrophoretischer Trennung ab, bei dem die DNA-Banden in regelmäßigen Abständen, wie die Sprossen einer Leiter, erscheinen. Auch an dieser zweiten Stufe der apoptotischen DNA-Fragmentierung sind mehrere Nukleasen beteiligt, nämlich DNase I, CAD und EndoG<sup>14,15</sup>.

In der Literatur werden noch weitere Enzyme genannt, die die DNA bei Apoptoseauslösung spalten. Dabei handelt es sich um Cyclophilin E (CYP-13), DNase $\gamma$  und eine Granzym A-aktivierte DNase (GAAD) bzw. NM23-H1<sup>16-18</sup>.

Der nächste und abschließende Teil des apoptotischen DNA-Abbaus findet durch lysosomale DNase II $\alpha$  statt, die von den Lysosomen der Zellen stammt, die die apoptotischen Zellen phagocytieren. Dabei wird die DNA zu einzelnen Nukleotiden gespalten. Um diese Art der apoptotischen DNA-Fragmentierung von der zellautonomen durch z.B. CAD oder EndoG zu unterscheiden, hat man hier den Begriff "unterstützende" (*auxiliary*) DNA-Fragmentierung eingeführt<sup>9,19,20</sup>. Da DNase II $\alpha$  für die Handhabung bzw. Entsorgung des "DNA-Restmülls" zuständig ist, hat man ihr den Beinamen "*waste-management nuclease*" gegeben<sup>10,11</sup>. Allerdings gibt es auch Studien, die besagen, dass sekretierte DNase I ebenfalls eine "*waste-management nuclease*" ist. Der Verdau extrazellulären Chromatins ist in DNase I defizienten Mäusen beeinträchtigt und diese Tiere entwickeln anti-Chromatin Autoimmunität und Glomerulonephritis<sup>21</sup>.

Auf die Frage, warum so viele unterschiedliche Nukleasen/Enzyme an der apoptotischen DNA-Fragmentierung beteiligt sind, gibt es bis heute keine definitive Antwort. Zum Teil kann die Diversität der apoptotischen Nukleasen erklärt werden, wenn die Expression der Enzyme in verschiedenen Zelltypen und Differenzierungsstadien unterschiedlich ist <sup>22-24</sup>.

# 1.3 Signalwege zur apoptotischen DNA-Fragmentierung durch zelleigene Nukleasen

Wesentlicher Bestandteil der meisten apoptotischen Signalwege ist die Proteasefamilie der Caspasen<sup>25</sup>. Caspasen spalten ihre Zielproteine nach spezifischen Aspartatresten. Sie liegen erst als inaktive Procaspasen vor, und werden selber durch Spaltung nach Aspartatresten, durch sich selbst oder durch andere Caspasen, aktiviert. Im Verlauf der Apoptose findet die Aktivierung der Caspasen in einer proteolytischen Kaskade statt, bei der die Caspasen sich gegenseitig nacheinander aktivieren. Je nachdem wo in dieser Kaskade sich die Caspasen befinden, spricht man von *initiator*- (am Beginn) und nachfolgenden *downstream*-Caspasen. Einige aktivierte Caspasen spalten andere spezifische Proteine der Zelle (z.B. Zellstrukturproteine) und tragen damit zum Zelltod bei, andere aktivieren wiederum Nukleinsäuren-degradierende Enzyme.

Nicht alle bekannten Caspasen sind an der Apoptose beteiligt, sondern haben eine Funktion bei anderen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Überleben. Außerdem wird einigen Caspasen eine Rolle im Immunsystem zugeschrieben<sup>26</sup>.

In Abb. **1-3** ist eine vereinfachte Übersicht einer durch Apoptose verursachten, zellautonomen DNA-Fragmentierung durch die Nukleasen GAAD (NM23-H1), CAD und EndoG dargestellt. Das Selbstmordprogramm einer Zelle kann über sich in der Zellmembran befindlichen Rezeptoren wie Fas und Rezeptoren für TNF gestartet werden. Nach einer Aktivierung dieser Rezeptoren durch ihre Liganden binden sie auf der Innenseite der Membran Proteine, mit denen sie einen Komplex, den *death-inducing signaling complex* (DISC), bilden<sup>27,28</sup>. Von diesem Komplex wird Procaspase 8 rekrutiert, aktiviert und als Caspase 8 in die Zelle freigegeben. Caspase 8 hat nun die Möglichkeit direkt Procaspase 3 durch Proteolyse in Caspase 3 umzuwandeln. Caspase 3 wiederum bewirkt eine Freisetzung





Abb. 1-3: Signalwege zellautonomen **DNA-Fragmentierung:** Gezeigt mehrere zur sind Signaltransduktionswege, die zur DNA-Spaltung im Zellkern führen. Die hier dargestellten Caspase-abhängigen Wege gehen von der zum DISC gehörenden Caspase 8 aus. Diese kann einerseits Procaspase 3 aktivieren, welche dann zu einer Aktivierung von CAD führt, indem sie das sich mit CAD in einem inaktiven Komplex befindliche ICAD spaltet, woraufhin CAD freigesetzt wird. CAD spaltet in Folge dessen die DNA. Der andere Caspase-abhängige Weg zur apoptotischen DNA-Fragmentierung führt über die Mitochondrien: Caspase 8 spaltet Bid zu tBid. tBid führt zu einer Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran. Cyochrom c wird aus den Mitochondrien freigesetzt und bildet mit Apaf-1 und Caspase 9 ein Apoptosom. Procaspase 3 wird aktiviert und Caspase 3 führt zur Aktivierung von CAD. Ein anderes, aus den Mitochondrien entlassenes Enzym ist EndoG, welches selbständig chromosomale DNA spalten kann. Man vermutet, dass EndoG in der inneren Mitochondrienmembran integriert ist, was bedeutet, dass die Porenbildung in der äußeren Membran für eine Entlassung aus den Mitochondrien nicht ausreicht (verdeutlicht durch gestrichelte Linien). Die aus cytotoxischen T-Lymphozyten stammenden Proteasen GzmA und GzmB können Caspase-unabhängige, apoptotische DNA-Fragmentierung bewirken. Dabei spalten sie die Inhibitoren apoptotischer DNasen, so dass diese aktiviert werden. IGAAD wird von GzmA gespalten und GzmB kann, wie auch schon Caspase 3, ICAD spalten. Eine weitere Möglichkeit zur apoptotischen DNA-Fragmentierung bietet das Protein Bim. Dissoziiert Bim während der Apoptose von den Mikrotubuli, dann setzt es proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c und, durch einen nicht bekannten zusätzlichen Mechanismus, EndoG aus den Mitochondrien frei.

von nukleolytisch aktivem CAD aus einem inaktiven Komplex von CAD und ICAD (inhibitor of CAD), welches dann DNA spalten kann. Bei diesem Weg zur DNA-Fragmentierung handelt es sich um den so genannten death receptor pathway. Eine andere Möglichkeit für Caspase 8 ist die Spaltung von Bid (BH3 interacting domain death agonist), einem Mitglied der bel-2-Familie, zu aktivem tBid (truncated Bid), womit ein mitochondrialer Weg zur DNA-Fragmentierung eingeleitet wäre<sup>29</sup>. tBid führt zu einer Dimerisierung des zur proapoptotischen Familie gehörenden BAX (Bcl2-associated X entstandene BAX-BAX-Homodimer bildet in protein). Das der äußeren Mitochondrienmembran eine Pore und ermöglicht damit die Freisetzung diverser mitochondrialer Proteine<sup>30</sup>. Aus den Mitochondrien entlassenes Cytochrom c aktiviert zusammen mit Apaf-1 (apoptosis activating factor-1) Procaspase 9. Der Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und Caspase 9 wurde ursprünglich als das Apoptosom bezeichnet. Inzwischen ist man dazu übergegangen solche Proteinkomplexe, die nach Beginn der Apoptose die Aktivierung einer Initiatorcaspase einleiten allgemein als Apoptosome zu bezeichnen, dementsprechend ist der oben erwähnte DISC auch ein Apoptosom<sup>31,32</sup>. Die durch den Cytochrom c/Apaf-1 Komplex aktivierte Caspase 9 wiederum ist wie die schon erwähnte Caspase 8 ein Aktivator von Caspase 3, womit wieder eine Auflösung des CAD/ICAD-Komplexes und damit eine DNA-Degradierung ermöglicht wird.

Andere, aus den Mitochondrien freigelassene Proteine, sind EndoG und AIF, wobei nach den Erkenntnissen von Uren *et al.* lediglich Poren in der äußeren Mitochondrienmebran hierfür nicht ausreichend seien und es zurzeit unklar sei, wie der Mechanismus der Freilassung von Endonuklease G und AIF aus den Mitochondrien vonstatten geht<sup>33</sup>. Beide Proteine können Apoptose in einer Zelle auslösen und EndoG ist selbst fähig, chromosomale DNA zu spalten<sup>34-37</sup>.

Inzwischen sind auch einige Caspase-unabhängige Wege zur apoptotischen DNA-Spaltung bekannt. Zu diesen Wegen gehören die, an denen die Granzyme A (GzmA) und B (GzmB) aus Cytotoxischen T Lymphozyten (CTL) beteiligt sind<sup>17,38</sup>. CTL können bei Virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen Apoptose auslösen, wobei sie unter anderem Perforin freisetzen. Perforin bildet in der Zellmembran der Zielzellen Poren, durch die andere CTL-Proteine, wie z.B. GzmA und GzmB eindringen können. GzmA ist ein Aktivator der apoptotischen Nuklease GAAD bzw. NM23-H1. GAAD befindet sich in der Zelle in einem Komplex mit ihrem spezifischen Inhibitor IGAAD (*inhibitor of GAAD*) bzw. SET. Die Aktivierung von GAAD durch GzmA erfolgt durch Spaltung von IGAAD, woraufhin aktives GAAD

freigesetzt wird. Analog dazu kann CAD durch Granzym B aktiviert werden, indem ICAD gespalten wird, womit der gleiche Effekt wie durch Caspase 3 (s. o.) erreicht wird.

Ein weiteres Protein, das zu einer Caspase-unabhängigen DNA-Fragmentierung beiträgt, ist Bim (*bcl-2 interacting mediator of cell death*). Bim gehört ebenso wie Bid zur bcl-2-Familie und kann, wie dieses, durch Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran dazu beitragen, dass Cytochrom c und EndoG aus den Mitochondrien freisetzbar sind<sup>35</sup>. Im Gegensatz zu Bid, welches durch Caspase 8 aktiviert wird, wird die apoptotische Aktivität von Bim durch dessen Dissoziation von den Mikrotubuli während der Apoptose reguliert und ist Caspase-unabhängig<sup>39</sup>.

## 1.4 Die Endonuklease G (EndoG)

EndoG ist eine evolutionär konservierte, im Zellkern kodierte Endonuklease, die über eine N-terminale, mitochondriale Lokalisationssequenz verfügt und zu den DNA/RNA unspezifischen  $\beta\beta\alpha$ -metal-Finger Nukleasen gehört<sup>9,34</sup>. Erstmals isoliert wurde EndoG 1987 aus Hühner-Erythrozyten-Kernen und es wurde gezeigt, dass diese Endonuklease bevorzugt (dG)n·(dC)n Abschnitte der DNA spaltete, wobei die Spaltungsrate beim G-Strang 4-10mal höher lag als beim C-Strang, woraus der Name Endonuklease **G** resultierte<sup>40</sup>. Im Zusammenhang mit ihrer mitochondrialen Lokalisation, wurde angenommen, dass EndoG an der mitochondrialen DNA-Replikation beteiligt sei <sup>41</sup>. Inzwischen geht man allerdings nicht mehr davon aus. Ein wesentlicher Punkt, der gegen eine Beteiligung von EndoG an mitochondrialer DNA-Replikation spricht, ist der, dass EndoG im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert ist, wohingegen die mitochondriale DNA-Replikation in der Matrix stattfindet<sup>42</sup>.

Eine weitere Funktion, die EndoG zugeteilt wurde, ist die Initiation von genomischen Inversionen im *herpes simplex*-Virus Typ1<sup>43</sup>. Durch RNAi *knockout*-Versuche bestätigte die gleiche Arbeitsgruppe 2006 diese Ergebnisse nochmals und stellte dabei außerdem fest, dass EndoG auch für die normale Zellproliferation nötig ist<sup>44</sup>. Diese Arbeitsgruppe schloß es aber nicht aus, dass EndoG möglicherweise nur eins von mehreren Proteinen ist, das für die von ihnen beobachteten Effekte verantwortlich ist.

Andere biochemische Studien, aus dem Jahr 2001, identifizierten EndoG als eine zellautonome, apoptotische Nuklease, die dazu fähig sei DNA in solchen Zellen zu spalten, denen ein CAD System fehlt, wobei das Protein von den Mitochondrien in den Zellkern gelange, ohne dass eine vorherige Aktivierung von Caspasen nötig sei<sup>35</sup>. Widersprüchlich

dazu berichtete eine andere Arbeitsgruppe, dass es auch für EndoG nötig sei, dass Caspasen aktiviert werden, bevor es aus den Mitochondrien entlassen wird<sup>45</sup>.

Im Wurm *C. elegans*, in dem es das CAD System nicht gibt, interagiert das EndoG Homolog CPS-6 mit sieben Proteinen (unter anderem mit dem AIF Homolog WAH-1) wobei ein Multienzymkomplex gebildet wird, dass als *degradosome* (in der ursprünglichen Veröffentlichung eigentlich *degradeosome*) bezeichnet wird<sup>9,16,46</sup>. Eine Reduktion der CPS-6-Aktivität, führt zu einer Beeinträchtigung des DNA-Abbaus und einer Verzögerung der Apoptose<sup>16</sup>.

Was die Wichtigkeit von EndoG in Säugern betrifft, so hat es zwei Untersuchungen an EndoG-*knockout* Mäusen gegeben, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. In der ersten Studie wurde berichtet, dass EndoG-defiziente Mäuse schon in der frühen Phase der Embryogenese sterben<sup>47</sup>. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete zwei Jahre später, dass EndoG-defiziente Mäuse lebensfähig sind, wobei sie außerdem darauf hinwiesen, dass in der vorherigen Studie ein konserviertes Gen, dessen Funktion unbekannt ist, und das mit dem Gen von EndoG überlappt ebenfalls "ausgeschaltet" worden war<sup>48</sup>. Wenn das Produkt dieses besagten Gens essentiell wäre, so würde das die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien erklären und außerdem zeigen, dass EndoG in Säugern (bzw. Mäusen) nicht lebenswichtig ist.

In der hier schon mehrfach zitierten Arbeit von Li *et al.* 2001, wird die Theorie aufgestellt, dass EndoG dafür verantwortlich ist, dass es in Mäusezellen, denen das Chaperon für CAD (ICAD bzw. DFF45) fehlt, dennoch zu einer residuellen DNA-Fragmentierung kommt. Auch eine neuere Untersuchung (Ishihara & Shimamoto, 2006) hat ergeben, dass EndoG während der Apoptose zumindest teilweise für die DNA-Fragmentierung im Zellkern verantwortlich ist<sup>49</sup>.

Eine weitere Theorie zur Rolle von EndoG in der Apoptose ist die, dass EndoG (auch) für den RNA-Abbau verantwortlich sei, wobei darauf verwiesen wird, dass EndoG *in vitro* bevorzugt RNA gegenüber doppelsträngiger DNA spalte<sup>50</sup>.

Was den Stand der Wissenschaft EndoG betreffend angeht, kann man sagen, dass es noch weiterer Untersuchungen bedarf, um die Rolle von EndoG in der Apoptose, oder auch den anderen ihr zugeteilten Funktionen, zu verstehen<sup>9,51</sup>. Gewiss würde es förderlich sein, wenn die dreidimensionale Struktur des Enzyms bekannt wäre. Allerdings, ist es noch nicht gelungen aktive EndoG Präparationen herzustellen, die die entsprechenden Voraussetzungen für derartige Untersuchungen, wie hohe Reinheit und hohe Konzentration erfüllen.

#### **1.4.1** EndoG (bovine) Eckdaten

- Lokalisation: Im Organismus ubiquitär, in der Zelle mitochondrial
- Volle Länge: 299 Aminosäurereste (AS) (Sequenz im Anhang)
- Molekulargewicht bei voller Länge: 32.3 kDa
- N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz: AS 1-48
- Prozessierte Länge: 252 AS
- Molekulargewicht nach Prozessierung: 27.5 kDa
- Aktivität: DNA/RNA-unspezifisch; Einzelstrangspaltung (nicking)
- pH Optimum: pH 5.5-8.0
- Benötigt divalente Kationen als Kofaktor: Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> in Konzentrationen um 2.5 mM
- Dreidimensionale Struktur: Modell (Abbildung 5-1 im Anhang)
   Gelchromatographische Untersuchungen haben ergeben, dass EndoG sich in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht befindet, wobei es als Dimer zwei voneinander unabhängige aktive Zentren besitzt (Schäfer *et al.* 2004)<sup>34</sup>

## **1.5 Die Desoxyribonuklease Πα (DNase Πα)**

Interessanterweise scheint die zellautonome DNA-Fragmentierung in solchen Organismen, die über einen intakten Phagocytierungsmechanismus der apoptotischen Zellen durch Makrophagen verfügen, nicht lebenswichtig zu sein. Die DNase II $\alpha$  der Makrophagen scheint nämlich dazu imstande zu sein, auch ohne eine "Vorarbeit" durch zellautonome Nukleasen die DNA einer sterbenden und phagocytierten Zelle vollständig zu degradieren<sup>20,52</sup>.

Bei der lysosomalen DNase II $\alpha$ , auch bekannt als *spleen acid DNase* oder *acid DNase*, handelt es sich um eine Endonuklease, die im Organismus ubiquitär und auf zellulärer Ebene in den Lysosomen lokalisiert ist<sup>53</sup>. Das Enzym hat die höchste Aktivität bei saurem pH (in etwa pH 4.5-5.5) und spaltet das Phosphodiesterrückgrat von DNA durch einen Einzelstrang Spaltmechanismus (*nicking*), so dass 3'-Phosphat Termini entstehen, wobei es, im Gegensatz zu den meisten anderen bekannten Nukleasen, keine divalenten Metallionen als Kofaktoren benötigt<sup>54-57</sup>. Entdeckt wurde DNase II $\alpha$  schon vor über 50 Jahren und seitdem hat es viele Studien gegeben, die sich mit den enzymatischen Eigenschaften und den biologischen Rollen des Enzyms und ihrer Homologe aus verschiedenen Tieren befasst haben<sup>56,58,59</sup>. Es ist mehrfach berichtet worden, dass wie schon in Abschnitt **1.2** erwähnt, die DNase II $\alpha$  der

Säugetiere an der Apoptose beteiligt ist, indem sie die chromosomale DNA apoptotischer Zellen abbaut, nachdem diese von Makrophagen aufgenommen wurden<sup>19,60,61</sup>.

Das Prinzip dieser sogenannten unterstützenden DNA-Fragmentierung wurde auch in *C. elegans* bei Untersuchungen des DNase II $\alpha$  Homologs nuc-1 beobachtet. Dabei wurde gezeigt, dass es in nuc1-defizienten Wurmmutanten zu einer Ansammlung von unverdauten Zellkernen apoptotischer Zellen in phagocytierenden Zellen kam<sup>62</sup>.

Ebenso ist gezeigt worden, dass die DNase II $\alpha$  essentiell ist für den Verdau von ausgestoßenen Zellkernen, während der Erythropoese in Mäusen und weiterhin, dass ein *knockout* der DNase II $\alpha$  in Mäusen, zu einer lethalen Anämie durch eine Interferon- $\beta$ Produktion während der Embryonalphase führt<sup>52,63,64</sup>. Ein *knockout* des Interferon Gens verhindert in DNase II $\alpha$  defizienten Mäusen zwar den Tod, allerdings führt die Ansammlung der DNA, die dem Verdau durch Makrophagen entkommt, zu einer chronischen Polyarthritis<sup>65</sup>.

Trotz der Tatsache, dass DNase II $\alpha$  schon so lange bekannt und essentiell ist und schon viel Forschungsarbeit in sie investiert wurde, ist die funktionelle Organisation des Enzyms, insbesondere die der aktiven DNase II $\alpha$  Spezies, noch größtenteils unbekannt. Zwei Arbeiten im Jahr 1998 deuteten, zum einen für die DNase II $\alpha$  des Schweines und zum anderen für die humane DNase II $\alpha$  darauf hin, dass sie als Vorläufer-Polypeptidkette prozessiert und dabei in drei Peptide gespalten wird, von denen zwei durch Disulfidbrücken verbunden bleiben<sup>66,67</sup>. Diese Prozessierung wurde kürzlich für die DNase II $\alpha$  aus dem Schwein, in einer Arbeit, die die Involvierung von Histidinresten im katalytischen Mechanismus behandelte, bestätigt<sup>68</sup>. Im Gegensatz dazu haben spätere Untersuchungen an der humanen DNase II $\alpha$  ergeben, dass diese als eine kontinuierliche, an vier Asparaginresten glykosilierte, Polypeptidkette aktiv ist, wobei es sich dennoch um eine prozessierte Form handelt, da ein N-terminales Signalpeptid, (Aminosäurereste 1-18) abgespalten wird<sup>57,69</sup>.

In einer Arbeit von Cymerman *et al.* 2005, wurde vorgeschlagen, dass DNase II $\alpha$  ein Mitglied der so genannten Phospholipase D (PLD) Superfamilie ist, und über ein C-terminales, möglicherweise noch ein zusätzliches N-terminales Motiv (HxK) verfügt, welches charakteristisch für diese Superfamilie ist. Darüber hinaus wurden zwei Homologiemodelle vorgeschlagen, bei denen die aktive Spezies der DNase II $\alpha$  in dem einem Modell ein Homodimer und in dem anderen ein Monomer (Pseudodimer) darstellt (näher erläutert in der Diskussion)<sup>70</sup>.

#### 1.5.1 DNase IIa (humane) Eckdaten

- Lokalisation: Im Organismus ubiquitär, in der Zelle lysosomal
- DNase IIa wird an vier Asparaginresten glykosiliert
- Volle Länge: 360 AS (Sequenz im Anhang)
- Molekulargewicht bei voller Länge (ohne Glykosylgruppen): 39.6 kDa
- N-terminale lysosomale Lokalisationssequenz: AS 1-18
- Prozessierte Länge: 342 AS
- Molekulargewicht nach Prozessierung (ohne Glykosylgruppen): 37 kDa
- Molekulargewicht prozessiert und glykosiliert: 45 kDa
- Aktivität: Phosphodiesteraseaktivität; Spaltet DNA einzelsträngig (nicking)
- pH Optimum: pH 4.5-5.5
- DNase IIα ist ohne divalente Kationen als Kofaktoren aktiv. Sie verfügt daher über eine so genannte "EDTA-Resistenz"
- Dreidimensionale Struktur: Modell (Abbildung **5-2** im Anhang) (Schäfer *et al.* 2007)<sup>71</sup>

# **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei unterschiedliche Projekte. Ziel des ersten Projektes war, aktive EndoG in hohen Konzentrationen herzustellen, um sie zugänglich für Strukturanalysen zu machen. Dafür sollte das Enzym in *E. coli* überexprimiert und Reinigungsprotokolle etabliert werden. Es war schon bekannt, dass EndoG dabei zuerst in unlöslicher und inaktiver Form gewonnen wird. Daher wurden zahlreiche Methoden eingesetzt, um gegen das Löslichkeitsproblem vorzugehen.

Das zweite Projekt hatte direkten Bezug zur Arbeit von Cymerman *et al.* 2005. Dort wurden durch bioinformatische Methoden zwei mögliche Modelle der aktiven Spezies der DNase II $\alpha$  präsentiert. Um eines dieser Modelle zu bestätigen, sollte in dieser Arbeit durch biochemische Methoden das aktive Zentrum der Nuklease charakterisiert werden. Dabei ging es unter anderem darum herauszufinden, ob in der Polypeptidkette der DNase II $\alpha$  nur ein einziges C-terminales, oder aber auch ein weiteres N-terminales katalytisch relevantes HxK Motiv zu finden ist. Das aktive Zentrum bekannter Enzyme der PLD Superfamilie setzt sich stets aus zweien solcher Motive zusammen, und die Existenz von zwei tatsächlich für die Aktivität des

Enzyms essentiellen HxK Motiven in einem DNase IIa Molekül, wäre ein entscheidender Hinweis auf eine monomere (pseudodimere) Struktur der aktiven DNase IIa Spezies<sup>72</sup>.

# 2 Materialien und Methoden

# 2.1 Materialien

## **2.1.1** Geräte

Die Folgende Liste umfasst einen Teil der verwendeten Geräte. Viele Geräte oder Ausrüstungsgegenstände, die zu einer Standardausrüstung von biochemischen Laboratorien gehören, wie z.B. Flockeneisbereiter, Brutschränke, Pipettierhilfen und Gefäße aller Art sind nicht aufgelistet.

Autoklav	Tecnomara/Integra Biosciences
Blotter BlueFlash Semy-dry	Serva
DNA Thermal Cycler Geneamp <sup>®</sup> 2400	Perkin Elmer Applied Biosystems
DNA Thermal Cycler Tpersonal	WhatmanBiometra®
Elektrophoresekammern (diverse)	Biometra, Keutz, Owl, Polymehr und Serva
Elektrophoresenetzgeräte EPS 500/400, 600, 3500 XL	Pharmacia Biotech
Elektroporationsküvetten	Peqlab
Elektroporator Easyject	EquiBio
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss
Geldokumentationsanlage BioDocAnalyze	Biometra
Gyrotory-Rotationsschüttler 676	New Brunswick Scientific
Heizblock Dri-Block <sup>®</sup> DB-3	Techne
Konfocales <i>laser scanning</i> Mikroskop TCS4D	Leica
Kühlzentrifugen Centrifuge GS-6R, J6-HC und J2-HS	Beckman
Magnetrührer REO	Janke & Kunkel/Ikamak <sup>®</sup>
pH-Messelektrode N6280	Schott
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Reinstwasseranlage PRO 90 CN	Seralpur
Spectrophotometer U-3000 und U-1100	Hitachi
Sterilbank Bio48	Faster
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf
Tischzentrifuge Sorvall <sup>®</sup> MC12V	Du Pont
Ultraschallanlage Sonifier 250	Branson
Vakuumzentrifuge Hetovac VR-I	Heto (High technology of Scandinavia)

## 2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi oder für die Molekularbiologie.

40 %-Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1	AppliChem
Agar Invitrogen <sup>TM</sup> life technolog	
Agarose	Invitrogen <sup>TM</sup> life technologies
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Cobaltsulfat	Merck
Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue R250	Serva
DMEM-Medium	Gibco Life Technologies
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas
dNTPs	Peqlab
DTT	AppliChem
EDTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EZview™ Red ANTI-FLAG <sup>®</sup> M2 Affinity Gel	Sigma
EZview™ Red ANTI-HA <sup>®</sup> Affinity Gel	Sigma
Fötales Kälberserum	Gibco Life Technologies
Glutathion (reduziert)	Merck
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Glycogen	Roche
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Gibco Life Technologies
HEPES	AppliChem
Höchst 33342	Invitrogen
Imidazol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kupfersulfat	Merck
Lubrol	Sigma
LysoTracker <sup>®</sup> Red DND-99	Invitrogen
Magermilchpulver	Saliter
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck
MES	AppliChem
Methanol	Merck

Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco Life Technologies
PMSF	AppliChem
Protease Inhibitor Cocktail Tableten	Roche
Salzsäure	Merck
SDS	Serva
TEMED	Merck
Tetracyclin-Hydrochlorid	AppliChem
Transfast <sup>TM</sup> Transfection reagent	Promega
Tris	AppliChem
Triton X 100	Merck
Tween <sup>®</sup> 20	Merck
Wasserstoffperoxid	Roth
β-Cyclodextrin	AppliChem

## 2.1.3 Kitts

Nucleobond <sup>®</sup> AX	Macherey-Nagel
iFOLD <sup>TM</sup> Protein Refolding System 1	Novagen
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen

## 2.1.4 Enzyme

Die in der Tabelle **2-1** aufgelisteten Restriktionsendonukleasen wurden, wenn nicht gesondert beschrieben, mit den dazugehörigen Puffern, nach Empfehlung der Lieferanten verwendet.

Enzym	Erkennungssequenz	Lieferant
AclI	5´-AA↓CG TT-3´ 3´-TT GC↑AA-5´	New England Biolabs
BamHI	5´-G↓GATC C-3´ 3´-C CTAC↑C-5´	MBI Fermentas
BseMI	5´-GCAATG NN↓-3´ 3´-CGTTAC↑NN -5´	MBI Fermentas
Bsh1236I	5´-CG↓CG-3´ 3´-GC↑GC-5´	MBI Fermentas
DpnI	5´-GAm↓T C-3´ 3´-CT ↑AmG-5´	MBI Fermentas
EcoRI	5´-G↓AATT C-3´ 3´-C TTAA↑G-5´	New England Biolabs
Eco47III	5´-AGC↓GCT-3´ 3´-TCG↑CGA-5´	MBI Fermentas
Нру99І	5´-↓CGWCG -3´ 3´- GCWGC↑-5´	New England Biolabs
KasI	5´-G↓GCGC C-3´ 3´-C CGCG↑G-5´	New England Biolabs
KpnI	5´-G GTAC↓C-3´ 3´-C↑CATG G-5´	New England Biolabs
MslI	5´-CAYNN↓NNRTG-3´ 3´-GTRNN↑NNYAC-5´	New England Biolabs
NcoI	5´-C↓CATG G-3´ 3´-G GTAC↑C-5´	MBI Fermentas
NdeI	5´-CA↓TA TG-3´ 3´-GT AT↑AC-5´	New England Biolabs
NheI	5´-G↓CTAG C-3´ 3´-C GATC↑G-5´	New England Biolabs
NotI	5´-GC↓GGCC GC-3´ 3´-CG CCGG↑CG-5´	MBI Fermentas
NruI	5´-TCG↓CGA-3´ 3´-AGC↑GCT-5´	MBI Fermentas
PauI	5´-G↓CGCG C-3´ 3´-C GCGC↑C-5`	MBI Fermentas
Scal	5´-AGT↓ACT-3´ 3´-TCA↑TGA-5´	MBI Fermentas
XhoI	5´-C↓TCGA G-3´ 3´-G AGCT↑C-5´	New England Biolabs

Tab. 2-1: Verwendete Restriktionsendonukleasen

 $\downarrow$  und  $\uparrow$ : Schnittstellen der Enzyme

N: G, A, T oder C; Y: C oder T; R: G oder A; W: A oder T; m: methyliert

Andere zum Einsatz kommende Enzyme stammten von den folgenden Lieferanten:

T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Pfu DNA Polymerase	Eigenherstellung
Taq DNA Polymerase	Eigenherstellung
Thrombin	Amersham Biosciences

## 2.1.5 Antikörper

Für immunologische Nachweise von Proteinen im Anschluss an Western *blots* wurden folgende Antikörper bzw. Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugate eingesetzt.

Antikörper	Erkennungsepitop	Lieferant
Monoclonaler ANTI-FLAG <sup>®</sup> M2- Peroxidase (HRP) Antikörper	FLAG-tag (DYKDDDDK)	Sigma
produziert in Maus	(DTRDDDDR)	
Monoklonaler anti-[HA]-Antikörper	HA-Tag	Roche
(Klon 12CA5) produziert in Maus	(YPYDVPDYA)	

## 2.1.6 Materialien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien wie DMEM, *cell culture tissue plates*, 1x PBS, Penicillin/Streptomycin-Lösung und alle in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen (s. **2.1.7**) wurden freundlicher- und dankenswerterweise vom Institut für Genetik des Fachbereichs 08 der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Verwendete eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Lieferant
COS-1	Nierenepithelzellen von Ceropithecus aethiops;	American Type Culture
	SV-40 transformiert	Collection (ATCC)
cv1	Normale Nierenepithelzellen von Ceropithecus	ATCC
	aethiops	
HEK-	Humane Embryonennierenzellen; Transformiert	ATCC
293-Т	mit SV-40 Antigen	
HeLa	Humane Gebärmutterhalskrebszellen	ATCC
LNCaP	Humane Prostatakrebszellen	ATCC
NIH/3T3	Embryonenfibroblastenzellen von Mus musculus	ATCC

## 2.2 Mikrobiologische Arbeiten

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Bakterien unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Die benötigten Gebrauchsgegenstände sowie auch die verwendeten Medien wurden vor Gebrauch für 30 min unter Druck bei 120 °C autoklaviert und die Arbeiten fanden an einer sterilen Werkbank statt.

#### 2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von E. coli Stämmen

Zur Anzucht der verwendeten *E. coli* Stämme (s. **2.2.2**) wurde das Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) benutzt.

LB-Medium: 10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, mit NaOH auf pH 7.5 einstellen, ad 11 H<sub>2</sub>OF

Das LB-Medium wurde auch als Festmedium in Petrischalen verwendet, wobei diesem vorher Bacto-Agar (1.5% (w/v)) zugesetzt wurde. Um das Wachstum von unerwünschten Bakterien zu verhindern, wurden daraus sogenannte Selektivplatten hergestellt, indem es nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit Antibiotika versetzt wurde.

Um Flüssig-Selektivmedien herzustellen, wurde dem agarlosen LB-Medium kurz vor dem Gebrauch Antibiotika hinzugefügt.

Die Endkonzentration der Antibiotika in den Agarplatten betrug bei Ampicillin 150  $\mu$ g/ml und bei Tetracyclin 10  $\mu$ g/ml. In den Flüssig-Medien hatte Ampicillin eine Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml und Tetracyclin 10  $\mu$ g/ml.

### 2.2.2 E. coli Stämme

Für Klonierungen und die Herstellung von Plasmidpräparationen wurde der *E. coli* Stamm **XL1BlueMRF+** der Firma Stratagene eingesetzt. Dieser besitzt den folgenden Genotyp: **XL1BlueMRF:** ( $\Delta(mcrA)$ 183  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 endA1 sup-E44 thi-1 recA1

#### *lac* [F'*proAB* lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15Tn10(Tet<sup>r</sup>)])

Für die Expression der Endonuklease G wurde der *E. coli* Stamm **BL21-Gold (DE3)** (Stratagene) benutzt. Der Genotyp des Stammes ist folgender:

**BL21-Gold (DE3):** [F-, *omp*T, *hsd*S( $r_B^- r_B^-$ ) *dcm*+,*Tet*<sup>r</sup>, *gal*  $\lambda$ (DE3), *end*A, *Hte*]

#### 2.2.3 Plasmid-Vektoren Konstruktion für Endonuklease G

Um die Endonuklease G (EndoG) in Bakterien überexprimieren zu können, wurde die cDNA für bovine EndoG in zwei verschiedene Vektoren kloniert. Erstens in den mit NdeI und BamHI verdauten Vektor pBBI und zweitens in den Vektor pET44a (+) der Firma Novagen<sup>73</sup>. Der pET44a (+) Vektor ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus dem Zielprotein mit dem mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag versehenen NusA (*N utilization substance A*). Es resultierten die Plasmide pBBI-EndoG und pET44-EndoG, mit denen dann die Fusionsproteine His<sub>6</sub>-EndoG bzw. His<sub>6</sub>-Nus-EndoG exprimiert werden konnten.

#### 2.2.4 Plasmid-Vektoren Konstruktion für DNase IIa

Die cDNAs, kodierend für die offenen Leseraster des Wildtyps sowie mutierter Varianten humaner DNase IIα, einschließlich der für einen C-terminalen His<sub>6</sub>-*tag* kodierenden Region, wurden in einen mit NheI und XhoI verdauten pCI-Vektor der Firma Promega eingefügt. Die resultierenden Plasmide wurden pCI-DII-His-wt bzw. pCI-DII-His-"Mutante" genannt.

Die für einen C-terminalen FLAG-His<sub>6</sub> *tandem-tag* kodierenden Versionen der cDNA für die wildtyp- und mutierten Formen der humanen DNase IIα wurden ebenfalls in NheI und XhoI-verdaute pCI-Vekoren eingefügt, und es resultierten die Plasmide pCI-DII-FH-wt bzw. pCI-DII-FH-"Mutante".

Zusätzlich wurden in mit NheI und NotI gepaltenen pCI-Vektor, humane DNaseIIα cDNAs mit einem c- terminalem HA-tag eingebaut, welcher entsprechend pCI-DII-HA hieß.

Die oben beschriebenen Plasmidkonstrukte ermöglichten die Expression von Fusionsproteinen verschiedenen C-terminalen Affinitätstags transfizierten mit in Säugerzellen.

Ein GFP-Fusionskonstrukt, nämlich humane DNase IIa mit GFP am C-Terminus wurde durch einfügen der cDNA in den Vektor pEGFP-N1 erzeugt. Die für diese Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme waren NheI und XhoI, und der Vektor wurde pEGFFP-N1-DII genannt.

#### 2.2.5 Transformation von E. coli

Eine Methode des Transfers von DNA in *E. coli*, die angewandt wurde war die Elektroporation. Diese Methode beruht auf der Beobachtung, dass kurze Hochspannungsimpulse Öffnungen in der Zellhülle verursachen, durch welche dann exogene

DNA Moleküle in die Zelle aufgenommen werden können. Die zu transformierende DNA, wie auch die *E. coli*-Zellen selber, müssen sich zur Vermeidung eines elektrischen Durchschlags in einer weitgehend von Ionen befreiten Lösung befinden.

Als weitere Methode für den DNA-Transfer in *E. coli*, kam die von Chung *et al.* 1989 beschriebene TSS-Transformation zum Einsatz<sup>74</sup>.

Sowohl bei der Herstellung kompetenter Zellen, als auch bei den Transformationen, wurden wann immer möglich, alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und alle Gefäße und Lösungen wurden vor Gebrauch eisgekühlt.

#### 2.2.5.1 Bereitung elektrokompetenter E. coli Zellen

Elektrokompetente XL1Blue Zellen wurden nach folgendem Protokoll erstellt:

- 1) Zunächst wurde eine 50 ml-Vorkultur ü.N. bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert;
- Mit je 10 ml der Vorkultur wurden zwei 500 ml-LB-Flüssigmedien angeimpft und dann bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von ca. 1 OD<sup>600 nm</sup> wachsen gelassen;
- Die Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 4000xg und 4 °C f
  ür 15 min zentrifugiert;
- 4) Nach Abgießen des Überstandes wurden die Pellets je dreimal mit eiskalter 10%iger Glycerinlösung gewaschen, wobei beim ersten Mal mit 250 ml, beim zweiten Mal mit 150 ml und beim letzten Mal mit 20 ml. Beim letzten Waschen wurden beide Ansätze vereinigt;
- 5) Der Überstand vom letzten Waschen wurde verworfen und das Pellet in 2 ml eiskalter Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellen wurden in 80 μl-Portionen in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und durch Eintauchen in Flüssigstickstoff (- 196 °C) schockgefroren;
- 6) Die elektrokompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert;

#### 2.2.5.2 Bereitung TSS-kompetenter E. coli Zellen

TSS-kompetente BL21 Zellen wurden nach folgendem Protokoll erstellt:

- 1) 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer ü.N.-Vorkultur angeimpft und bei 37°C angezogen, bis die frühe logarithmische Wachstumsphase erreicht war (OD<sup>600nm</sup> von 0.5);
- 2) Die Zellen wurden bei 4000xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert;

 Das Zellpellet wurde in 10 ml (entspricht 0.1 Vol. bezogen auf das ursprüngliche Kulturvolumen) gekühlter, frisch zubereiteter <u>TSS-Lösung</u> aufgenommen und vorsichtig resuspendiert;

TSS-Lösung: LB-Medium mit 40 % (w/v) PEG 6000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.0-6.5

 Die Zellen wurden in Aliquots a 200 μl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert;

#### 2.2.5.3 Elektrotransformation von E. coli

- 1) Ein 80 µl Aliquot elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut;
- 2) Die Zellen wurden mit etwa 100 ng cccDNA (covalently closed circle-DNA) versetzt;
- Das Zellen/DNA-Gemisch wurden in eine verschlie
  ßbare Elektrotransformationsk
  üvette überf
  ührt;
- 4) Die Transformation erfolgte mit maximaler Kapazität von 50 μF, einem Widerstand von 150 Ω sowie einer vorgelegten Spannung von 1500 V und einer Stromstärke von 25 mA und einer maximalen Leistung von 25 W. Dazu wurden die Zellen im Elektroporator kurzfristig einem elektrischen Feld ausgesetzt und somit transformiert;
- Nach der elektrischen Behandlung wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt, das gesamte Gemisch in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und etwa 1 h bei 37 °C inkubiert;

#### 2.2.5.4 TSS-Transformation von E. coli

- Ein Aliquot (200 µl) TSS-kompetenter Zellen wurde auf Eis kurz angetaut. Es wurden 10 ng-2 µg Plasmid-DNA dazugegeben und das Zell-DNA-Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert;
- Die Zellen wurden einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt;
- Die abgekühlten Zellen wurden in 800 µl LB-Medium resuspendiert und etwa 1 h bei 37 °C inkubiert;

#### 2.2.5.5 Verfahren mit E. coli nach einer Transformation

Nach einer Transformation von *E. coli* (Elektrotransformation oder TSS-Transformation) konnten die Zellen auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert werden, wobei in der Regel so

verfahren wurde, dass 100 ml direkt ausplattiert wurden und der Rest der Probe 4 min bei 3000 rpm zentrifugiert wurde. Das erhaltene Pellet wurde in einem kleinen Volumen des Überstandes resupendiert und dann auf einer anderen Platte ausplattiert.

# 2.3 Molekularbiologische Methoden

## 2.3.1 Elektrophoresen und Western blot

Elektrophoretische Verfahren sind für die meisten Protein- und Nukleinsäurenanalysen die Methoden der Wahl<sup>75,76</sup>.

In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese (sowohl Agarose- als auch Polyacrylamidgelelektrophorese) für analytische Zwecke verwendet. Für immunologische Nachweise der in dieser Arbeit untersuchten Fusionsproteine wurden Western *blots* (als *semi-dry blots*) durchgeführt.

### 2.3.1.1 Analytische Gelelektrophorese

Die Kontrolle von Plasmidpräparationen, Restriktionsspaltungen, sowie die Analyse der Spaltung von Substraten durch untersuchte Nukleasen wurden mit horizontaler Agarosegelelektrophorese nach Zugabe von etwa 0.2 Vol 5-fach konzentriertem Agaroseauftragspuffer (AAP) durchgeführt.

<u>Agaroseauftragspuffer (AAP)</u>: 250 mM EDTA, 25 % (*w/v*) Saccharose, 1.2 % (*w/v*) SDS, 0.1 % (*w/v*) Bromphenolblau, mit NaOH auf pH 8.0 einstellen

Bei den Agarosegelen handelte es sich, wenn nicht anders angegeben, um 0.8 %ige Gele in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer).

TBE-Puffer: 100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, pH 8.3

Als Marker wurde die *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1kb DNA *Ladder* von MBI Fermentas benutzt. Die Elektrophorese fand mit maximal 10 V/cm-Gellänge bei RT statt. Große Gele (20 cm bis 25 cm × 10 cm) wurden bereits vorher mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0.25 nM) versehen, kleine Gele (10 cm × 10 cm) wurden nach dem Lauf in wäßriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt. Anschließend wurden die Gele gewässert. Die

DNA-Banden wurden mit einer Geldokumentationsanlage durch UV-Licht sichtbar gemacht und die Bilder sowohl elektronisch gespeichert als auch ausgedruckt.

#### 2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren mit einer Länge von weniger als 1000 bp, wie z.B. die meisten PCR-Produkte wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophoresen analysiert. Es wurde dabei der gleiche Auftragspuffer wie bei Agarosegelelektrophoresen (auch gleiches Volumen) verwendet. Die Polyacrylamid-Gele wurden als 8 %ige (Acrylamid : Bisacrylamid/29 : 1),

9 cm  $\times$  10 cm  $\times$  0.1 cm große, native TPE-(Tris-Phosphat-EDTA) Gele angefertigt.

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

Die SDS-PAGE (SDS steht für sodium dodecyl sulfate) wurde in dieser Arbeit verwendet, sowohl um anschließend das Trenngel mit Coomassie zu färben, als auch als erster Schritt Western *blots*. Dabei wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele eines von  $9 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm}$ Größe angefertigt<sup>77</sup>. Die Größe der Trenngele betrug  $9 \text{ cm} \times 6 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm}$ , Sie hatten einen pH von 8.8 und eine Konzentration von 12.5 % (Acrylamid:Bisacrylamid/29:1). Die Sammelgele (pH 6.8) 6 %ig. waren Als Molekulargewichtsstandard wurden die Proteinstandards PageRuler<sup>TM</sup> Unstained Protein Ladder oder, wenn das Gel für einen Western blot vorgesehen war, Prestained Protein Ladder der Firma MBI Fermentas verwendet.

Die Gele mit den aufgetrennten Proteinen wurden anschließend entweder mit colloidaler <u>Coomassie-Färbelösung</u> gefärbt und dann mit Wasser entfärbt, so dass die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund abhebten, oder für Western *blots* weiter verwendet.

<u>Coomassie-Färbelösung</u>: 0.1 % Coomassie Brilliant Blue-G250, 2 % (w/v) Phosphorsäure, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat, 10% (v/v) Ethanol

#### 2.3.1.4 Western blot

Beim Western *blotting* werden Proteine aus einem SDS-PAGE-Gel auf eine Membran transferiert<sup>78</sup>. In dieser Arbeit wurden Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) verwendet. Die Position der Banden des *prestained markers* (s. **2.3.1.3**) wurden nach dem PAGE-Lauf

notiert. Der Transfer erfolgte nach der *semidry blotting*-Methode, d.h. elektrophoretisch, in einem kontinuierlichen Puffersystem.

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

Die Stromstärke während des *blottings* betrug ca.  $0.8 \text{ mA/cm}^2$  (also ca. 45 mA bei  $9 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ ).

Nach dem *blot* wurden die unbesetzten Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit Proteinen belegt, wofür ein <u>Blockpuffer</u> mit gelöstem Magermilchpulver verwendet wurde.

<u>Blockpuffer</u>: 2 g Magermilchpulver in 50 ml Waschpuffer (TTBS) <u>Waschpuffer / *Tween-Tris-buffered-saline* (TTBS)</u>: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20

Anschließend wurde ein Antikörper, in dieser Arbeit entweder ein Anti-FLAG oder ein Anti-HA Antikörper, in einer Verdünnung von 1:500 in Blockpuffer dazugegeben und es wurde 1h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TTBS wurde dann die von der am Antikörper gekoppelten Meeretichperoxidase katalysierte Nachweisreaktion mit ECL<sup>™</sup>-Detektionslösung gestartet. Bei dieser Reaktion wurde das in der Detektionslösung enthaltene Luminol unter Lichtaussendung oxidiert und diese so genannte Chemilumineszenz durch Röntgenfilme nachgewiesen.

### 2.3.2 Plasmid-DNA-Isolation

Um neue Plasmid-Konstrukte durch Restriktionsverdau und darüber hinaus durch Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüfen zu können, müssen sie aus den entsprechenden Zellen, in diesem Fall *E. coli*-Zellen (s. **2.2.2**), isoliert werden. Dies wurde durch eine *Plasmid-Mini-Präparation* mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen bewerkstelligt. Dabei wurde nach einem Protokoll des Herstellers vorgegangen, welches dafür geeignet ist, aus einer 3 ml Kultur bis zu 10 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

Um größere Plasmid-DNA Ausbeuten zu erzielen, wurde eine Plasmid-Präparation im Großmaßstab (*Plasmid-Maxi-Präparation*) angefertigt. Dabei kam das Nucleobond<sup>®</sup> AX Kit von Macherey-Nagel zum Einsatz. Bei der Präparation wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen und aus 500 ml-Kulturen eine Ausbeute von  $30 - 200 \mu g$  erreicht.

Bei beiden Plasmid-Präparationsmethoden handelt es sich um Modifikationen des Verfahrens der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly<sup>79</sup>.

### 2.3.3 Ermittlung von DNA Konzentrationen

Der DNA-Gehalt von Lösungen wurde durch photometrische Messungen bestimmt. Dabei wurde die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Aufnahme eines Spektrums im Wellenlängenbereich zwischen 320 nm und 220 nm durchgeführt. 1 E<sup>260 nm</sup> entspricht 50 ng/ $\mu$ l dsDNA.

Bei DNA-Präparationen wurde der Reinheitsgrad der isolierten DNA über das Verhältnis der gemessenen Extinktionen bei 260 nm und 280 nm, E<sup>260 nm</sup>/E<sup>280 nm</sup>, das idealerweise zwischen 1.6 und 1.8 liegen sollte, bestimmt. Kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, größere Werte auf RNA in der Nukleinsäurelösung.

## 2.3.4 DNA Manipulation

### 2.3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Wie bereits erwähnt, kamen Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) zum Einsatz, wenn es darum ging, Plasmid-Konstrukte auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Ebenso war es möglich, PCR-Produkte zu analysieren, indem nach dem Restriktionsverdau die Länge der Spaltprodukte überprüft wurde.

Präparative Anwendungen von Restriktionsenzymen waren z.B. das Spalten von Plasmid-Vektoren und der entsprechenden *inserts*.

Es wurden die von den Lieferanten empfohlenen und mitgelieferten Spaltpuffer verwendet. Für analytische Spaltungen wurden  $0.1 - 0.5 \mu g$  DNA mit 5 - 10 *units* Restriktionsenzym in einem Volumen von 10  $\mu$ l bei 37 °C für ca. 1 h inkubiert.

Präparative Spaltungen fanden in einem Reaktionsvolumen von  $40 - 60 \mu l$  statt, wobei 5 - 10  $\mu$ g DNA mit 20 - 50 *units* des entsprechenden Enzyms bei 37 °C für 1.5 - 2 h inkubiert wurden.

Nach Beendigung der enzymatischen Reaktionen wurde die Probe gereinigt. Dies geschah mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit von Qiagen, wobei nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde.

Anschließend wurden etwa 200 ng der Spaltprodukte auf ein Agarosegel aufgetragen (mit etwa 0.2 Vol AAP) und durch Elektrophorese analysiert.

### 2.3.4.2 Ligation von Restriktionsfragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde durch die, aus der T4 Phage stammenden, T4-DNA-Ligase von MBI katalysiert. Generell wurden 50 - 100 ng Vektor und, um eine effiziente Ligationsreaktion zu erreichen, ein möglichst hoher Anteil *Insert* pro Ansatz verwendet. Nach den Ligationen wurden die Ansätze ethanolpräzipitiert (1 Vol 4 M NH<sub>4</sub>Ac, 4 Vol EtOH *abs.*, 0.4 % (v/v) Glycogen (20  $\mu$ g/ $\mu$ l)) und die gefällte DNA in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen. Alternativ wurden die Ligationsansätze auch über QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit gereinigt, wobei die DNA mit 100  $\mu$ l Wasser von der Säule eluiert wurde.

## 2.3.5 Oligonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide wurden RP-HPLC-gereinigt bezogen. Als Primer in Polymerasekettenreaktionen wurden sie in einer Endkonzentration von 0.3 bzw.  $0.4 \,\mu M$  eingesetzt.

## 2.3.6 PCR

Die Polymerasenkettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), diente in dieser Arbeit zum einen analytischen (qualitativer Nachweis von spezifischen Nukleinsäuresequenzen), zum anderen präparativen Zwecken. Präparativ waren die Klonierung von Genen sowie die *in-vitro*-Mutagenese klonierter Gene durch inverse PCR. Analytisch war das *screening* nach positiven Klonen eines klonierten Gens oder eines Mutageneseansatzes. In zahlreichen Publikationen werden sowohl Standardprotokolle, als auch die verschiedensten Varianten der PCR sowie ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten beschrieben<sup>80-82</sup>.

### 2.3.6.1 PCR-Standardbedingungen

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die z.B. als Insert bei Klonierungen vorgesehen waren oder beim *screening* nach positiven Klonen eines klonierten Gens wurden im Wesentlichen PCR-Ansätze folgender Art bereitet:

100 ng Plasmid-DNA als Template
0.1 Volumen Polymerase 10 × Puffer
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>
200 μM eines jeden dNTPs
0.3 μM Primer 1 (5'- Primer)
0.3 μM Primer 2 (3'- Primer)
0.05 U/μl *Taq* DNA-Polymerase
30 - 50 μl Endvolumen
Standardprozessbedingungen, die vor allem in Abhängigkeit von der für ein spezifisches Primerpaar optimalen *annealing*-Temperatur variierten, waren:

#### PCR-Standard-Prozessbedingungen:

- **1)** Einmalige Denaturierung: 1 × (94 98 °C für 2 5 min);
- 2) Mehrmalige Denaturierung, annealing und Primerextension: 20 35 × (94 98°C für 15 sec - 1 min, 50 - 65 °C für 30 sec - 1 min, 68 - 72 °C für 30 sec - 1 min)

Die *annealing*-Temperatur hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3 °C unter ihrem Schmelzpunkt. Die Temperatur für die Primerextension ist abhängig von der verwendeten Polymerase, nämlich 68 °C für die Pfu- und 72 °C für die Taq-DNA-Polymerase.

3) Einmalige Extension: 1 × (68 - 72 °C für 2 - 7 min), danach Abkühlung auf 4 °C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert und falls nötig für andere Anwendungen gereinigt.

### 2.3.6.2 In-vitro-Mutagenese mittels inverser PCR

Mit diesem Verfahren wurden Mutanten des Gens für humane DNase IIa erzeugt. Dabei wurden durch 5'- Primer, die einen *Mismatch* trugen, gezielt Mutationen eingeführt. Darüber hinaus wurden über die 5'- Primer Restriktionsschnittstellen eingeführt.

Es wurde bei der Mutagenese nach dem Protokoll von Kirsch & Joly vorgegangen<sup>83</sup>:

- 1) PCR mit Mutageneseprimer, die zu DNA-Fragmenten mit entsprechender Mutation führt.
- 2) Kontrolle der Länge der PCR-Produkte durch PAGE.
- Zweite PCR mit gleichem Template wie bei 1) und PCR-Produkt von 1) als Primer (Megaprimer).
- 4) Restriktionsverdau mit DpnI zur Eliminierung noch vorhandener *template*-Plasmid-DNA. Dieses Restriktionsenzym erkennt und spaltet methylierte *dam*-Erkennungsstellen (GmATC) mittig; diese kommen nur im eingesetzten *template*-Plasmid und nicht im PCR-Produkt vor, da die *dam*-Methylierung der Plasmide innerhalb der Bakterienzellen stattgefunden hat.
- 5) Reinigung der Proben mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit.

Anschließend wurden E. coli mit den neuen Konstrukte durch Elektroporation transformiert.

Mit den daraus erhaltenen Klonen wurden *screening*-PCRs durchgeführt. Die daraus hervorgegangenen PCR-Produkte wurden, sofern die gelelektrophoretische Analyse den entsprechenden Klon als positiv erwies, mit den Restriktionseondonukleasen gespalten, deren Erkennungssequenz bzw. Restriktionsschnittstelle über den 5'-Primer eingeführt wurde. Anhand der Länge der Spaltprodukte waren dann die positiven Klone zu erkennen, mit denen *Plasmid-Mini-Präparationen* angefertigt wurden. Diese wiederum wurden auf ihre Länge überprüft, nachdem sie mit einer Restriktionsendonuklease linearisert wurden. Anschließend wurde mit den *Plasmid-Mini-Präparationen* eine PCR durchgeführt, wobei das PCR-Produkt als Template für eine Nukleinsäure-Sequenzierung diente.

# 2.4 Expression von EndoG

Ein in dieser Arbeit untersuchtes Protein war die Endonuklease G. Ihre Expression fand hier in Bakterien statt, da versucht werden sollte das Protein in großen Mengen herzustellen.

### 2.4.1 Verwendetes Expressionssystem

Für die Expression von EndoG in Bakterien wurde der *E. coli*-Stamm BL21Gold(DE3) verwendet. Die Zellen wurden dementsprechend mit den Expressionsplasmiden pBBI-EndoG oder pET44-EndoG transformiert (s. **2.2.3**). Die His<sub>6</sub>-EndoG- und His<sub>6</sub>-Nus-EndoG-Gene stehen bei den verwendeten Vektoren unter Kontrolle eines T7-Promotors, und werden indirekt durch den *lac*-Repressor gehemmt. BL21Gold(DE3) Zellen sind lysogen für den DE3-Phagen und enthalten dadurch eine Kopie des T7A1-Gens, das für die T7 RNA-Polymerase kodiert und seinerseits unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Zur Induktion des entsprechenden Zielgens wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zu den transformierten Zellen gegeben. Dadurch wurde zunächst die Expression des T7A1-Gens und daraufhin durch die gebildete T7 RNA-Polymerase das Zielgen induziert.

### 2.4.2 Expression der EndoG Varianten

Mit Klonen von BL21(DE3) Zellen, die das gewünschte Expressionsplasmid enthielten, wurden 50 ml *E. coli*-Flüssigkulturen, (mit den entsprechenden Antibiotika versehen) als Vorkulturen angeimpft, und diese wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert. Von den dicht gewachsenen Vorkulturen wurden 10 ml entnommen und in 500 ml LB Medium mit den erforderlichen Antibiotika überführt. Die 500 ml Kulturen wurden bei 37 °C angezogen, bis

die logarhitmische Wachstumsphase erreicht war ( $OD^{600nm}$  von ca. 0.5). Es erfolgte dann die Induktion der Expression mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Nach einer weiteren Inkubationszeit bei 37 °C von ca. 3 h wurden die Zellen geerntet.

Noch vor der Induktion und nach der dreistündigen Inkubationszeit nach der Induktion, wurden je 500 µl Zellsuspension den Kulturen entnommen und zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden mit je 50 µl <u>Laemmli-Auftragspuffer</u> versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Von diesen Proben wurden Aliquots durch SDS-PAGE und anschließende Färbung des Gels mit Coomassie-Färbelösung untersucht, um die Expression der Proteine verfolgen zu können.

Laemmli-Auftragspuffer: 160 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 20% (w/v) Saccharose, 0.01% (w/v) Bromphenolblau

Die Zellernte der 500 ml Kulturen geschah durch Zentrifugation (4000 rpm, 15 min bei 4 °C). Die pelletierten Zellen wurden durch Resuspendierung mit 20 ml <u>STE-Puffer</u> gewaschen und erneut zentrifugiert.

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

Danach erfolgte 1. ein Ultraschallaufschluß (10x20 sec, *duty cycle* 50%, *output level* 5) in 10 ml <u>EndoG-Aufschlußpuffer</u> und 2. ein Zentrifugationsschritt zur Fraktionierung der löslichen und unlöslichen Komponenten dieser Suspension (20 000 rpm für 45 min bei 4 °C).

```
EndoG-Aufschlußpuffer: 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 0.01% (v/v) Triton X 100, 5 mM DTT
```

Je nach Art des Versuches, eine lösliche und aktive EndoG-Spezies herzustellen, wurde ab diesem Schritt unterschiedlich verfahren (s. Ergebnisse).

## 2.4.3 Plasmid-Spaltassay mit EndoG

Um die Nukleaseaktivität von EndoG-Präparationen feststellen zu können wurde Plasmid-DNA als Substrat mit Aliquots der entsprechenden Präparationen inkubiert. Die Reaktionen fanden bei 37 °C statt. Dabei wurde ein Puffer (<u>EndoG-Spaltpuffer</u>) verwendet, der an anderer Stelle als für die *in vitro* Spaltung von DNA durch EndoG sehr geeignet eingestuft wurde<sup>34</sup>. <u>EndoG-Spaltpuffer</u>: 20 mM MES-NaOH, pH 6.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 % (v/v) Glycerin, 0.01 % (v/v) Triton X 100, 0.01 % (w/v) BSA

Die Spaltansätze wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

# 2.5 Expression und Reinigung von DNase IIa

## 2.5.1 Handhabung der zur Expression von humaner DNase Πα verwendeten Zellen

Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten DNase II $\alpha$ , fand in eukaryotischen Zellen statt. War die Überexpression von DNase II $\alpha$ , für präparative Zwecke bestimmt, so wurde die Zelllinie HEK-293-T, wobei es sich um menschliche, embryonale Nierenzellen handelt, verwendet. Außerdem wurden noch einige andere Zelllinien benutzt um die Lokalisierung von mit EGFP fusionierter DNase II $\alpha$  in den Zellen zu studieren (s. **2.1.7**). Die Kultivierung aller Säugerzellen, fand in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 10 % FCS (*Fetal Calf Serum*) und 1 % Antibiotika-Gemisch bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> statt, außer bei den LNCaP-Zellen, für die RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) Medium verwendet wurde. Das Antibiotika Gemisch enthielt 10 000 *units*/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin. Weiterhin wurden beschichtete Gewebekulturschalen verwendet, in denen die eukaryotischen Zellen adhärent als *monolayer* wuchsen.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen verdünnt und auf neue Gewebekulturschalen verteilt (*splitting*), um sie in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten.

Bei Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien mußte besonders sorgfältig vorgegangen werden vor allem, um die Zellen vor Bakterien und Pilzen zu schützen. Daher fand der Umgang mit eukaryotischen Zellen an einer Sterilbank in einem separaten Raum statt und es wurde nur steriles Arbeitsmaterial verwendet.

### 2.5.2 Verwendetes Expressionssystem

Humane DNase IIα, (Wildtyp und Mutanten) wurde als C-terminales Fusionsprotein (mit 6His-tag, HA-tag und FLAG-tag) in HEK-293-T-Zellen exprimiert, die mit dem Expressionsvektor, pCI-DII-"tag" (s. **2.2.4**) transfiziert waren, auf dem ein Cytomegalivirus (CMV)-Promotor und *Enhancer* vorhanden war. Beim CMV-Promotor handelt es sich um

einen starken und konstitutiven, d.h. ständig aktiven Promotor, der eine Überexpression des gewünschten Proteins ermöglicht.

### 2.5.3 DNA-Transfer in Säugerzellen

Für den Transfer von rekombinanter DNA in Säugerzellen (Transfektion) wurden zwei verschiedene kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien (s. **2.5.3.1** und **2.5.3.2**) verwendet. Die Transfektionen fanden nach dem Protokoll der Transfektionsreagenz-Hersteller statt.

### 2.5.3.1 Transfektionen für präparative Proteinherstellung aus Säugerzellen

Die Transfektion von rekombinanter DNA in HEK-293-T-Zellen zur Herstellung von *in vitro* zu untersuchender DNase II $\alpha$ , wurde mit dem *TransFast*<sup>TM</sup> *Transfection Reagent* der Firma Promega durchgeführt. Dieses Reagenz enthält synthetische, kationische Lipide, die Liposomen bilden. Bei Liposomen handelt es sich um Lipiddoppelschichten, die in wässrigen Medien kolloide Partikel bilden<sup>84</sup>. Eine Inkubation von kationischen Liposomen und Nukleinsäuren führt dazu, dass diese einen Komplex bilden. In diesen Komplexen ist die negative Ladung der DNA neutralisiert, was es ihnen ermöglicht, in näheren Kontakt mit Zellmembranen zu treten, die negativ geladen sind. Der weitere Mechanismus der DNA-Aufnahme in die Zellen ist nicht bekannt, aber man vermutet, dass Endocytose oder eine Fusion des Lipidanteils eines Liposoms mit der Zellmembran und anschließende Freisetzung der DNA in das Cytosol dabei eine Rolle spielen<sup>85</sup>. Weiterhin ist nicht bekannt, wie die DNA in den Zellkern gelangt.

## 2.5.3.2 Transfektionen zur Analyse von Lokalisationen überexprimierter Proteine in Säugerzellen

Die Transfektion aller verwendeten Zelllinien, für mikroskopische Untersuchungen von überexprimierten DNase II-EGFP Fusionsproteinen *in vivo* fand in *six-well cell culture tissue plates* statt, wobei hierfür das Transfektionsreagenz *PolyFect*<sup>®</sup> *Transfection Reagent* verwendet wurde. Dieses Reagenz enthält aktivierte Dendrimere, welche sich mit DNA in kompakte Strukturen verbinden. Die Nettoladung dieser Reagenz-DNA-Strukturen ist positiv, wodurch sie an negativ geladene Zellmembranen gelangen und von den Zellen aufgenommen werden können.

### 2.5.4 Mikroskopische Untersuchungen überexprimierter Proteine

Mit *Polyfect*<sup>®</sup> transfizierte Zellen wurden teilweise mit einem Leica TCS4D *confocal laser scanning* Mikroskop und einem Leica HCX APO LX40/0.80 W U-V-1 Objektiv untersucht. Die Anregung des fluoreszierenden Proteins wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm durch einen 75 mW omnichromen Argon/Krypton Laser erreicht. Diese Apparatur wurde freundlicher- und dankenswerterweise vom Institut für Allgemeine Botanik und Planzenphysiologie vom Fachbereich 08 der Justus-Liebig-Universität Giessen, zur Verfügung gestellt.

Alternativ wurde auch ein Zeiss (*Germany*) Axiophot Mikroskop verwendet. Dieses wurde wiederum vom Institut für Genetik (s. **2.1.6**) zur Benutzung freigegeben.

### 2.5.4.1 Färbung der Lysosomen und Zellkern-DNA transfizierter Zellen

Für die mikroskopische Untersuchung von DNase II-EGFP überexprimierenden Zellen, wurden bestimmte Zellkompartimente "gegengefärbt". Dafür wurden zwei veschiedene, von Invitrogen kommerziell erhältliche Farbstoffe verwendet. Höchst 33342, ein Farbstoff, der einen Komplex mit Zellkern-DNA eingeht, wurde benutzt, um Zellkerne durch eine blaue Fluoreszenz sichtbar zu machen. Für die Färbung von Lysosomen, wurde der rot fluoreszierende Farbstoff LysoTracker<sup>®</sup> DND-99 verwendet. Die Verwendung der beiden Farbstoffe erfolgte nach Anleitung des Lieferanten.

## 2.5.5 Proteinreinigung und Proteinpräparation

### 2.5.5.1 Ernte und Aufschluß transfizierter HEK-293-T-Zellen

Zwölf bis zwanzig Stunden nach der Transfektion (s. **2.5.3.1**) wurde das DMEM abgesaugt und 10 ml <u>PBS</u> wurde in die Schale mit den Zellen gegeben.

<u>PBS</u>: 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, pH 7.4, 1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl

Die Zellen wurden dann mit einem *rubber-policeman* (Gummischaber) von den Gewebekulturplatten gelöst und in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann 2 min bei 4 °C und 800 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mit 1 ml PBS gewaschen und die pelletierten Zellen dann mit 1 ml <u>DNase II $\alpha$ -Lysispuffer</u> versetzt.

<u>DNase IIα-Lysispuffer</u>: 10 mM Tris-HCL, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 % (v/v) Triton X 100 und 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche)/10 ml Puffer

Die, durch das Triton X 100 bewirkte Lyse der Zellen, fand 1 h bei 4 °C und gleichmäßiger Durchmischung der Proben statt.

### 2.5.5.2 Reinigung von DNase II α durch Affinitätschromatographie

Im Anschluß an die Zelllyse (s. 2.5.5.1), wurden die Proben 40 min bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand, wurde das zu untersuchende Protein mit Hilfe von unterschiedlichen Affinitätsmatrizes gereinigt. DNase II $\alpha$  mit einem FLAG-His<sub>6</sub>-Tandem-Tag wurde durch FLAG-Affinitätschromatographie gereinigt, wobei das *EZview<sup>TM</sup> Red ANTI-FLAG*<sup>®</sup> *M2 Affinity Gel* (Sigma) benutzt wurde. Für die Reinigung von DNase II $\alpha$  fusioniert mit einem Hämaglutinin-Epitop, wurde das *EZview<sup>TM</sup> Red ANTI-HA*<sup>®</sup> *Affinity Gel* (Sigma) verwendet.

Alle Zentrifugationen mit *EZview™ Affinity Gel* wurden bei 4°C und 10 000 rpm, durchgeführt.

Die Affinitäts-*beads* (40µl/Konstrukt) wurden vor Benutzung vorbehandelt, indem sie zuerst mit <u>TBS</u> (*Tris-buffered-saline*), dann mit einer <u>sauren Glycinlösung</u>, wieder mit TBS und zuletzt mit DII-Lysispuffer gewaschen wurden.

<u>TBS</u>: 50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 150 mM NaCl <u>Saure Glycinlösung</u>: 100 mM Glycin-HCL, pH 3.5

Der Überstand der lysierten Zellen, wurde auf die behandelten Affinitäts-*beads* gegeben und die Proben wurden 1 h bei 4°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand mit den ungebundenen Komponenten verworfen und die Affinitätsbeads wurden zweimal mit DII-Lysispuffer und einmal mit TBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden 100  $\mu$ l eines Puffers (DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer) auf die *beads* gegeben.

DNase IIα-Reaktionspuffer: 200 mM NaAc-HCl, pH 4.5, 5 mM EDTA

Alternativ wurde humane DNase IIα mit einem FLAG-His<sub>6</sub>-Tandem-Tag aus transfizierten HEK-293-T-Zellen auch durch His-Affinitätschromatographie gereinigt, wobei *MagneHis*<sup>™</sup> *magnetic Ni*<sup>2+</sup>-*Particles* der Firma Promega verwendet wurden. Dabei wurden die Zellen, wie

oben schon beschrieben, geerntet und lysiert, wobei aber ein anderer Lysispuffer (Lysispuffer A) benutzt wurde.

Lysispuffer A: 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol 20 mM Imidazol, 1 % (v/v) Triton X 100 und 1 Tablette pro 10 ml Puffer Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Der Überstand des Lysates wurde dann, auf mit Lysispuffer A äquilibrierte, Ni<sup>2+</sup>-beads (20  $\mu$ l/Konstrukt) gegeben, und das Protein wurde 0.5 h bei 4°C auf einem Schüttler gebunden. Die Proben wurden anschließend auf einen Mageneten (MagnaRack<sup>TM</sup> von Invitrogen) gestellt, die magnetischen Ni<sup>2+</sup>-beads setzten sich ab, und der Überstand mit den ungebundenen Komponenten wurde verworfen. Die *beads* wurden dann noch dreimal mit einem Waschpuffer (DNase II $\alpha$ -His-Waschpuffer) gewaschen bevor letztendlich DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer auf die Ni<sup>2+</sup>-NTA-beads gegeben wurde.

DNase IIα-His-Waschpuffer: 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF

# 2.6 Charakterisierung von Proteinen

## 2.6.1 Gelfiltration

Als eine Methode für die Untersuchung bzw. die Bestimmung der Quartärstruktur der aktiven DNase II $\alpha$  Spezies wurde die Gelfiltration gewählt. Hierfür wurden Zelllysate aus HEK-293-T Zellen, welche transfiziert waren um DNase II $\alpha$  Varianten zu exprimieren, hergestellt. Diese Lysate wurden dann 45 min bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände der Zelllysate wurden dann auf eine Superdex-75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule, an einem Beckman BioSys<sup>TM</sup> 2000 HPLC-System, geladen. Die Säule wurde zuvor mit einem Puffer (<u>DNase II $\alpha$ -Gelfiltrationspuffer</u>) äquilibriert, der dann auch als "Laufpuffer" diente.

<u>DNase IIα-Gelfiltrationspuffer</u>: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % (v/v) Triton X 100, 0.5 mM PMSF Fraktionen mit 0.6 ml Volumen wurden gesammelt, bei einer Flußrate von 1 ml/min. Mit diesen Fraktionen wurden *pulldown*-Experimente (s. **2.6.2**) durchgeführt.

## 2.6.2 Pulldown-Experimente

Um DNase II $\alpha$  FLAG-His<sub>6</sub>, aus den Gelfiltrationsfraktionen (s. **2.6.1**) isolieren und untersuchen zu können, wurden je 10 µl *EZview*<sup>TM</sup> *Red ANTI-FLAG*® *M2 Affinity Gel* (Sigma) zu jeder Fraktion hinzugefügt und das Protein wurde wie oben beschrieben immunopräzipitiert. Allerdings wurden hier nach dem finalen Waschschritt mit TBS nur 40 µl DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer auf die Beads gegeben. Von diesen Präparationen wurden 10 µl Aliquots entnommen, mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und es wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western *blot* (Anti-FLAG) durchgeführt.

Außerdem wurden mit den Proben Plasmid-Spaltassays durchgeführt.

### 2.6.3 DNase-Aktivitätsassays

### 2.6.3.1 Hyperchromizitätsassay nach Moses Kunitz

Beim Hyperchromizitäts- oder Kunitzassay handelt es sich um einen *Real-Time*-Nuklease-Aktivitätsassay, bei dem die Hydrolyse von Nukleinsäuren kontinuierlich, spektrophotometrisch (bei 260 nm) verfolgt werden kann<sup>86</sup>. Dieser Assay beruht darauf, dass einzelsträngige DNA eine höhere Extinktion aufweist als Doppelsträngige. Wenn nun doppelsträngige Nukleinsäuren derart gespalten werden, dass kurze Bruchstücke (< 15 bp) entstehen, reicht Raumtemperatur aus, um diese "aufzuschmelzen" und in einzelsträngige DNA zu überführen. Die in einem Spaltexperiment gemessene maximale Steigung  $\Delta E^{260nm}/\Delta t$ spiegelt die Aktivität einer Nuklease wieder.

In dieser Arbeit wurde hochmolekulare DNA, aus Heringssperma (Sigma) mit DNase II $\alpha$ -FH inkubiert.

### 2.6.3.2 Plasmid-Spaltassay

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Methode, die Aktivität von DNase II $\alpha$  zu untersuchen, festzustellen und zu messen war der Verdau von Plasmid-DNA mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte.

Auch die relative Aktivität von DNase IIa Mutanten im Verhältnis zum wt konnte durch diese Methode betrachtet werden.

Generell hatten solche Spaltansätze ein Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l, wobei als Puffer der EDTA enthaltende DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer (s. **2.5.5.2**) diente und bei 37 °C inkubiert wurde. Die Dauer der Inkubationen variierte, und wird im Ergebnisteil angegeben. Die Substratkonzentration betrug dabei 20 ng/ $\mu$ l, wobei die Plasmide pCI, PBSK und PBSK-VDEX verwendet wurden. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 3  $\mu$ l 5 x AAP gestoppt, und der gesamte Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen.

## 3 Ergebnisse

# 3.1 Rekombinante Endonuklease G

### 3.1.1 Klonierung von Endonuklease G

Zurzeit existiert, was die Quartärstruktur der Endonuklease G (EndoG) betrifft, ein auf den Kristallstrukturen verwandter prokaryotischer Nukleasen beruhendes Homologiemodell<sup>34</sup>. Um eine Kristallstruktur von EndoG zu erhalten, wäre es nötig, lösliche, bioaktive EndoG in großen Mengen und in hoher Konzentration herzustellen. Zwar bietet eine Überexpression von EndoG in Bakterien theoretisch die Möglichkeit, große Mengen des Proteins herzustellen, allerdings erhält man dabei zunächst unlösliches Protein in Form von inclusion bodies. Es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten dieses Problem zu lösen, was im Zuge dieser Arbeit auch versucht wurde. Um EndoG in E. coli zu exprimieren, wurde die für das Protein codierende Sequenz durch PCR amplifiziert und zum einen in den Vektor pBBI kloniert<sup>73</sup>, wobei eine N-terminale Fusion mit einem His6-tag eingeführt wurde, und zum anderen in den Vektor pET-44a (Novagen), wodurch eine tandemartige N-terminale Fusion mit einem His<sub>6</sub>-tag und dem NusA-Protein zum Zwecke einer möglichen Erhöhung der Löslichkeit erhalten wurde. Als Quelle für die EndoG cDNA diente der Vektor pBSK(+)-eG, der das offene Leseraster für die bovine Nuklease enthält und von A. Ruiz-Carrillo (IBMB, Spanien) zur Verfügung gestellt wurde. Die zu Klonierungszwecken benötigten Restriktionsendonukleasen sind in Abbschnitt 2.1.4 angegeben. Mit Hilfe der konstruierten Vektoren pBBI-EndoG und pET44-EndoG konnte EndoG mit den entsprechenden N-terminalen Fusionen in E. coli exprimiert werden.

### 3.1.2 Überexpression von EndoG in Bakterien

His<sub>6</sub>-EndoG und His<sub>6</sub>-Nus-EndoG wurden in dem *E. coli* Stamm BL21-Gold (DE3) exprimiert. In Abb. **3-1** ist auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel exemplarisch gezeigt, dass His<sub>6</sub>-EndoG ( $M_r \approx 28$  kD) in den Bakterien exprimierbar ist.



Abb. 3-1: Überexpression von His<sub>6</sub>-EndoG in *E. coli*: Gezeigt ist ein 12.5 % iges SDS-Trenngel, nach elektrophoretischer Trennung und Färbung mit Coomassie Färbelösung. Auf das Gel aufgetragen wurden *E. coli* BL21-Gold (DE3)-Zellen die zuvor 5 min in Laemmli-Auftragspuffer bei 95 °C erhitzt wurden. Die Bakterien enthielten das Expressionsplasmid pBBI-EndoG und es wurden vor (VI) und 3 h nach (NI) der Induktion mit IPTG, Zellen für die SDS-PAGE entnommen und mit Auftragspuffer versetzt. 15  $\mu$ l des Zell-Auftragspuffergemisches wurden aufgetragen, was ca. 1/3000 der gesamten Kulturlösung entspricht. Man erkennt, dass His<sub>6</sub>-EndoG exprimiert wurde. M, PageRuler<sup>TM</sup> Protein Leiter von MBI

# **3.1.3** Überexpression von EndoG in Bakterien als NusA-Fusionsprotein zur Vermeidung der Bildung von *inclusion bodies*

Eine mögliche Methode lösliche und biologisch aktive Proteine in *E. coli* zu produzieren, ist die Fusion des Gens eines erwünschten Proteins mit dem Gen eines Proteins, welches die Löslichkeit und darüber hinaus die korrekte Faltung des "Passagierproteins" fördert. In diesem Fall wurde mit dem Vektor pET44-EndoG (s. **2.2.3**) EndoG mit NusA (*N utilization substance A*) zu His<sub>6</sub>-Nus-EndoG fusioniert und das Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und auf Löslichkeit untersucht. Als Kontrolle wurde auch das His<sub>6</sub>-Nus-Protein ohne Fusion exprimiert. Die BL21-Gold (DE3) Zellen mit überexprimierten Proteinen wurden wie in Abschnitt **2.4.2** beschrieben behandelt. Nach Zentrifugation, zur Trennung der löslichen und unlöslichen Komponenten, wurden die erhaltenen Pellets in EndoG-Aufschlußpuffer resuspendiert. Aliquots der resuspendierten Pellets und der vorher erhaltenen Überstände wurden mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Mit den Proben

wurde dann eine SDS-PAGE mit anschließender Färbung des SDS-Gels mit Coomassie-Färbelösung durchgeführt. In der Abbildung 3-2 ist zu erkennen, dass der überwiegende Teil von His<sub>6</sub>-Nus-EndoG löslich war. Das lösliche Fusionsprotein wurde über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt, und die Hälfte des daraus erhaltenen Proteinpräparates wurde einem Verdau mit Thrombin unterzogen. Durch eine Thrombinschnittstelle in der Linkerregion zwischen NusA und EndoG, konnte das "Passagierprotein" EndoG von seinem Fusionspartner NusA getrennt werden, wobei es immer noch löslich war, wie durch eine weitere SDS-PAGE bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde ein Plasmid-Spaltassay, sowohl mit His<sub>6</sub>-Nus-EndoG, als auch mit dem nach der Thrombinspaltung erhaltenen EndoG durchgeführt. Weder His<sub>6</sub>-Nus-EndoG noch EndoG zeigten Nukleaseaktivität.



**Abb. 3-2: Löslichkeit des His**<sub>6</sub>-Nus-EndoG Fusionsproteins: Dargestellt ist ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Trenngel nach der Elektrophorese. Aufgetragen wurden Proben des Überstandes und des Pellets nach einer Zentrifugation, von mit Ultraschall aufgeschlossenen Bakterienzellen, die entweder His<sub>6</sub>-Nus-EndoG oder His<sub>6</sub>-Nus exprimiert hatten. Es ist erkennbar, dass ein Großteil des exprimierten Fusionsproteins löslich war.

# **3.1.4** Rückfaltung von His<sub>6</sub>-EndoG durch rasches Verdünnen in einem Renaturierungspuffer

Die Expression von EndoG (in diesem Fall His<sub>6</sub>-EndoG) in Bakterien führt zu der Bildung von *inclusion bodies*. Zwar kann EndoG durch Harnstoff oder Guanidiniumchlorid wieder in

Lösung gebracht werden, aber die Anwesenheit dieser chaotropen Agenzien führt zu einer Denaturierung und einem Funktionsverlust des Proteins. Durch das Entfernen des denaturierenden Agens wurde versucht, das Protein zu renaturieren und dadurch die biologisch aktive Form zu erhalten. In diesem Fall wurden zunächst Harnstoff enthaltende Proben, in denen gelöstes, denaturiertes His<sub>6</sub>-EndoG vorlag 1:100 in einen Protein-Renaturierungspuffer (30 % Glycerin, 10 mM DTT, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), blitzartig verdünnt. Über SDS-PAGE wurde festgestellt, dass His6-EndoG zum Teil in Lösung blieb, und es wurde versucht das lösliche Protein über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie zu reinigen, allerdings ließ sich das Protein nicht an das Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulenmaterial binden (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde so vorgegangen, dass das gelöste His<sub>6</sub>-EndoG noch mit 6.5 M Harnstoff an Ni<sup>2+</sup>-beads gebunden wurde, und die beads anschließend mit dem Renaturierungspuffer extensiv "gewaschen" wurden. Anschließend ließ sich nur ein sehr geringer Teil des gebundenen Proteins wieder von der Säule eluieren, wobei ein Puffer mit 500 mM Imidazol dafür benutzt wurde. Dennoch wurde mit dem erhaltenen Eluat ein Plasmid-Spaltassay durchgeführt, wobei aber nur eine sehr schwache nicking-Aktivität festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

# **3.1.5** Chemische Rückfaltung von His<sub>6</sub>-EndoG auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule durch Gebrauch von Detergenzien und künstlichen Chaperonen

Als nächster Versuch, His<sub>6</sub>-EndoG aus *inclusion bodies* in eine aktive Spezies zurückzufalten, wurde eine Methode, welche auch bei einem kommerziell erwerblichen Renaturierungs-Kit (*Refolding CA Kit*, TaKaRa Bio *inc.*, Japan) benutzt wird, in abgewandelter Form angewandt. Zunächst wurde His<sub>6</sub>-EndoG in BL21-Gold (DE3) Zellen exprimiert und es wurde so vorgegangen, dass wie schon in Abschnitt **3.1.4** beschrieben, die entstandenen *inclusion bodies* mit Harnstoff denaturiert und in Lösung gebracht wurden. In fünf verschiedenen Ansätzen wurde His<sub>6</sub>-EndoG an Ni<sup>2+</sup>-*beads* gebunden. Das Protein und die Ni<sup>2+</sup>-*beads* lagen dann in folgendem Puffer vor: <u>20 mM</u> <u>Tris-HCl</u>, pH, 7.9, 6.5 M Harnstoff, 1 mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol und <u>100 mM NaCl</u>. Die *beads* wurden dann einmal mit dem gleichen Puffer (mit zusätzlich 20 mM Imidazol) gewaschen. Anschließend wurde durch weiteres Waschen mit einem harnstofffreien Puffer der Harnstoff entfernt und dieser durch ein Detergenz ersetzt, wobei bei jedem der fünf Ansätze ein anderes Detergenz verwendet wurde. Die verwendeten Detergenzien waren: 0.2 % (v/v) Triton X 100; 0.25 % (v/v) Tween 20; 0.2 % (v/v)

N-Lauroylsarcosin; 0.5 % (v/v) Igepal; 0.2 % (v/v) Lubrol. Durch die Detergenzien sollte verhindert werden, dass durch das Entfernen des Harnstoffs, His6-EndoG wieder Aggregate falsch gefalteter Moleküle bildet. Im nächsten Waschschritt sollte dann die Renaturierung von His<sub>6</sub>-EndoG erfolgen. Dafür wurde folgender Puffer verwendet: 20 mM Tris-HCl, pH, 7.9, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 100 mM NaCl und 5 mM β-Cyclodextrin. Beim Zucker β-Cyclodextrin handelt es sich um ein Molekül, welches in anderen Fällen schon als ein künstliches Chaperon fungiert hat<sup>87</sup>. Hier sollte es das entsprechende zuvor eingesetzte Detergenz aus dem Protein-Detergenz-Komplex entfernen und die Renaturierung von His<sub>6</sub>-EndoG in ihre aktive Form unterstützen. ß-Cyclodextrin wurde hier, anstelle des im oben erwähnten Renaturierungs-Kits benutzten Zuckers Cycloamylose eingesetzt. Die Säulen wurden dann noch einmal mit einem B-Cyclodextrin freien Puffer gewaschen und zuletzt wurde His6-EndoG mit einem 400 mM Imidazol enthaltenen Puffer eluiert. Aliquots der erhaltenen Eluate wurden durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an löslichem His<sub>6</sub>-EndoG untersucht. In Abb. 3-3 ist zu sehen, dass in allen fünf Fällen, lösliches His<sub>6</sub>-EndoG von den Ni<sup>2+</sup>-Säulen eluiert werden konnte, wobei aber durch SDS-PAGE auch festgestellt wurde, dass ein erheblicher Anteil His<sub>6</sub>-EndoG sich nicht von den Säulen löste (Daten nicht gezeigt). Teile der Eluate wurden dialysiert, um die hohe Konzentration von Imidazol zu beseitigen, und es wurden Plasmid-Spaltassays mit sowohl den dialysierten, als auch den nicht dialysierten Proben durchgeführt. Es konnte in allen Fällen jedoch nur eine sehr schwache nicking-Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

## 3.1.6 Rückfaltung von His<sub>6</sub>-EndoG mit dem iFOLD<sup>TM</sup> Kit

Für den nächsten und in dieser Arbeit letzten Versuch, lösliche und auch aktive EndoG aus Bakterien zu erhalten, wurde das iFOLD<sup>TM</sup> *Protein Refolding System* der Firma Novagen verwendet. Das Grundprinzip, auf dem dieses Kit basiert, ist das gleiche, das auch in Abbschnitt **3.1.4** angewandt wurde. *Inclusion bodies* werden durch einen geeigneten Puffer denaturiert und gelöst, wobei hier für die Denaturierung N-Lauroylsarcosin vorgesehen ist. Da sich EndoG mit Detergenzien alleine nicht in Lösung bringen lässt (Daten nicht gezeigt), wurde ein alternativer Denaturierungspuffer mit Guanidiniumchlorid dafür eingesetzt (<u>10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.06 % (v/v) N-Lauroylsarcosin, 5 M Guanidiniumchlorid</u>).



Abb. 3-3: Löslichkeit von His<sub>6</sub>-EndoG nach chemischer Rückfaltung: Abgebildet ist hier ein SDS-Trenngel nach der Elektrophorese und Färbung mit Coomassie. Es wurden fünf Ansätze der His<sub>6</sub>-EndoG Reinigung und Rückfaltung parallel durchgeführt, bei denen in einem Arbeitsschritt unterschiedliche Detergenzien verwendet wurden (1-5). Aliquots der fünf erhaltenen Eluate wurden auf das Gel aufgetragen, die etwa 1/300 einer Präparation aus einer 500 ml Bakterienkultur entsprachen. Als Referenz wurden auch Bakterien auf das Gel aufgetragen, die 3 h nach der Induktion mit IPTG entnommen und mit Laemmli-Auftragspuffer gekocht wurden (NI). Die Menge entsprach hier ca. 1/3000 der gesamten Bakerienkultur. In allen fünf Ansätzen war lösliche His<sub>6</sub>-EndoG vorhanden. M, PageRuler<sup>TM</sup> Protein Leiter von MBI

Um möglichst nicht von der Anleitung des Kits abzuweichen, wurden die Proben nach diesem Schritt zunächst gegen den im Kit vorgesehenen Denaturierungspuffer dialysiert, was aber dazu führte, dass das Protein wieder ausfiel. Daher wurden die Proben zur Durchführung des eigentlichen Renaturierungsexperimentes im oben beschriebenen. alternativen Denaturierungspuffer belassen. Anschließend soll eine Renaturierung des erwünschten Proteins durch eine rasche Verdünnung in einem Renaturierungspuffer stattfinden. Dafür gibt es im iFOLD<sup>TM</sup>–System eine 96-*well* Platte, die mit 92 verschiedenen, empirisch ermittelten Renaturierungspuffern bestückt ist. Mit einer Mehrkanalpipette wurden 50 µl mit dem im oben beschriebenen alternativen Denaturierungspuffer vorliegendem His<sub>6</sub>-EndoG zu je 450 µl Puffergemisch in die 96-wells der iFOLD<sup>TM</sup>Matrix gegeben und resuspendiert. Die Platte wurde anschließend ü.N. bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur inkubiert. In der Abb. 3-4 ist eine Aufnahme der Platte nach der Inkubation zu sehen. Man erkennt, dass in den meisten wells Proteine ausgefallen waren. In 14 wells war die Lösung aber relativ klar, was ein Hinweis darauf war, dass das His<sub>6</sub>-EndoG hier gelöst war. In Tabbelle **3-1** ist aufgeführt in welchen wells diese Beobachtung gemacht wurde und um welchen Puffer der iFOLD<sup>TM</sup>Matrix es sich jeweils handelte. Im Anhang ist die iFOLD<sup>TM</sup>Matrix komplett

dargestellt. Mit den 14 in Frage kommenden Proben, wurden Plasmid-Spaltassays durchgeführt. In keinem Fall konnte eine Nukleaseaktivität bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3-4: iFOLD<sup>TM</sup> 96-well Platte mit His<sub>6</sub>-EndoG aus *E. coli*: Gezeigt ist eine Aufnahme der iFOLD<sup>TM</sup>-Matrix nach Hinzufügen von mit Guanidiniumchlorid gelöster His<sub>6</sub>-EndoG nach einer ü.N. Inkubation bei RT. In 14 der 92 Renaturierungspuffer enthaltenden *wells* ist die Lösung relativ klar geblieben, was auf nicht wieder ausgefallenes Protein hinweist.

Tab. 3-1: Pufferzusammensetzung d	er iFOLD <sup>TN</sup>	<sup>4</sup> Matrix <i>wells</i> ,	mit anscheinend	löslicher
His <sub>6</sub> -EndoG				

iFOLD <sup>TM</sup> Matrix	Puffer		
Koordinate			
2A	50 mM Tris pH 7.0; 1 mM TCEP; 20 % Glycerin		
8A	50 mM Tris pH 7.0; 500 mM L-Arg; 1 mM EDTA		
2B	50 mM Tris pH 7.0; 1 mM EDTA; 3.8 mM GSH;		
	1.2 mM GSSG; 500 mM L-Arg		
4B	50 mM Tris pH 7.0; 100 mM NaCl; 12.5 mM β-Cyclodextrin;		
	3.8 mM GSH;1.2 mM GSSG; 500 mM GuHCl		
10B	50 mM Tris pH 7.0; 250 mM NaCl; 500 mM L-Arg		
7C	50 mM Tris pH 7.5; 250 mM NaCl; 12.5 mM β-Cyclodextrin;		
	1 mM TCEP; 500 mM L-Arg		
8C	50 mM Tris pH 7.5; 12.5 mM β-Cyclodextrin;		
	500 mM L-Arg		
2D	50 mM Tris pH 7.5; 1 mM EDTA; 12.5 mM β-Cyclodextrin;		
	3.8 mM GSH;1.2 mM GSSG; 500 mM L-Arg		
8E	50 mM Tris pH 8.0; 500 mM L-Arg		
10E	50 mM Tris pH 8.0; 12.5 mM β-Cyclodextrin;		
	500 mM GuHCl		
8F	50 mM Tris pH 8.0; 250 mM NaCl; 500 mM L-Arg		
4G	50 mM Tris pH 8.5; 100 mM NaCl; 500 mM L-Arg;		
	12.5 mM β-Cyclodextrin; 1 mM TCEP;		
9G	50 mM Tris pH 8.5; 500 mM L-Arg; 1 mM EDTA;		
9H	50 mM Tris pH 8.5; 250 mM NaCl; 500 mM L-Arg		

### 3.1.7 Zusammenfassung des Kapitels 3.1

Um Proteinpräparationen zu erhalten, mit denen es eventuell möglich wäre die Kristallstruktur von EndoG zu ermitteln, wurde bovine EndoG in Bakterien überexprimiert. Da bekannt ist, dass EndoG hierbei *inclusion bodies* bildet, wurde zunächst versucht durch eine Fusion, in diesem Falle mit NusA, die Löslichkeit von EndoG zu steigern und eine korrekte Faltung zu erreichen, wie es in der Literatur auch schon für andere Proteine erreicht wurde<sup>88</sup>. Es wurde zwar ein lösliches Fusionsprotein erhalten, und auch nach einer Abspaltung von EndoG von NusA mit Thrombin, war EndoG immer noch löslich, aber eine Nukleaseaktivität war weder als Fusionsprotein noch als abgespaltenes Protein vorhanden.

In weiteren Experimenten wurde versucht, lösliches und aktives EndoG aus den gebildeten *inclusion bodies* zu gewinnen. Bei allen angewandten Methoden wurden die *inclusion bodies* zunächst mit einem chaotropen Agens gelöst und denaturiert. Anschließend wurde versucht das Agens vollständig zu entfernen oder ausreichend zu verdünnen, damit dabei eine korrekte Rückfaltung bzw. Renaturierung von EndoG stattfinden kann. In zwei der oben beschriebenen Ansätze (**3.1.4** und **3.1.6**) wurde in Harnstoff oder Guanidiniumchlorid gelöstes EndoG, in potenziellen Renaturierungspuffern blitzartig verdünnt. In einem Fall konnte über SDS-PAGE bestätigt werden, dass lösliches EndoG vorhanden war, im Falle der Versuche mit dem iFold<sup>TM</sup>-System wurde dies in 14 von 92 Proben vermutet, da keine, oder kaum Präzipitate zu sehen waren (Abb. **3-4**). Allerdings lieferten die erhaltenen Proteinpräparationen keine nennenswerte Aktivität.

Eine der Vorgehensweise bei dem iFold<sup>TM</sup>-System sehr ähnliche Methode, die angewandt wurde, um aus *inclusion bodies* hohe Mengen an aktiver His<sub>6</sub>-EndoG zu gewinnen, basierte auf der Entfernung und des Ersatzes des chaotropen Agens (Harnstoff/Guanidinumchlorid) durch ein Detergenz, welches den denaturierten Zustand aufrecht erhalten sollte. In diesem Zusammenhang wurden fünf verschieden Detergenzien getestet (s. **3.1.5**). Diese Detergenzien wurden dann wiederum durch ein künstliches Chaperon, nämlich β-Cyclodextrin ersetzt, wobei nun die korrekte Rückfaltung stattfinden sollte<sup>87</sup>. Die Prozedur wurde hier mit an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule immobilisiertem Protein durchgeführt, und die His<sub>6</sub>-EndoG wurde anschließend mit Imidazol von der Säule eluiert. In allen fünf parallel durchgeführten Fällen wurde lösliche His<sub>6</sub>-EndoG erhalten. Allerdings konnte wieder keine hohe Nukleaseaktivität der gelösten Endonuklease G festgestellt werden.

# 3.2 Rekombinante humane DNase IIa

### 3.2.1 Klonierung von humaner DNase IIa

Aus der Literatur ist bekannt, dass native DNase II $\alpha$  an vier Asparaginresten glykosiliert vorliegt<sup>69</sup>. Bakterien besitzen nicht die Fähigkeit, von ihnen exprimierte Proteine zu glykosilieren. Um rekombinante humane DNase II $\alpha$  dennoch herstellen und *in vitro* untersuchen zu können, wurde daher ein Expressionssystem für Säugerzellen gewählt, da in diesen eine Glykosilierung gewährleistet ist und die korrekte Faltung eines überexprimierten Proteins erwartet werden kann. Die für DNase II $\alpha$  kodierende cDNA wurde mit Hilfe der PCR in eine modifizierte Variante des Vektors pCI (Promega) kloniert. Als Quelle diente ein Klon der NIH Mammalian Gene Collection (MGC) mit der Nummer 5502061 (Invitrogen). Die Namen der hergestellten Plasmide, und die dafür gebrauchten Restriktionsendonukleasen können im Teil "Materialien und Methoden" (s. **2.2.4**) ersehen werden. Mit Hilfe dieser Plasmide konnten humane DNase II $\alpha$ -Konstrukte mit C-terminalen His<sub>6</sub>-, FLAG-His<sub>6</sub>- und HA-Affinitäts-*tags* sowie einem C-terminalen GFP-*tag* in Säugerzellen überexprimiert werden.

### 3.2.2 Überexpression von DNase IIa in Säugerzellen

Der Transfer von Plasmiden für die Überexpression von Proteinen in Säugerzellen erfolgte, wie in Materialien und Methoden (s. **2.5.3**) beschrieben.

Transfektionen für eine Überexpression von YFP-Konstrukten, wurden als Kontrollen parallel zur Überexpression von DNase IIα durchgeführt. Auf diese Art stand eine sichtbare Kontrolle für Plasmidtransfektionen und Proteinüberexpressionen zur Verfügung. In Abbildung **3-5** ist zu sehen, dass YFP in den Zellen überexprimiert wurde. Das YFP mit FLAG-His<sub>6</sub>- oder auch HA-Tag diente außerdem noch als Kontrolle für die Proteinreinigung, d.h. auch als Positivkontrolle bei Western *blots* und weiterhin noch als Negativkontrolle bei DNase-Aktivitätsassays.

Wie auf dem Western *blot* nach Immunodetektion mit Anti-FLAG-Antikörpern (s. **2.1.5**) in der Abbildung **3-6** zu erkennen ist, waren sowohl die Expression als auch die anschließende Proteinpräparation erfolgreich.



Abb. 3-5: HEK-293-T-Zellen mit YFP-FH als Transfektions/Expressionsnachweis: Gezeigt sind zwei 15 ml Zenrifugationsröhrchen mit Pellets von HEK-293-T-Zellen, die von einer 20 mm Schale geerntet wurden, unter UV-Licht (365 nm) Bestrahlung. Die Zellen des im Bild mit "YFP+" beschrifteten Pellets wurden, wie unter 2.5.3.1 beschrieben, mit pCI-YFP-FH transfiziert. Im Vergleich zu dem Pellet von nicht transfizierten Zellen, "YFP-" unten im Bild, ist die Fluoreszenz des exprimierten YFP sehr deutlich zu erkennen.



**Abb. 3-6: Western** *blot* einer Proteinpräparation von DNase IIα-FH wt nach SDS-PAGE: nach einer SDS-PAGE und anschließendem Western *blot* wurden die aus den HEK-293-T-Zellen gewonnenen und durch FLAG-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine immunologisch nachgewiesen. Sowohl DNase IIα-FH Wildtyp (DIIα-FH wt) als auch YFP-FH lagen gebunden an Anti-FLAG-*beads* in DNase IIα-Reaktionspuffer (s. **2.5.5.2**) vor. Es wurden von DIIα-FH wt 15µl (ca. 1/9 einer Gesamtpräparation) und von YFP-FLAG 10 µl (ca 1/14 einer Gesamtpräparation) eingesetzt.

### 3.2.3 Desoxyribonukleaseaktivitätsnachweis von DNase IIa-FH

Um festzustellen, ob die in HEK-293-T-Zellen überexprimierte und dann gereinigte DNase II $\alpha$  mit einem tandemartig angeordneten FLAG-His<sub>6</sub>-*tag* (im Folgenden DII $\alpha$ -FH) Nukleaseaktivität besaß, wurden Plasmid-Spaltassays (s. **2.6.3.2**) mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. In der Abbildung **3-7** ist zu erkennen, dass der Wildtyp der erhaltenen DII $\alpha$ -FH aktiv war. Es wurde Enzym verwendet, welches über FLAG-Immunopräzipitation gereinigt wurde und an die Anti-FLAG-Agarose-*beads* gebunden war.



Abb. 3-7: Aktivitätstest von DII $\alpha$ -FH wt: Gezeigt ist ein 0.8 %iges Agarosegel nach elektrophoretischer Trennung. Die damit analysierte Plasmidspaltung erfolgte in DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer (s. 2.5.5.2) in 10 µl Reaktionsansätzen, für 20 min bei 37°C mit je 200 ng Plasmid-DNA (PBSK). Es wurden 3 unterschiedliche Konzentrationen von DII $\alpha$ -FH eingesetzt. 1, 8 µl unverdünnte Proteinpräparation (ca. 1/18 einer Gesamtpräparation); 1/10, 8 µl einer 1/10 Verdünnung der Proteinpräparation in DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer; 1/100, 8 µl einer 1/100 Verdünnung der Proteinpräparation in DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer; Plasmid, Plasmid-DNA inkubiert ohne Enzym; M, 1 kb Leiter von MBI ;o, *open circular DNA*; 1, *linearized DNA*; c, *covalently closed circular DNA* 

### 3.2.4 Inhibition der Nukleaseaktivität von DIIa durch Wolframat

Die Inhibition der Nukleaseaktivität durch  $WO_4^{2-}$  ist in eine Eigenschaft, die sich DNase II $\alpha$  mit Nuc aus *S. typhimurium* teilt. Um sicherzustellen, dass auch die in dieser Arbeit

produzierte DNase II $\alpha$ diesem Kriterium entspricht, wurden **Plasmid-Spaltassays** durchgeführt. Dabei wurden sowohl DIIa-FH wt, als auch (als Negativkontrolle) die inaktive Mutante DIIa-FH H295A, die parallel über FLAG-Immunopräzipitation gereinigt wurden, verwendet <sup>57</sup>. Als zusätzliche Negativkontrolle diente auf gleiche Weise präpariertes YFP-FH. Als möglicher Inhibitor wurde  $WO_4^{2-}$  (in Form von Natriumwolframat) in einer Endkonzentration Die von 1 mMeingesetzt. Ansätze wurden anschließend gelelektrophoretisch untersucht.

In der Abbildung **3-8** ist das Ergebnis zu sehen. In dem Ansatz, in dem DII $\alpha$ -FH wt ohne Zusatz von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> eingesetzt wurde, ist eine deutliche Aktivität in Form der Abnahme der *supercoiled*-Plasmid-DNA auszumachen, wohingegen das Vorhandensein von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Ansatz dazu führt, dass die Plasmid-DNA größtenteils unverdaut bleibt.

In den Negativkontrollen ist auch keine unerwartete Aktivität oder eine sonstige Auswirkung des Wolframates auf die DNA erkennbar.



Abb. 3-8: Inhibition der Nukleaseaktivität von DNase II $\alpha$ -FH durch Wolframat: Gezeigt ist ein 0.8 %iges TBE-Agarosegel nach elektrophoretischer Trennung zur Analyse eines Plasmid-Spaltassays. Die hier untersuchten Reaktionen fanden in dem DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer (s. 2.5.5.2) in 10 µl Ansätzen statt. Von den über FLAG-Immunopräzipitation bereiteten Proteinpräparationen wurden pro Ansatz 2 µl (ca. 1/70 einer gesamten Präparation) verwendet, die mit 200 ng Plasmid-DNA (PBSK) und mit (+) oder ohne (-) Zusatz von 1 mM (Endkonzentration) Natriumwolframat inkubiert wurden. Die Inkubation fand 5 min bei 37 °C statt. Plasmid, Plasmid-DNA inkubiert ohne Protein; M, 1 kB Leiter von MBI; o, *open circular DNA*; 1, *linearized DNA*; c, *covalently closed circular DNA* 

### **3.2.5** Lokalisation von DNase IIa in der Zelle

Native DNase II $\alpha$  ist im Organismus ubiquitär, also in allen Geweben vorhanden. Auf zellulärer Ebene ist sie hauptsächlich in den Lysosomen zu finden, wobei ein Teil des Enzyms auch in den extrazellulären Raum sekretiert wird <sup>55,89,90</sup>.

Um das Lokalisationsverhalten und die Prozessierung von rekombinanter DNase IIa, in Form eines Fusionsproteins, in eukaryotischen Zellen beobachten zu können, wurden Plasmid-Konstrukte hergestellt, mit denen DNase IIa mit C-terminal angehängtem EGFP (Enhanced überexprimiert werden Green *Fluorescent Protein*) konnte. Konfokale Laser-Rastermikroskopie oder alternativ, einfache Fluoreszenzmikroskopie, wurden für die Beobachtungen angewandt. In allen verwendeten Zelltypen (s. 2.1.7), wurde eine Kolokalisation des DII-EGFP Fusionsproteins mit einem Markerprotein für das endoplasmatische Retikulum (ER), einer DsRed-Express Variante (Meiss, unveröffentlicht), festgestellt, wie in der Abbildungen 3-9 exemplarisch für HeLa Zellen gezeigt wird. In keinem Fall konnte eine Kolokalisation von Zellkernen (Kern-DNA gefärbt mit Höchst 33342) und DIIα-EGFP festgestellt werden.



**Abb. 3-9: Fluoreszenzmikroskopie von transfizierten HeLa Zellen:** Gezeigt sind HeLa-Zellen ca. 18 h nach einer Kotransfektion mit pEGFP-N1-DII und pCI-DsRed-Express-ER. Die Zellen wurden außerdem mit dem Farbstoff Höchst 33342 behandelt. Links ist die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins DIIα-EGFP zu sehen, rechts daneben die rote Fluoreszenz des Markerproteins *DsRed-Express* für das ER. Das dritte Bild von Links zeigt die blaue Fluoreszenz des Höchst 33342 Farbstoff-DNA Komplexes und spiegelt somit die Zellkerne wider. Das rechte Bild ist eine Überlagerung der drei linken und man kann an der mit dem Pfeil gekennzeichneten Zelle einen gelben Bereich um den Zellkern herum ausmachen, der auf eine Lokalisation des DIIα-EGFP im ER hinweist, wohingegen der Zellkern an sich DIIα-EGFP frei ist.

#### Ergebnisse

Als andere Zellkompartimente in dem überexprimierte DIIα-EGFP zu erkennen ist, wurden die Lysosomen ausgemacht, wie in Abbildung **3-10** beispielhaft für LNCaP-Zellen mit dem Lysosomenmarker Lysotracker<sup>TM</sup> gezeigt wird. In der Abbildung ist auch zu erkennen, dass es Teile in der Zelle gibt, die nur entweder DIIα-EGFP oder Lysotracker<sup>TM</sup> enthalten.



Abb. 3-10: Konfokale Laserrastermikroskopie von transient transfizierten LNCaP Zellen: Gezeigt sind LNCaP Zellen, in der unteren Zeile eine einzelne Zelle, ca. 18 h nach einer Transfektion mit pEGFP-N1-DII. Um die Lysosomen sichtbar zu machen, wurden die Zellen außerdem mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lysotracker<sup>TM</sup> behandelt, dessen rote Fluoreszenz in der mittleren Spalte zu sehen ist. Bei Überlagerung der Bilder ist an den gelben Bereichen zu erkennen, dass ein Großteil der exprimierten DII $\alpha$ -EGFP sich geballt in den Lysosomen befindet (goldene Pfeile), aber auch, dass ein Anteil der roten und grünen Fluoreszenzen sich nicht decken (weiße Pfeile).

# **3.2.6** Sequenzalignment-orientierte Analyse von DNase IIα durch *alanine scanning*

Durch das Austauschen von Aminosäureresten, welche katalytisch und/oder strukturell relevant sind gegen Andere, kann bei einer Nuklease eine Veränderung der Nukleaseaktivität

erreicht werden. Solche Aminosäurereste kann man oft finden, wenn man ein Sequenzalignment homologer Proteine betrachtet. In vielen Fällen kann man bei einer solchen Sequenzanalyse auch auf so genannte Motive stoßen, die in den unterschiedlichen Proteinen auftauchen. Diese Motive zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine bestimmte Abfolge von Aminosäureresten aufweisen, die in homologen Proteinen so, oder in geringfügig abgeänderter Weise auch vorkommen bzw. konserviert sind. Bei der in dieser Arbeit untersuchten DNase II $\alpha$  wurden kürzlich zwei PLD-Motive gefunden<sup>70</sup>. Entsprechende Aminosäurereste wurden durch Alanin ersetzt (*alanine scanning*), der auftretende Effekt auf die Nukleaseaktivität untersucht und mit der Aktivität des Wildtyps verglichen.

### 3.2.6.1 Mutagenese konservierter Reste in humaner DNase IIa

Um die gewünschten Mutanten von humaner DNase II $\alpha$  zu erhalten, wurden *in-vitro*-Mutagenesen mittels inverser PCR durchgeführt (s. **2.3.6.2**). Als Template für die erste PCR diente zunächst das Plasmid pCI-DII-His, welches das Wildtypgen von DNase II $\alpha$  enthielt. Das Histidin 122 wurde, obwohl es nicht konserviert ist, ebenfalls ausgetauscht und die Mutante H122A sollte als Positivkontrolle dienen.

Später wurden auch Mutanten mit einer C-terminalem FLAG-His<sub>6</sub> Tandemfusion hergestellt, wobei keine neuen Mutagenesen durchgeführt wurden, sondern in Subklonierungen pCI-DII-His wt und alle Mutanten als Templates für PCRs dienten und die PCR Produkte über Restriktionsschnittstellen in einen neuen Vektor gesetzt wurden, so dass pCI-DII-FH wt und pCI-DII-FH Mutanten entstanden. In Tab. **3-2** sind die Aminosäurereste (AS), die zur Untersuchung ihrer Beteiligung an der Nukleaseaktivität gegen Alanin ausgetauscht wurden, sowie der Name der erstellten Mutante aufgelistet. Für eine Transfektion in Säugerzellen wurden aus den entsprechenden Klonen Plasmid-Maxi-Präparationen angefertigt.

Ursprüngliche AS	Mutante
His 113	H113A
Lys 115	K115A
His 122	H122A*
His 130	H130A
Ser 131	$S131A^{\#}$
Gln 155	$Q155A^{\#}$
Lys 230	K230A <sup>#</sup>
His 295	H295A
Lys 297	K297A
Asp 311	D311A
Asn 313	N313A

Tab. 3-2: Durch Mutagenese hergestellte Mutanten von humaner DNase IIa

\* Von Histidin 122 wird keine katalytische Relevanz erwartet, und die Mutante H122A wurde als Positivkontrolle genutzt.

<sup>#</sup> Diese Mutanten wurden erst gegen Ende der Arbeit hergestellt.

#### **3.2.7** Expression, Reinigung und Nachweis von DNase IIa Mutanten

Die zu untersuchenden Mutanten humaner DNase II $\alpha$  wurden unter Verwendung der entsprechenden pCI-Konstrukte durch transiente Transfektion von HEK-293-T-Zellen exprimiert (s. **2.5.3.1**). Dabei wurde auch stets eine neue Proteinpräparation des Wildtyp-Enzyms als Referenz hergestellt.

Für die Reinigung/Präparation der exprimierten Proteine kamen in dieser Arbeit letztendlich zwei verschiedene Affinitätschromatographien (His- und FLAG-Affinitätschromatographie) zum Einsatz, da sich die erste Reinigungsmethode, bzw. der Nachweis der Proteine, als problematisch erwies. Es wurden zunächst alle Proteinvarianten, für die bis dahin ein Expressionsvektor hergestellt worden war, also alle aus Tab. **3-2** außer jene, die mit "#" markiert sind, als C-terminale His<sub>6</sub>-*tagged* Proteine hergestellt und über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie wie unter Abschnitt **2.5.5.2** beschrieben gereinigt.

Nach einem Western *blot* waren die hergestellten Proteine mit den verfügbaren Anti-His und Anti-DNase IIα Antikörpern allerdings nicht nachweisbar. Es wurden daher andere Plasmid-Konstrukte (s. **3.2.6.1**) hergestellt mit denen DNase IIα mit C-terminalem FLAG-His<sub>6</sub>*tandem-tag* exprimiert werden konnten. Die Herstellung von mit FH-*tag* versehenen Proteinpräparationen, mittels FLAG-Affintätschromatographie, erfolgte wie in Abschnitt **2.5.5.2** beschrieben. In Abbildung **3-11** A ist zu sehen, dass alle derart gereinigten DIIα-FH Konstrukte, inklusive der später hergestellten Mutanten S131A, Q155A und K230A (und YFP-FH als Kontrolle) nach Western *blots* mit Anti-FLAG-Antikörpern detektierbar bzw. nachweisbar waren. Außerdem konnten mit den Anti-FLAG-Antikörpern auch Proteine nachgewiesen werden, die als FH-Konstrukte über magnetische Ni<sup>2+</sup>-NTA-*beads*, wie in **2.5.5.2** beschrieben gereinigt wurden (Abb. **3-11 B**).



FLAG-Affinitätschromatographie / Anti-FLAG Detektion



Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie / Anti-FLAG Detektion

Abb. 3-11: Western *blots* aller DII $\alpha$ -FLAGHis<sub>6</sub>-Varianten nach SDS-PAGE: (A) Die in HEK-293-T-Zellen überexprimierten und durch FLAG-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine, in diesem Fall YFP-FH und alle in dieser Arbeit hergestellten DII $\alpha$ -FH-Varianten konnten nach einer SDS-PAGE und anschließendem Western *blot* immunologisch durch Anti-FLAG Antikörper nachgewiesen werden. Die Varianten S131A, Q155A und K230A wurden erst nach den anderen Varianten hergestellt und sind deshalb separat untersucht worden. (B) Mit dem Anti-FLAG-Antikörper konnten auch über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigte DII $\alpha$ -FLAGHis<sub>6</sub>-Varianten (wt und 8 Mutanten) sowie eine YFP-FH Positivkontrolle immunologisch nachgewiesen werden. Die zuerst erstellten Mutanten sind in der Abbildung den postulierten PLD-Motiven zugewiesen, wobei H122A zu keinem Motiv gehört, sondern eine Positivkontrolle darstellt. Von den Präparationen wurden je 20 µl (ca. 1/7 einer Gesamtpräparation) auf die SDS-Gele aufgetragen.

### 3.2.8 Nukleaseaktivitätsassays mit DNase IIa-FH wt und Mutanten

#### 3.2.8.1 Kunitzassay mit DNase IIa-FH wt und Mutanten

Um die Nukleaseaktivität von DIIα-FH Mutanten mit der des Wildtyps zu vergleichen, wurde als eine Möglichkeit, der Hyperchromizitäts- bzw. Kunitzassay (s. **2.6.3.1**) genutzt. Dabei

wurden die bis dahin verfügbaren DIIα-FH Varianten, also nicht die Mutanten S131A, Q155A und K230A, verwendet. In der Abbildung **3-12** ist die Aktivität der DIIα-FH Varianten (und YFP-Kontrolle) in Form von Absorptionszunahme/Zeit dargestellt.

Man kann erkennen, dass von allen Mutanten die Positivmutante DIIα-FH H122A diejenige ist, deren Aktivität der des Wildtyps am nächsten kommt. Von den anderen Mutanten lieferte in diesem Assay keine eine nennenswerte Aktivität.



Abb. 3-12: Kunitzassay mit DII $\alpha$ -FH: Dargestellt ist die Zunahme der Absorption der als Substrat dienenden DNA (hochmolekulare DNA, aus Heringssperma (Sigma)) über die Zeit, durch den hyperchromen Effekt. Die Absorption wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug 100 µl. Als Puffer wurde der DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer verwendet, die Ansätze enthielten 0.1 mg/ml DNA und von den an FLAG-*beads* gebundenen Präparationen wurden je 15 µl (ca. 1/9 einer Gesamtpräparation) eingesetzt. Inkubiert wurde bei Raumtemperatur.

#### 3.2.8.2 Plasmid-Spaltassays mit DNase IIα-FH wt und Mutanten

Sowohl mit den über FLAG-beads als auch mit den über Ni<sup>2+</sup>-magnetic beads gereinigten DIIa-FH Präparationen wurden Plasmid-Spaltassays (s. 2.6.3.2) durchgeführt. In Abbildung 3-13 A sind die Ergebnisse der Plasmid-Spaltassays mit den über FLAG-Affinitätschromatographie gereinigten DIIa-FH Varianten, auch der später hergestellten drei Mutanten, zu sehen. Abbildung 3-13 B zeigt den Plasmidverdau durch über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Proteinpräparationen (wt und 8 Mutanten). Überexprimiertes und auf gleiche Art, wie DIIa-FH-Proteine gereingtes YFP-FH diente in den Spaltassays als Negativkontrolle. Alle in diesen Plasmid-Spaltassays eingesetzten Präparationen waren jene, welche auch erfolgreich mit FLAG-Antikörpern immunologisch nachgewiesen wurden (s. 3.2.7). Es ist zu erkennen, dass in allen Fällen DII $\alpha$ -FH hochaktiv gegenüber allen Mutanten war. Von den Mutanten, zeigten die Positivkontrolle H122A und die Mutante D311A die höchste Aktivität (bezogen auf das linke Gel in Abb. 3-13 A), während die Negativkontrolle, nämlich das YFP-FH nukleolytisch inaktiv blieb. Die Mutanten S131A, Q155A und vor allem K230A (Aktivität dargestellt im rechten Gel in Abb. 3-13 A) zeigten alle Nukleaseaktivität, zwar weniger als der Wiltyp, durch den das Plasmid in der gegebenen Zeit komplett verdaut wurde, aber dennoch soviel, dass eine Aussage über die katalytische Relevanz nicht gut möglich bzw. zumindest der Aminosäurerest K230 als nicht essentiell eingestuft werden sollte. Die Tendenzen der Aktivität, der verschieden gereinigten Proteine, im Plasmidspaltassay gleichen sich überwiegend. Eine Ausnahme ist die Mutante D311A, die im Falle der Präparation mit magnetischen Ni<sup>2+</sup>-beads im Vergleich zu den anderen Mutanten, keine auffallend hohe Nukleaseaktivität zeigte. Es zeigte nur die Positivmutante H122A eine relativ hohe Aktivität; In der Abb. 3-13 B sieht man, dass mit ihr auch noch ein Großteil des linearisierten Plasmids noch weiter abgebaut wurde.

## **3.2.9** Gelfiltration zur Untersuchung der aktiven Spezies rekombinanter DNase IIα

In einem Versuch die molekulare Masse der aktiven Spezies rekombinanter DNase II $\alpha$  zu bestimmen, wurden Gelfiltrationsexperimente mit Zellextrakten aus HEK-293-T-Zellen, die zuvor mit pCI-DII-FH transfiziert worden waren, durchgeführt. Aus den Fraktionen, die von der Gelfiltrationssäule eluierten, wurden FLAG-His<sub>6</sub>-fusionierte Proteine durch einen *pulldown* mit Anti-FLAG-*beads* isoliert (s. **2.6.2**). Als Kontrollen wurden in Zellen überexprimiertes DII $\alpha$ -FH H295A (eine inaktive Mutante) und Zellextrakt aus nicht transfizierten HEK-293-T-Zellen verwendet. Mit den so erhaltenen Präparationen wurden Plasmid-Spaltassays und, im Falle des Wildtyps, auch eine SDS-PAGE mit anschließendem Western *blot* durchgeführt (Abb. **3-14**). Nach der Gelfiltration über eine Superdex 75 Säule, erschien das Protein DNase II $\alpha$  und die Nukleaseaktivität hauptsächlich in Fraktionen, die einer molekularen Masse von 44-22 kD entsprachen, was auf ein Monomer als aktive molekulare Spezies schließen ließe. Die offensichtlich höchste DNase II $\alpha$ -Aktivität eluierte bei der Größe von Chymotrypsinogen  $\alpha$  (22 kD), welches als ein Marker für die Gelfiltration benutzt wurde. Allerdings ergaben die SDS-PAGE und anschließender Western *blot*, dass es sich auch bei der molekularen Spezies, die bei dieser apparenten Größe (22 kD) von der Säule



Nach Flag-Affinitätschromatographie



Nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

**Abb. 3-13: Plasmid-Spaltassays mit DNase IIα-FH wt und DNase IIα-FH Mutanten:** Die Darstellung zeigt 0.8 %ige ethidiumbromidgefärbte TBE-Agarosegele von Plasmid-Spaltansätzen nach elektrophoretischer Trennung. Eingesetzt wurden überall je 8 µl (ca. 1/18 einer Präparation) "Enzym". Bei allen Ansätzen wurde der DNase IIα-Reaktionspuffer benutzt. (A) Plasmid-Spaltassays mit über FLAG-Affinitätschromatographie gereinigten Proteinen. DIIα-FH wt wurde bei dem Versuchsansatz für das linke Gel auch noch in 2 Verdünnungen eingesetzt. Inkubiert wurden alle Ansätze bei 37 °C, beim linken Bild für 20 min und beim rechten Bild für 45 min. (B) Plasmid-Spaltassays mit über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigten Proteinen. Inkubation erfolgte bei 37 °C für 15 Minuten. Plasmid, Plasmid-DNA inkubiert ohne Enzym; M, 1 kb Leiter von MBI; o, *open circular DNA*; 1, *linearized DNA*; c, *covalently closed circular DNA* 

eluierte, wohl um eine durchgehende Polypeptidkette mit einer Größe von etwa 45 kD handelte (Abb. **3-14 B**). Für die starke Retention der DNase II $\alpha$ -FH auf der Säule waren höchstwahrscheinlich die bei reifer DNase II $\alpha$  vorhandenen Glykosylgruppen verantwortlich, die mit der Gelfiltrationsmatrix interagiert haben könnten.



FLAG-Immunopräzipitate / Anti-FLAG Detektion

Abb. 3-14: Gelfiltration mit Zellextrakten aus mit pCI-DII-FH Konstrukten tranfizierten HEK-293-T-Zellen: (A) Gezeigt sind drei 0.8 % ige, ethidiumbromidgefärbte TBE-Agarosegele nach elektrophoretischer Trennung. Auf die Gelspuren aufgetragen wurden je die Hälfte von insgesamt 20 µl großen Plasmid-Spaltansätzen, bei denen 2 µl (ca. 1/25 einer gesamten Präparation aus einer Fraktion) der FLAG-Immunopräzipitationen, aus den entsprechenden Gelfitrationsfraktionen eingesetzt wurden. Als Reaktionspuffer wurde der DNase IIα-Reaktionspuffer verwendet, und es wurde jeweils 10 min bei 37 °C inkubiert. In der Abbildung sind die bei der Gelfiltration verwendeten Markerproteine (BSA, Ovalbumin und ihrer Größe entsprechenden Fraktionen zugeordnet. (B) Anti-FLAG Chymotrypsinogen  $\alpha$ ) den Immunodetektion nach SDS-PAGE und Western blot mit den DIIa-FH wt pulldown-Präparaten aus den Fraktionen Nr. 13-24. Starke Detektions-Signale wurden von den Fraktionen Nr. 18-21 erhalten, die in dieser Gelfiltration Größen von 44-22 kD entsprechen. Allerdings liefen alle sichtbaren Banden bei der SDS-Page auf einer Höhe von etwa 45 kD. Für die SDS-PAGE wurden je 10 µl Aliquots (ca. 1/5 einer gesamten Präparation aus einer Fraktion) der Proteinpräparationen auf das SDS-Gel aufgetragen. Plasmid, Plasmid-DNA inkubiert ohne Enzym; M, 1 kb Leiter von MBI; BSA, Bovines Serumalbumin; Chym.a, Chymotrypsinogena

# **3.2.10** Coimmunopräzipitationsassays von DNase IIα-HA und DNase IIα -FH Fusionsproteinen

Um die Quartärstruktur der aktiven DNase IIa Spezies weiter zu untersuchen, wurden zusätzlich zur Gelfiltrationsanalyse, Coimmunopräzipitationsassays von FLAG-His<sub>6</sub>- und HA-Epitop fusionierten Varianten von DNase IIa durchgeführt. Hierfür wurden HEK-293-T-Zellen mit pCI-DII-FH wt und entweder pCI-DII-FH H113A (eine inaktive Variante) oder pCI-DII-HA wt co-transfiziert. Zur Kontrolle wurden HEK-293-T-Zellen auch mit Konstrukten für die Überexpression von YFP-FH und YFP-HA transfiziert. Für die Immunopräzipitationen wurden entweder das EZview™ Red ANTI-HA<sup>®</sup> Affinity Gel oder das  $EZview^{TM}$  Red ANTI-FLAG<sup>®</sup> Affinity Gel benutzt. Dabei wurde wie in Materialien und Methoden Abschnitt 2.5.5.2 beschrieben vorgegangen. Die durch die Präzipitationen erhaltenen Proteinpräparationen, wurden durch Western blots mit anschließender Immundetektion und durch einen Plasmid-Spaltassay auf mögliche Dimerisierung der DNase IIa Proteine untersucht (Abb. 3-15). Eine Dimerisierung von DNase IIa wurde in keinem der Coimmunopräzipitationsexperimente, weder mit Anti-FLAG-Agarose, noch mit Anti-HA-Agarose festgestellt (Abb. 3-15 A). Dieses Ergebnis wurde durch den Plasmid-Spaltassay mit den hier untersuchten Proteinpräparationen bestätigt (Abb. 3-15 B). Nukleaseaktivität wurde nur erhalten, wenn aktive DNase IIa direkt, also DIIa-FH wt über Anti-FLAG-Agarose, bzw. DIIa-HA wt über Anti-HA-Agarose präzipitiert wurde. So lieferte z.B. eine Präparation, bei der Zellen zuvor mit dem Konstrukt für die FH-fusionierte inaktive Variante H113A, und dem für den HA-fusionierten wt transfiziert worden waren, nur dann Aktivität, wenn die Immunopräzipitation mit Anti-HA-Agarose durchgeführt wurde.



**Abb. 3-15: Untersuchung von coexprimierten DNase IIa Varianten mit unterschiedlichen Epitopfusionen:** (A) Gezeigt sind Anti-FLAG (oberes Bild) und Anti-HA (unters Bild) Immunodetektionen nach SDS-PAGE und Western *blots.* Pro Coexpression wurden zwei getrennte Immunopräzipitationen, nämlich mit Anti-Flag- und Anti-HA-Agarose durchgeführt und von den erhaltenen Präparationen wurden je 20  $\mu$ l (ca. 1/7 einer Präparation) auf eine Spur eines SDS-Gels geladen. Nur die Proteinvarianten, die direkt spezifisch präzipitiert wurden, wurden detektiert. (B) Abbgebildet ist ein 0.8 %iges, ethidiumbromidgefärbtes TBE-Agarosegel nach elektrophoretischer Trennung, auf dem Ansätze eines Plasmid-Spaltassays aufgetragen wurden. Als potenziell nukleolytisch aktive Proben, wurden 10  $\mu$ l Aliquots der über Immunopräzipitation hergestellten Präparate benutzt. Die Reaktion fand mit DNase II $\alpha$ -Reaktionspuffer und 200 ng Plasmid DNA (PBSK) für 30 min bei 37 °C statt. Nur direkt an Anti-FLAG bzw. an Anti-HA-Agarose gebundene wt Varianten von DNase II $\alpha$  lieferten Nukleaseaktivität. Als Kontrollen dienten YFP-FH und YFP-HA. Plasmid, Plasmid-DNA inkubiert ohne Enzym; M, 1 kb Leiter von MBI; o, *open circular DNA*; 1, *linearized DNA*; c, *covalently closed circular DNA* 

### **3.2.11** Zusammenfassung des Kapitels 3.2

Die wt-Variante von rekombinanter, reifer, humaner DNase IIα wurde als FLAG-His<sub>6</sub> und HA-Fusionsprotein in Säugerzellen (HEK-293-T-Zellen) exprimiert und über Affinitätschromatographie bzw. Immunopräzipitationen gereinigt. Mit den erhaltenen Proteinpräparationen konnten die DIIα-Varianten dann durch Western *blotting* mit anschließender Anti-FLAG- bzw. Anti-HA-Immunodetektion nachgewiesen werden.

Durch Plasmid-Spaltassays wurde gezeigt, dass rekombinante DNase II $\alpha$  Nukleaseaktivität besaß und in einem weiteren Plasmid-Spaltassay, dass die hergestellte DNase II $\alpha$  in ihrer Aktivität durch 1 mM WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> inhibierbar war.

Mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie oder einfacher Fluoreszenzmikroskopie konnte beobachtet werden, dass DNase II $\alpha$  mit C-terminaler EGFP-Fusion, überexprimiert in Säugerzellen, im endoplasmatischen Retikulum und in den Lysosomen der Zellen lokalisiert ist, und eine C-terminale Fusion anscheinend keinen Einfluß auf die korrekte Prozessierung überexprimierter DNase II $\alpha$  hat.

Anhand von Sequenzalignments und dem DNase II $\alpha$  Modell, welches ein N- und ein C-terminales PLD-Motiv aufweist, wurden Aminosäurereste der DNase II $\alpha$ -FH ausgewählt, die durch Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht wurden, um ein *alanine scanning* durchzuführen. Alle gereinigten Proteinvarianten wurden durch Western *blots* nachgewiesen. Von den hergestellten Mutanten zeigten, außer der Positivkontrolle H122A, alle weiteren Histidinmutanten keine nukleolytische Aktivität mehr, was ihre hohe katalytische Relevanz widerspiegelt.

Zur Untersuchung der molekularen Masse und der Quartärstruktur aktiver DNase II $\alpha$  Spezies, wurden zum einen Gelfiltrationsanalysen und zum anderen Coimmunopräzipitationsassays mit verschiedenen Epitop-fusionierten DNase II $\alpha$  Varianten, durchgeführt. In HEK-293-T-Zellen überexprimierte DNase II $\alpha$  eluierte von der Gelfiltrationssäule in Fraktionen, die den Größen 44-22 kD entsprachen. SDS-PAGE, Western *blotting* und anschließende Immunodetektion zeigten aber, dass die Proteinpräparationen aus diesen Fraktionen alle eine Größe von etwa 45 kD besaßen, was auf eine monomere Quartärstruktur

der aktiven Spezies schließen lässt. Die Aktivität wurde durch einen Plasmid-Spaltassay gezeigt.

Die Coimmunopräzipitationsassays untermauerten die These, dass humane DNase II $\alpha$  im Gegensatz zur DNase II $\alpha$  aus dem Schwein als eine durchgehende Polypeptidkette aktiv ist. Es wurde festgestellt, dass unter den Bedingungen des Versuches, zwischen DNase II $\alpha$ -FH und DNase II $\alpha$ -HA keine Dimerisierung stattfand, aber dennoch Nukleaseaktivität vorhanden war, die in Plasmid-Spaltassays gezeigt werden konnte.

## **4** Diskussion

# 4.1 Endonuklease G

Das Ausmaß der biologischen Bedeutung der Endonuklease G (EndoG) ist derzeit schwer abschätzbar. Im Laufe ihrer Erforschung wurden dieser DNA/RNA-unspezifischen Nuklease mehrere wichtige biologische Funktionen zugeschrieben wie etwa die Beteiligung an mitochondrialer DNA-Replikation und die Initiation von genomischen Inversionen im *Herpes simplex*-Virus Typ1<sup>41,43</sup>. Die momentan am häufigsten diskutierte und wohl bekannteste Aufgabe von EndoG ist ihre Beteiligung an der Degradierung von chromosomaler DNA während der Apoptose<sup>51</sup>.

Bovine, rekombinante EndoG wurde bereits weitgehend biochemisch charakterisiert und darüber hinaus existiert auch ein Homologiemodell der dreidimensionalen Struktur boviner EndoG<sup>34</sup>, wobei die Kristallstruktur der *Serratia* Nuklease<sup>91</sup> als Vorlage bei der Erstellung des Modells diente.

Eine weitere Stufe, die zum Verständnis der Funktion und Funktionsweise von EndoG beitragen könnte, wäre erreicht, wenn man die tatsächliche Struktur der aktiven EndoG Spezies kennen würde. Dafür müssten Methoden wie die NMR-Spektroskopie oder die Kristallstrukturanalyse zum Einsatz kommen. Beide Techniken benötigen jedoch Proteinpräparationen von hoher Reinheit und Konzentration. Ein Projekt in dieser Arbeit war es, solche Proteinpräparationen herzustellen, wobei EndoG durch Überexpression aus *E. coli* gewonnen werden sollte.

# 4.1.1 Expression von EndoG in Bakterien: das Problem der *inclusion* bodies

In prokaryotischen Mikroorganismen wie *E. coli*, werden rekombinante Proteine, gerade wenn es sich um Eukaryotische handelt, oft nicht in löslicher Form und mit ihrer biologischen Aktivität produziert. Der Hauptgrund dafür ist, dass Prokaryoten wichtige Bestandteile eukaryotischer Zellen sowie eine entsprechende Kompartimentierung fehlen. Ein weiterer erwähnenswerter Grund ist die reduzierende Wirkung von bakteriellem Cytoplasma, die dazu führen kann, dass eventuell vorhandene Cysteine nicht die Möglichkeit haben native Disulfidbrücken zu bilden.
Rekombinante, in *E. coli* exprimierte Proteine, liegen daher oft intrazellulär in sog. *inclusion bodies*, das sind große Aggregate falsch gefalteter Moleküle, vor. Schon vor 20 Jahren hat man festgestellt, dass dies bei eukaryotischen Polypeptiden sogar eher die Regel als die Ausnahme ist<sup>92</sup>. Hat man es einmal mit *inclusion bodies* zu tun, steht man, was die weitere Erforschung des entsprechenden Proteins angeht, vor dem Problem der Renaturierung (des Proteins), von dem man zunächst nicht wissen kann, ob und wie schnell dieses lösbar ist. Ein Ausweichen auf Expression in eukaryotischen Zellkulturen führt zwar im Allgemeinen zu löslichen Proteinen, ist jedoch aufwendiger und teurer als das Arbeiten mit Bakterien und resultiert bei einer Durchführung im üblichen Labormaßstab in einer vielfach geringeren Ausbeute.

Wenn man also, trotz *inclusion bodies*, eine hohe Proteinausbeute, wie Bakterien sie liefern, haben möchte, muss man entweder einen Weg finden, durch den die *inclusion bodies* in lösliches und aktives Protein überführt werden können, oder man versucht ihrer Entstehung von vornherein entgegenzuwirken. Was die zweite Möglichkeit angeht, gibt es eine Reihe von "löslichkeitsfördernden" Proteinen, mit deren Gen man das Gen des in *E. coli* zu exprimierenden Proteins fusionieren kann<sup>93</sup>. Im optimalen Fall erhält man bei einer Expression ein lösliches Fusionsprotein, dessen "Passagierproteinanteil" korrekt gefaltet, und auch nach einer Abspaltung durch eine geeignete Protease, löslich und bioaktiv ist.

Um Proteine aus *inclusion bodies* zu renaturieren, kann man eine Vielzahl von Methoden anwenden. In manchen Fällen genügt schon eine Behandlung mit Detergenzien. Meistens ist es notwendig chaotrope Agenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid einzusetzen, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu lösen und die *inclusion bodies* in eine lösliche, aber auch denaturierte Form zu bringen. Eine Renaturierung und Reaktivierung kann anschließend nur durch eine "Entfernung" des chaotropen Agens erreicht werden. Wie diese "Entfernung" stattfinden muss, ist vom entsprechenden Protein abhängig. In günstigen Fällen genügt es, die gelöste Präparation gegen einen Puffer zu dialysieren. Ein Vorteil hierbei ist, dass dabei die Proteinpräparation nur geringfügig verdünnt wird. Meistens ist es, was die Renaturierung angeht, jedoch deutlich effektiver das chaotrope Agens durch Mischung mit einem großen Überschuß an Agens-freiem Puffer blitzartig zu verdünnen. Im Übrigen gibt es keinen "Königsweg" zur Renaturierung von Proteinen aus *inclusion bodies*<sup>94</sup>. Seit etwa zwei Jahren existiert die über das Internet zugängliche Datenbank *REFOLD database*, in der publizierte Methoden für die Rückfaltung von Proteinen gesammelt (zur Zeit sind es knapp über 650 Einträge) vorliegen<sup>95</sup>. Als mitochondriales Protein besitzt EndoG eine N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz (48 As), die während der Translokation in den Intermebranraum abgespalten wird und zu dem kürzeren, "reifen" EndoG führt. EndoG wurde in dieser Arbeit ohne die Lokalisationssequenz in *E. coli* überexprimiert. Dabei sammelte sich EndoG in *inclusion bodies* in den Zellen an. Diese ließen sich nicht durch Behandlung mit Detergenzien in Lösung bringen (Meiss, persönliche Mitteilung). Im Laufe dieser Arbeit wurde durch Anwendung verschiedener Expressions- und Rückfaltungsstrategien versucht, EndoG dennoch als aktive Nuklease zu gewinnen.

### **4.1.2** EndoG als Fusionsprotein mit NusA

In der Literatur sind einige Proteine beschrieben<sup>96,97</sup>, die die Löslichkeit eines Fusionspartners bei einer Expression in *E. coli* erhöhen und darüber hinaus auf unbekannte Art und Weise, dazu beitragen können, dass der Fusionspartner über seine spezifische Bioaktivität verfügt. Zu diesen löslichkeitsfördernden Proteinen gehören NusA (*N utilization substance A*), BFR (Bakterioferritin), GrpE (*Glucose-regulated protein E*), Thioredoxin, GB1 (GB1 Domäne von Protein G aus Streptococcus aurorus), MBP (*maltose binding protein*), GST (Glutathion-S-Transferase) und SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). N-terminale Fusionen von boviner EndoG mit Thioredoxin und GST wurden bereits in *E. coli* exprimiert, ohne dass die Fusionsproteine sich in der löslichen Fraktion befunden haben (Meiss, unveröffentlicht).

In dieser Arbeit wurde das Gen für bovine EndoG (ohne die N-terminale Lokalisationssequenz) in den pET44a Vektor kloniert, so dass ein His<sub>6</sub>-Nus-EndoG Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden konnte (s. **3.1.3**). Es stellte sich heraus, dass ein Großteil des Fusionsproteins löslich und nur ein geringer Teil unlöslich war. In der löslichen Fraktion befand sich auch ein Anteil von His<sub>6</sub>-Nus, was nicht ungewöhnlich ist, denn bei GST-Fusionsproteinpräparationen wurde auch schon beobachtet, dass ein geringer Teil von GST unfusioniert vorliegt. Das ist höchstwahrscheinlich auf einen vorzeitigen Abbruch der Translation oder *E. coli* eigene Proteasen zurückzuführen, die die leicht zugängliche Linkerregion zwischen den Fusionspartnern spalten konnten.

Als Kontrolle wurde auch His<sub>6</sub>-Nus, also das "Löslichkeitsprotein" alleine exprimiert, und auch hier blieb ein Teil des Proteins in der unlöslichen Fraktion. Der Anteil an löslichem Protein, in Bezug auf die Gesamtmenge, war bei His<sub>6</sub>-Nus-EndoG und His<sub>6</sub>-Nus in etwa gleich. Offensichtlich hatte das "Passagierprotein" keinen Einfluss auf die Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins. Auch nach einer Abspaltung EndoGs von His<sub>6</sub>-Nus durch Thrombin, blieben beide Proteine in Lösung. Eine Faltung von EndoG in eine lösliche Form

hatte demnach offenbar stattgefunden. Allerdings erwiesen sich weder His<sub>6</sub>-Nus-EndoG noch abgespaltenes EndoG als nukleolytisch aktiv. Von einer Aktivierung kann hier also nicht die Rede sein. Selbst ohne die Thrombinspaltung hätte man schon eine Nukleaseaktivität erwarten können, wenn der EndoG-Anteil des Fusionsproteins richtig zurückgefaltet worden wäre; trotz N-terminaler GST-Fusion ist überexprimiertes GST-EndoG aus HEK-293-T-Zellen hochaktiv.

### 4.1.3 Rückfaltung von EndoG aus inclusion bodies

Mit der oben behandelten Methode, nämlich der Fusion mit einem löslichkeitsfördernden Protein, ließ sich keine brauchbare aktive EndoG-Präparation herstellen.

Es wurde also nach einer Möglichkeit gesucht, EndoG aus den *inclusion bodies* zu renaturieren und reaktivieren. Puffer mit 6.5 M Harnstoff und 5 M Guanidiniumchlorid waren in der Lage, die *inclusion bodies* zu lösen und zunächst ist versucht worden, durch einfache Dialyse, den Harnstoff bzw. das Guanidiniumchlorid zu entfernen, und EndoG so zu renaturieren. Allerdings fiel das Protein während der Dialyse aus (Meiss, persönliche Mitteilung). Das langsame Entfernen der chaotropen Agenzien hatte also dazu geführt, dass EndoG mißgefaltet und unlöslich wurde.

### 4.1.3.1 Anwendung einer veröffentlichten Rückfaltungsstrategie für EndoG

2002 wurde von Ohsato *et al.* eine *in vitro* Rückfaltungsstrategie, für humane EndoG aus Überexpression in *E. coli* veröffentlicht<sup>42</sup>. Einzelheiten, die bei dieser Technik zu nennen wären sind folgende: EndoG war mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehen und wurde in durch Harnstoff denaturierter Form an Ni<sup>2+</sup>-*beads* gebunden. Die Rückfaltung fand auf den Ni<sup>2+</sup>-*beads* durch schrittweise Reduktion der Harnstoffkonzentration statt, indem mit einer Reihe von Puffern gewaschen wurde, die je 0.5 M weniger Harnstoff enthielten (bis hin zu 0 M), als der vorherige Puffer. Um der Bildung von nicht nativen Disulfidbrücken entgegenzuwirken, kamen DTT und 2-Mercaptoethanol zum Einsatz.

Nach diesem Protokoll wurde auch in diesem Labor verfahren, und lösliches EndoG mit hoher Ausbeute erhalten. Allerdings war die Nukleaseaktivität dieser Proteinpräparationen sehr gering, vor allem im Vergleich zu GST-EndoG aus eukaryontischen Zellen, dessen Herstellung zu dem Zeitpunkt schon etabliert war. Aus diesem Grund wurden weitere Rückfaltungsmethoden getestet.

### 4.1.3.2 Blitzartige Verdünnung von denaturierter EndoG

Generell gilt eine schnelle Verdünnung von mit Harnstoff oder Guanidiniumchlorid gelösten und denaturierten Proteinen als besser geeignet für eine "Entfernung" des chaotropen Agens und eine Renaturierung/Reaktivierung des Proteins, als eine Dialyse.

Daher wurde dieses Prinzip auch mit EndoG versucht, wobei es sich um His<sub>6</sub>-EndoG exprimiert in *E. coli* handelte, welches in einem Puffer mit 6.5 M Harnstoff gelöst vorlag. Als Verdünnungs- bzw. Renaturierungspuffer wurde ein Puffer verwendet (s. **3.1.4**), der sich schon für andere Proteine als dafür geeignet erwiesen hatte (Meiss, persönliche Mitteilung). Nach einer 1:100 Verdünnung der Probe blieb His<sub>6</sub>-EndoG zum Teil in Lösung, aber ein Versuch, das Protein anschließend über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie zu reinigen scheiterte daran, dass es nicht an das Säulenmaterial band. Der Grund dafür wird wahrscheinlich sein, dass EndoG zwar in eine lösliche Form gebracht wurde, aber der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag anscheinend nicht mehr für die Nickelionen der Chromatographiematrix zugänglich war.

In Anlehnung an die Faltungsmethode von Ohsato *et al.*, (s. **4.1.3.1**), bei der die Rückfaltung von His<sub>6</sub>-EndoG auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule stattfindet, wurde dann versucht denaturiertes His<sub>6</sub>-EndoG nach der Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA mit dem oben erwähnten Renaturierungspuffer zu renaturieren, was dazu führte, dass 1) ein Großteil des Proteins anschließend nicht mit Imidazol eluierbar war und 2) der eluierbare Teil zwar löslich, aber ohne nennenswerte Nukleaseaktivität war. Allem Anschein nach war der hier verwendete Puffer also nicht geeignet, eine aktive Spezies von EndoG herzustellen, obwohl er zumindest half, die Löslichkeit von EndoG zu erhöhen.

### 4.1.3.3 Der Einsatz von künstlichen Chaperonen zur Renaturierung und Reaktivierung von EndoG

Weitere Methoden zur *in vitro* Rückfaltung von denaturierten Proteinen, beinhalten den Gebrauch von Detergenzien und so genannten künstlichen Chaperonen, wie die Zucker Cycloamylose und  $\beta$ -Cyclodextrin<sup>98,99</sup>. In einem kommerziell erhältlichen Kit (s. **3.1.5**) zur Renaturierung von rekombinanten Proteinen aus *inclusion bodies*, wird eine solche Methode ebenfalls angewandt. Das dieser Methode zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Entfernung eines chaotropen Agens durch den Austausch eines Guanidiniumchlorid- oder Harnstoff-haltigen Puffers gegen einen detergenzhaltigen Puffer, der zwar eine erneute Aggregation durch die Anwesenheit bestimmter Detergenzien verhindert, in dem die Proteine

aber immer noch denaturiert vorliegen. Die eigentliche Rückfaltung erfolgt dann durch das Hinzufügen des künstlichen Chaperons, welches das Detergenz vom Protein entfernt.

Der in Abschnitt **3.1.5** beschriebene Versuch einer Renaturierung von His<sub>6</sub>-EndoG auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-*beads*, orientierte sich an diesem Prinzip, wobei in allen Ansätzen zum Großteil lösliches His<sub>6</sub>-EndoG erhalten wurde. Die geeignetsten Detergenzien schienen Triton X 100 und Tween 20 zu sein, da die entsprechenden Eluate die deutlichsten Banden auf einem mit colloidalem Coomassie gefärbten SDS-Gel aufwiesen. Sämtliche durch diese Methodik hergestellten Proteinpräparationen zeigten allerdings keine Nukleaseaktivität. His<sub>6</sub>-EndoG lag also, zwar in löslicher, aber wohl nicht korrekter Faltung vor und die Präparationen erschienen für weitere Untersuchungen ungeeignet.

# 4.1.3.4 Der Einsatz des iFOLD<sup>™</sup> Kits um eine Renaturierungsbedingung für EndoG zu finden

Das iFOLD<sup>TM</sup>-Kit bietet die Möglichkeit viele verschiedene Puffer für eine Renaturierung von Proteinen zu testen. Die Auswahl der Puffer des Kits beruht auf einer umfassenden Literatur-Recherche, von erfolgreichen Proteinrückfaltungsexperimenten und Informationen aus der REFOLD database<sup>95</sup>. Das Grundprinzip des Kits ist das der blitzartigen Verdünnung denaturierter Proteine in einen Renaturierungspuffer, wobei in einer 96-well Platte (s. Anhang) 92 unterschiedliche Renaturierungspuffer vorliegen. Im Falle der zu EndoG homologen Nuklease EGL-1 (EndoG-like-1), welche eine 27 %ige Sequenzidentität und, je nach verwendetem Algorithmus, eine 34-48 %ige Sequenzähnlichkeit zu EndoG aufweist, ist mit diesem Kit eine erfolgreiche Rückfaltung/Reaktivierung des Proteins aus inclusion bodies gelungen<sup>100</sup>. Ein Problem, welches für die Benutzung des Kits für His<sub>6</sub>-EndoG auftrat war, dass die inclusion bodies nicht, wie in der Anleitung des Kits vorausgesetzt, durch TCEP (Tris(2-chlorethyl)phosphat) und dem Detergenz N-Lauroylsarcosin gelöst werden konnten. Zwar trat dieses Problem auch bei EGL-1 auf, aber in 6.5 M Harnstoff gelöstes EGL-1 konnte gegen den vom iFOLD<sup>TM</sup> Kit vorgesehenen Puffer dialysiert werden, ohne das es zur Bildung von Präzipitaten kam, was auf His<sub>6</sub>-EndoG nicht zutraf. Für His<sub>6</sub>-EndoG war also eine einwandfreie Voraussetzung für eine erfolgreiche Rückfaltung nicht gegeben. His<sub>6</sub>-EndoG wurde dann in einem Puffer mit 5 M Guanidiniumchlorid zusätzlich zu den anderen Komponenten des "Lösungspuffers" 1/10 in den Puffern der iFOLD<sup>TM</sup>-Matrix verdünnt. Die Endkonzentration des Guanidiniumchlorids betrug also in allen Ansätzen mindestens 0.5 M. In einigen der Renaturierungspuffer lag Guanidiniumchlorid schon in dieser Konzentration

vor. Man konnte also annehmen, dass sich das Guanidiniumchlorid *per se* nicht unbedingt störend auf eine Rückfaltung auswirken musste. Tatsächlich wurde auch in 14 der 92 Fälle (s. **3.1.6**) His<sub>6</sub>-EndoG zumindest in eine lösliche Form gebracht. L-Arginin als Bestandteil eines Renaturierungspuffers führte auffallend oft (11 von 14 Fällen) zu löslichem His<sub>6</sub>-EndoG und auch β-Cyclodextrin war recht häufig (in 6 von 14 Fällen) vorhanden, was nach den bisherigen Erfahrungen mit der EndoG Renaturierung nicht verwundert (s. **4.1.3.3**). Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass der wirksamste Renaturierungspuffer für EGL-1, der Puffer "B10" der iFOLD<sup>TM</sup>-Matrix wurde, welcher sowohl L-Arg als auch β-Cyclodextrin enthält. Auch His<sub>6</sub>-EndoG blieb in diesem Puffer in Lösung. Anschließende Nukleaseaktivitätstests mit den positiven "Kandidaten" waren allerdings sämtlich negativ. Auch mit dem iFOLD<sup>TM</sup>-Kit ist es also nicht gelungen, aktive EndoG aus Bakterien zu gewinnen.

### 4.1.4 Aussichten für EndoG

Nach der Erkenntnis von Uren *et al.* handelt es sich bei EndoG um ein, über eine kleine N-terminale Transmebranhelix, an die innere Mitochondrienmembran gebundenes oder sogar in die Membran integriertes Protein<sup>33</sup>. Dementsprechend wäre davon auszugehen, dass EndoG neben einem großen, in den Intermembranraum gerichteten hydrophilen Anteil, einen exponierten hydrophoben Anteil aufweisen könnte, der mit ein Grund dafür sein könnte, dass rekombinante EndoG nach Überexpression nicht ohne weiteres solubilisierbar ist. Eine weitere Schwierigkeit, die bei der Faltung von EndoG eine Rolle spielen könnte, ist die Tatsache, dass EndoG drei Cysteine hat, die entweder gar keine oder aber falsche Disulfidbrücken ausbilden könnten.

In dieser Arbeit ist es durch mehrere Methoden gelungen, rekombinante EndoG aus *E. coli* in eine lösliche Form zu bringen. In keinem Fall aber wiesen diese Enzympräparationen auch nur annähernd eine zur aus eukaryotischen Zellen gewonnenen EndoG vergleichbare Aktivität auf.

Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Die Erste wäre, dass bei EndoG Präparationen aus eukaryotischen Zellen, noch ein oder mehrere, möglicherweise aktivierende Fakoren mitgereinigt werden. In diesem Zusammenhang wurde schon festgestellt, dass die Nukleaseaktivität von EndoG *in vitro* verstärkt wird, wenn sie vorher mit nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen inkubiert wird, wobei die Faktoren, um die es sich dabei handeln könnte, nicht eindeutig identifiziert wurden. Zwar fand man heraus, dass das Protein Hsp70 mit

EndoG mitgereinigt wurde, aber weitere Experimente, ließen nicht darauf schließen, dass Hsp70 einen aktivierenden Einfluß auf EndoG hat<sup>50</sup>. Auch in unserem Labor ist es nicht gelungen, die Aktivität von EndoG durch das Hinzufügen anderer Proteinen, wie z.B. AIF (*apoptosis inducing faktor*) zu stimulieren (Meiss, persönliche Mitteilung). Es wäre also möglich, dass mit diesen unbekannten Faktoren, die Aktivität von EndoG aus *E. coli* stimulierbar ist, etwa durch eine chaperone Wirkung der Faktoren auf EndoG.

Eine zweite Möglichkeit, warum auch lösliche, rekombinante EndoG aus *E. coli* kaum oder keine Nukleaseaktivität zeigt ist, dass sich das Enzym durch die Renaturierungsversuche lediglich so gefaltet hat, dass es in Lösung bleibt, seine dreidimensionale Struktur aber dennoch nicht der, der aktiven Spezies entspricht.

Im Falle des Versuches mit dem iFOLD<sup>TM</sup>–System war bis zuletzt noch ein gewisser Anteil an Guanidiniumchlorid in den Ansätzen, mit denen dann ein Nuklesaeaktivitätstest durchgeführt wurde und es ist nicht auszuschließen, dass dieses die Reaktion gestört hat. Weiterhin kann es sein, dass das Guanidiniumchlorid in den Fällen, in denen  $\beta$ -Cyclodextrin im Renaturierungspuffer verwendet wurde, die chaperone Wirkung der Kombination von Detergenz und  $\beta$ -Cyclodextrin gestört hat. Die eigentliche renaturierende Reaktion bei der das künstliche Chaperon das Detergenz "entfernt" ist unter den vorhandenen Bedingungen, nämlich mit 5 M Guanidiniumchlorid, möglicherweise nicht adäquat abgelaufen. Man müsste folglich nach einer Pufferbedingung für die Denaturierung suchen, bei der geringere Konzentrationen an Guanidiniumchlorid und höhere Konzentrationen an N-Lauroylsarcosin verwendet werden, die aber ausreichend sind um EndoG denaturiert und gelöst zu halten, und dann erneut eine Renaturierung/Reaktivierung mit dem iFOLD<sup>TM</sup>-Kit versuchen.

Eine weitere Möglichkeit, funktionelles EndoG aus *E. coli* zu gewinnen wäre, wie es schon durch Fusionen mit löslichkeitsfördernden Proteinen versucht wurde, die Entstehung von *inclusion bodies* schon bei der Expression zu verhindern. Dies könnte durch eine Coexpression mit Chaperonen, die dann als "Faltungshelfer" für EndoG fungieren geschehen. Für solche Zwecke gibt es ein kommerziell erwerbliches *Set* (*Chaperone Plasmid Set*, TaKaRa Bio *inc.*, Japan) welches eine Reihe von Plasmiden, für die Expression von Chaperonen in *E. coli* enthält. Sollte eine Coexpression dieser Chaperone mit EndoG nicht zu einer löslichen und aktiven Spezies von EndoG führen, könnte man immer noch die Methoden der Fusion mit löslichkeitsfördernden Proteinen und Chaperoncoexpression kombinieren. Eventuell ergänzen sich die Wirkungen der Chaperone und des löslichkeitsfördernden Fusionspartners von EndoG auf eine Art und Weise, dass die

70

Anfertigung einer hochkonzentrierten und bioaktiven Proteinpräparation von EndoG möglich ist.

Eine ganz andere Möglichkeit Proteinpräparationen von rekombinanter EndoG herzustellen, die evtl. Strukturanalysen möglich machen würden, wäre die Nutzung eines baculoviralen Expressionssystems. Tatsächlich existiert ein solches System schon, allerdings ist nicht bekannt, ob die dabei erhaltenen Präparationen brauchbar für Kristallisationen oder NMR-spektroskopische Untersuchungen sind<sup>36</sup>.

### 4.2 DNase IIα

Lysosomale DNase II $\alpha$  ist ein Enzym, welches die DNA-Fragmentierung und DNA-Beseitigung während der Entwicklung und Geweberegeneration in höheren Eukaryoten auf essentielle Art und Weise unterstützt. Sie gehört zu den so genannten *waste-management* Nukleasen und ist als solche zuständig für die Entfernung von DNA phagozytierter Zellen<sup>9</sup>. Trotz dieser wichtigen Funktion von DNase II $\alpha$  ist wenig über ihre dreidimensionale Struktur und in diesem Zusammenhang, ihre enzymatische Funktionsweise bekannt. Die Tatsache, dass DNase II $\alpha$  an mehreren Asparaginresten glykosiliert sein muss um aktiv zu sein, steht einer heterologen Expression in *E. coli*, die diese Glykosilierung nicht liefern können, im Weg. Eine Alternative zur Expression in *E. coli*, bietet eine Expression in Hefen, die die Fähigkeit zur Glykosilierung von Proteinen besitzen. In diesem Labor ist eine solche Expression von DNase II $\alpha$  bereits versucht worden, wobei der Hefestamm *Kluyveromyces lactis*-GG799 verwendet wurde, was aber bislang erfolglos blieb<sup>100</sup>. So sind Untersuchungen der Struktur-Funktionsbeziehungen der DNase II $\alpha$  bisher kaum möglich gewesen.

Erst kürzlich wurden computergenerierte Homologiemodelle der dreidimensionalen Struktur der DNase II $\alpha$  veröffentlicht. Da festgestellt wurde, dass DNase II $\alpha$  zur Phospholipase-D (PLD)-Superfamilie gehört, konnten strukturell charakterisierte, zur PLD-Superfamilie gehörende Proteine, als Basis für die Erstellung der Modelle dienen<sup>70</sup>. Die Modelle repräsentieren zwei mögliche, etwa gleich wahrscheinliche Strukturen der aktiven Spezies der DNase II $\alpha$ , nämlich die eines Homodimers, bei der beide Monomere einen Teil des aktiven Zentrums liefern oder die eines so genannten Pseudodimers, wobei es sich um ein Monomer mit pseudodimerer Symmetrie handelt, bei dem das aktive Zentrum von Aminosäureresten einer zusammenhängenden Polypeptidkette gebildet wird.

In dieser Arbeit wurden biochemische Analysen an humanen DNase II $\alpha$  Varianten, die in Säugerzellen exprimiert wurden, durchgeführt, mit dem Ziel, den katalytischen Mechanismus so wie die Frage der Struktur der aktiven Spezies zu klären.

### 4.2.1 C-terminale Fusionsproteine humaner DNase IIα werden in Lysosomen transportiert und sind katalytisch aktiv

Da in dieser Arbeit humane DNase IIa in Form verschiedener Fusionsproteine untersucht wurde (C-terminale EGFP-, His6-, FLAG-His6- und HA-Fusionen) sollte gezeigt werden, dass derartige Fusionen keine Störung der Prozessierung und der katalytischen Fähigkeiten der Nuklease verursachen. Durch Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Laser-Rastermikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich transient exprimierte EGFP-fusionierte DNase IIa sowohl im Endoplasmatischen Retikulum als auch den Lysosomen transfizierter eukarvotischer Zellen befand (s. 3.2.5). Dies bedeutet, dass die Prozessierung trotz der C-terminalen Fusion offenbar nicht gestört wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit His<sub>6</sub>, FLAG-His<sub>6</sub>, oder HA-Fusionen versehene DNase IIa Nukleaseaktivität besaß, die sich durch Wolframat als Inhibitor aufheben ließ (s. 3.2.3 und 3.2.4). Das DNase II $\alpha$  auch tatsächlich in den Proteinpräparationen vorhanden war, wurde durch Western blots gegen die entsprechende C-terminale Fusion nachgewiesen (s. 3.2.7).

### 4.2.2 Sequenz- und modellorientierte Analyse von DNase IIa

Mitglieder der PLD-Superfamilie sind Phosphodiesterasen und Phospholipasen, die ein PLD-Motif **HxK-x<sub>n</sub>-N-x<sub>n</sub>-(E/Q/D)** besitzen<sup>101</sup>. Das aktive Zentrum solcher Enzyme setzt sich aus zwei PLD-Motiven zusammen, was entweder durch Dimerisierung der Enzyme oder im Falle der Existenz zweier PLD-Motive in einem Monomer durch eine entsprechende pseudodimere Faltung erreicht wird. Für beide Fälle gibt es Beispiele: Die unspezifische Nuklease Nuc aus *Salmonella typhimurium*, die als Dimer funktioniert und die monomere, als Pseudodimer arbeitende Phospholipase-D aus *Streptomyces* sp.<sup>72,102</sup>.

Im Falle der DNaseII $\alpha$  wurde zusätzlich zum eindeutig identifizierbaren C-terminalen PLD-Motiv (H295, K297, D311, N313), wobei D311 eine alternative Position des "Q/D/E" innehat, ein N-terminales PLD-Motiv (H113, K115, H130 und Q155) gefunden, dessen Signifikanz jedoch mit den Mitteln der Bioinformatik alleine nicht nachgewiesen werden konnte<sup>70</sup>. Das His130 ersetzt dabei das Asn des Konsensus-Motivs (s.u.). Die Anwesenheit zweier PLD-Motive legt daher die Möglichkeit einer pseudodimeren Struktur der aktiven DNase II $\alpha$  Spezies nahe, da beide "Hälften" des aktiven Zentrums in einem Monomer

pseudodimerer Symmetrie vorhanden wären. Die vorhergesagten katalytisch relevanten Aminosäurereste wurden zur Verifizierung dieser Hypothese nach Alanin mutiert und die katalytische Aktivität der Enzymvarianten gemessen.

Als eine Positivkontrolle, im Sinne eines erwarteten Aktivitätsverlusts diente die Mutante H295A, da aus früheren Arbeiten bereits bekannt war, dass der entsprechende Aminosäurerest His297 der DNase II $\alpha$  aus dem Schwein essentiell für die Aktivität humaner DNase II $\alpha$  ist<sup>69,103</sup>.

Das Ser131 befindet sich nach dem Modell von Cymerman *et al.* 2005 im aktiven Zentrum und ist bei zwei Mitgliedern der Phospholipase-D Familie an der "Q/D/E" Position und wurde daher auch als möglicherweise katalytisch relevant angesehen und gegen Alanin ausgetauscht.

Ein späteres, verändertes Modell zeigt die Möglichkeit auf, dass das Lys230, im aktiven Zentrum liegt, und möglicherweise an der Bindung des Phosphatrestes der zu spaltenden Phosphodiesterbindung des Substrates beteiligt sein könnte, daher wurde auch eine K230A-Variante der humanen DNase II $\alpha$  hergestellt. Mit allen DNase II $\alpha$ -Varianten wurden Nukleaseaktivitätsassays durchgeführt, um sie auf ihre Aktivität im Vergleich zum Wildtyp des Enzyms zu untersuchen.

In Abbildung **4.1** sind die Modelle der aktiven Spezies der DNase II $\alpha$  als Dimer (A) und Monomer bzw. Pseudodimer (B) dargestellt<sup>71</sup>.

### 4.2.2.1 Die Aminosäurereste H295, H113 und H130 sind essentiell für die Aktivität der humanen DNase Πα

Der Austausch des Histidinrests His295 der humanen DNase II $\alpha$  gegen Alanin hat, wie erwartet und in Übereinstimmung mit der Studie von MacLea *et al.*, zu einer Inaktivierung des Enzyms geführt<sup>69</sup>. Nach dem Modell, bei dem DNase II $\alpha$  als Pseudodimer arbeitet, wäre der Histidinrest His113 der entsprechende Aminosäurerest der zweiten Hälfte des aktiven Zentrums (S. Abb. **4-1**). Tatsächlich war die DNase II $\alpha$ -Variante H113A in allen Versuchen nukleolytisch inaktiv, ein Ergebnis das folglich stark für eine pseudodimere Struktur spricht.



Abb. 4-1: Alternative Modelle der humanen DNase II $\alpha$ : (A) Eine mögliche dimere Struktur der DNase II $\alpha$ , bei der das aktive Zentrum aus zwei C-terminalen Domänen (CTD-A und CTB-B) gebildet wird. Es sind die vermeintlich katalytisch relevanten Aminosäurereste gekennzeichnet, die im PLD-Motif den H, K und N des Konsensusmotivs HxK-x<sub>n</sub>-N-x<sub>n</sub>-(E/Q/D) entsprechen (H295, K297 und N313). Die-N-terminalen Domänen sind in (A) nicht gezeigt. (B) Die vermutete pseudodimere Struktur mit der C-terminalen Domäne (CTD) und N-terminalen Domäne (NTD), die je die Hälfte des aktiven Zentrums liefern. Die hier zu den PLD-Motiven gehörenden, vermutlich an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste (H113, K115 und H130 der N-terminalen Domäne und H295, K297 und N313 der C-terminalen Domäne) sind gekennzeichnet.

Ein weiterer Histidinrest, nämlich das His130, kam ebenfalls als ein möglicherweise für die Katalyse wichtiger Aminosäurerest in Frage. Das His130 im N-terminalen Bereich ist konserviert und kann prinzipiell, den Asparaginrest des PLD-Motivs HxK- $x_n$ -N- $x_n$ -(E/Q/D) ersetzen. Die Aufgabe wäre die, die zu spaltende Phosphodiesterbindung eines DNA Substrats zu binden. Homologe Histidinreste findet man in der humanen DNase II $\beta$  und Nuc-1 von *C. elegans*. Die in dieser Arbeit hergestellte DNase II $\alpha$ -Mutante H130A, war in allen Nukleaseaktivitätstests inaktiv. Dies bestätigt einerseits die Vermutung, das His130 des N-terminalen PLD-Motivs tatsächlich die Funktion des konservierten Asparaginrestes des Konsensus-Motivs übernimmt und unterstützt zudem die These, dass die aktive Spezies der humanen DNase II $\alpha$  ein Pseudodimer ist.

In einer Studie von Cheng *et al.* 2006, wurde der zum Histidinrest 130 der humanen DNase II $\alpha$ , homologe Aminosäurerest His132 der DNase II $\alpha$  aus dem Schwein, als wichtig für die korrekte Faltung des Enzyms vorgeschlagen<sup>68</sup>. Hierbei sollte angemerkt werden, dass die Möglichkeit einer pseudodimeren Struktur der DNase II $\alpha$  wahrscheinlich gar nicht in Betracht gezogen wurde und folglich eine Beteiligung des Histidins 132 am aktiven Zentrum

nicht diskutiert wurde. In der oben zitierten Studie wurden insgesamt drei von neun untersuchten Histidinresten als unentbehrlich für die Nukleaseaktivität der Schweine-DNase II $\alpha$  identifiziert. Neben dem bereits erwähnten His132 waren dies außerdem die Aminosäurereste His115 und His297, welche homolog zu den in dieser Arbeit untersuchten Resten His113 und His295 der humanen DNase II $\alpha$  sind. Die in dieser Arbeit auf der Basis von Strukturmodellierungen gewonnene Erkenntnis, dass die Histidinreste His113 und His130 der humanen DNase II $\alpha$  katalytisch relevant sind, findet in der Arbeit von Cheng *et al.* eine eindeutige Bestätigung.

# 4.2.2.2 Die Aminosäuren K115, K297, D311, N313, S131, K230 und Q155 können gegen Alanin ausgetauscht werden, ohne eine komplette Inaktivierung der DNase IIα zu bewirken

Sowohl bei einer dimeren als auch bei einer pseudodimeren Variante der aktiven DNase IIa Spezies aus Homo sapiens würde der Lysinrest 115 in den vorgeschlagenen Computermodellen, eine Rolle im aktiven Zentrum des Enzyms spielen, nämlich als ein an der Bindung der zu spaltenden Posphodiesterbindung einer DNA beteiligter Aminosäurerest. Im Falle eines Pseudodimers würde das Lys115 diese Aufgabe nur auf einer Seite des aktiven Zentrums übernehmen und das Lys297 entsprechend auf der anderen Seite. Ebenfalls als an der Bindung eines Phosphats in Frage kommende Aminosäurereste sind das His130 (s.o.) und der im C-terminalen PLD-Motiv liegende Asparaginrest Asn313. Interessanterweise war die Aktivität bei einigen DNase IIa Mutanten abhängig von der Art der C-terminalen Fusion bzw. der Proteinpräparation. So blieben lediglich sowohl die Variante DII-His<sub>6</sub> H130A als auch die mit der Tandemfusion versehenen Variante DII-FH H130A in allen Fällen inaktiv, während für die DII-His<sub>6</sub> Varianten der Mutanten K115A, K297A und N313A in den durchgeführten Plasmidspaltassays noch eine residuelle Aktivität festgestellt wurde, da sie noch die Fähigkeit hatten supercoiled-DNA zu spalten. Worauf diese Aktivität zurückzuführen ist bleibt fraglich. In der Annahme, dass insgesamt vier Aminosäurereste (K115, H130, K297 und N313 im Pseudodimermodell) an der Bindung der zu spaltenden Phosphodiesterbindung beteiligt sind, könnte generell eine Erklärung für eine residuelle Aktivität sein, wobei die nicht ausgetauschten Aminosäurereste die Aufgabe eines ausgetauschten Aminosäurerests zumindest zum Teil übernehmen könnten.

Zwei weitere zum PLD-Motif gehörende Aminosäurereste, die in dieser Arbeit durch Mutagenese untersucht wurden, waren das zur N-terminalen Domäne gehörende Gln155 und das zur C-terminalen Domäne gehörende Asp311. DNase II $\alpha$  Mutanten, bei denen der entsprechende Rest gegen Alanin ausgetauscht wurde, waren in Plasmidspaltassays nicht komplett inaktiv, sondern behielten, wenn auch abgeschwächt im Vergleich zum wt oder zur Positivkontrolle H122A, Nukleaseaktivität. Anscheinend sind bei der humanen DNase II $\alpha$  die Reste Q155 und D311 nicht essentiell für die enzymatische Aktivität. Es ist im Übrigen nicht bekannt, welche Aufgabe die sauren Aminosäurereste oder das Amid im "E/Q/D" Anteil des PLD-Motivs übernehmen. Es gibt lediglich eine Spekulation darüber, dass der zum "E/Q/D" gehörende Glutamatrest Glu122 in Nuc den pK<sub>a</sub>-Wert der Histidinreste des aktiven Zentrums senkt und dabei hilft, verschiedene Protonierungszustände zu stabilisieren<sup>72</sup>.

Zwei weitere Aminosäurereste, die in dieser Arbeit untersucht wurden, waren das Ser131 und das Lys230. Wie in Abbschnitt **4-8** erwähnt liegt der Aminosäurerest Ser131 im alten Modell von Cymerman *et al.* 2005 im aktiven Zentrum und hätte nach diesem Modell einen Einfluß auf die Nukleaseaktivität haben können. Nach dem neuen Modell liegt das Ser131 abseits des aktiven Zentrums. Die hergestellte Mutante DII-FH S131A hat im Plasmidspaltassay eine relativ hohe Nukleaseaktivität behalten, die sie dazu befähigte Plasmid-DNA weitgehend zu degradieren, was also für die Richtigkeit des neuen Modells spricht.

Eine noch höhere Aktivität wies die Mutante DII-FH K230A auf, die im Plasmidspaltassay in der gegebenen Zeit von der als Substrat dienenden DNA nur noch "Schmier" übrig ließ. Nach dem neuen Strukturmodell liegt der Aminosäurerest Lys230 im oder in der Nähe des aktiven Zentrums und wäre theoretisch ein Kandidat für die Bindung der zu spaltenden Phosphodiesterbindung. Das vorliegende Ergebnis spricht allerdings gegen eine katalytische Relevanz des Lys230.

# 4.2.3 Gelfitrationsexperimente und Coimmunopräzipitationsassays mit rekombinanter humaner DNase IIα unterstützen die Annahme, dass DNase IIα als eine einzelne Polypeptidkette aktiv ist

Die Tatsache, dass reife DNase IIa glykosiliert vorliegt hat in der durchgeführten Gelfiltration (s. **3.2.9**) wohl dazu geführt, dass sie auf der Säule zum Teil zurückgehalten wurde und in einem Bereich eluierte, der den Größen 22-44 kD entsprach. Ein Plasmidspaltassay zeigte, dass die höchste Nukleaseaktivität die Fraktion lieferte, die der

Größe von Chymotrypsinogen  $\alpha$  (22 kD) entsprach. Erst durch SDS-PAGE und einem anschließenden Western *blot* konnte gezeigt werden, dass die molekulare Spezies, die bei dieser scheinbaren molekularen Masse eluierte, ebenfalls eine zusammenhängende, etwa 45 kD große Polypeptidkette war. Dieser Befund wiederum untermauert die These, dass die aktive Spezies der humanen DNase II $\alpha$  tatsächlich ein Pseudodimer ist.

Eine weitere Bestätigung dieser Theorie lieferte ein Versuch, bei dem mit verschiedenen C-terminalen Fusionen gearbeitet wurde (s. **3.2.10**). Die Ergebnisse zeigten, dass es unter den Versuchsbedingungen zu keiner Dimerisierung der unterschiedlich fusionierten, in eukaryotischen Zellen coexprimierten und anschließend coimmunopräzipitierten DNase IIα-Varianten kam. So war eine Nukleaseaktivität nur dann feststellbar, wenn eine aktive DNase IIα-Variante direkt durch einen gegen ihre Fusion (FLAG- oder HA-*tag*) gerichteten Antikörper immunopräzipitiert wurde. Auch durch Western *blots* konnte keine DNase IIα-Dimerisierung "artifizieller" DNase IIα-HA und DNase IIα-FLAG Heterodimere festgestellt werden; ein mit FLAG fusioniertes Protein war nur dann mit Anti-FLAG Antikörpern detektierbar, wenn es auch über Anti-FLAG-*beads* gereinigt worden war und umgekehrt: Ein mit HA-*tag* fusioniertes Protein war nur dann im Immunoblot detektierbar, wenn es zuvor über Anti-HA-*beads* gereinigt worden war.

### 4.2.4 Das aktive Zentrum und der Spaltmechanismus der humanen lysosomalen DNase IIα

Zusammengenommen liefern die Daten aus der sequenzorientierten Analyse der DNase IIa durch Mutagenese, der Gelfiltration und der Coimmunopräzipitationsversuche eine Bestätigung dafür, dass die aktive Spezies der DNase IIa ein Pseudodimer ist, welches in einer Polypeptidkette ein N- und ein C-terminales PLD-Motiv aufweist, die zusammen das aktive Zentrum bilden.

Bei allen Mitgliedern der PLD-Superfamilie bilden Histidin- und Lysinreste den Haupteil des PLD-Motivs und diese sind in humaner DNase II $\alpha$  vollständig konserviert (His113 und Lys115 bzw. His295 und K297). Während man von den Lysinresten annimmt, dass sie die zu spaltende Phosphodiesterbindung binden, werden die Histidinreste wahrscheinlich für die Bildung des Phosphoenzym-Intermediates und die anschließende Aktivierung eines Wassermoleküls, welches den kovalent gebundenen Phosphorylrest attackiert, benötigt<sup>72,104,105</sup>.

77

Prinzipiell könnte jeder der Histidinreste als das primäre Nukleophil dienen, welches die zu spaltende Phosphodiesterbindung angreift und das intermediäre Phosphohistidin bildet, oder als generelle Base fungieren und durch Aktivierung eines Wassermoleküls ein Hydroxylion bilden, welches dann das Phosphoenzym-Intermediat attackiert. Anhand der vorliegenden Daten ist es nicht möglich festzulegen, welcher der Histidinreste His113 und His295 bei der Katalyse welche Rolle spielt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Aminosäurereste wechselweise beide Aufgaben übernehmen können.

In Abb. **4-2** sind das aktive Zentrum der humanen lysosomalen DNase II $\alpha$  aus dem Strukturmodell (Schäfer *et al.* 2007) und der aus dem Modell und der durchgeführten biochemischen Arbeiten hergeleitete Mechanismus der Substratspaltung dargestellt<sup>71</sup>.



Abb. 4-2: Aktives Zentrum und putativer katalytischer Mechanismus der Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung durch pseudodimere humane DNase II $\alpha$ : (A) Aktives Zentrum der pseudodimeren DNase II $\alpha$  mit einem gebundenem Phosphat aus der Phospholipase-D·Phosphat Kokristallstruktur (1f0i). (B) Vorgeschlagener katalytischer Mechanismus der Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung durch humane DNase II $\alpha$ . Einer der katalytischen Histidinreste (His295 im oberen Teil der Darstellung) greift das Phosphat an und produziert damit ein Phosphohistidin-Intermediat mit einem kovalent gebundenen Phosphorylrest. Der zweite katalytische Histidinrest (His113 im oberen Teil der Darstellung) agiert als generelle Säure und protoniert die 5'-Abgangsgruppe. Im nächsten Schritt der Katalyse, wirkt der zweite katalytische Histidinrest (His113 im oberen Teil Base und aktiviert ein Wassermolekül durch Abzug eines Protons, so dass ein Hydroxylion entsteht. Das Hydroxylion führt dann einen nukleophilen Angriff auf das kovalent gebundene Phosphat aus und bewirkt eine Freisetzung des 3'-Phosphatprodukts. Die Lysinreste (Lys297 und Lys115) wie auch die Aminosäurereste Asn313 und His130 (nicht gezeigt) binden die zu spaltende Phosphatgruppe.

### 4.2.5 Aussichten für DNase IIa

Durch die Kombination von Sequenzalignments, Template-basierter Modellerstellung und biochemischer Analyse ist es gelungen die aktive Spezies der lysosomalen humanen DNase II $\alpha$ , vor allem in Bezug auf das katalytische Zentrum zu charakterisieren und in dem Zusammenhang festzustellen, dass DNase II $\alpha$  als Pseudodimer katalytisch aktiv ist. Dennoch wäre es wünschenswert DNase II $\alpha$  noch weitgehender strukturell analysieren zu können. Dafür würde ein Expressionssystem benötigt, welches zum einen die benötigte Glykosilierung der Asparaginreste gewährleistet und zum anderen eine hohe Ausbeute an Protein liefert, die ausreicht um Kristallstrukturanalysen durchführen zu können. Zwar sind erste Versuche, rekombinante DNase II $\alpha$  aus Hefen zu gewinnen gescheitert, dennoch bieten sich diese immer noch als eine gute Option an. Es steht noch eine Reihe von Hefe-Expressionsstämmen zur Verfügung, mit denen eine Expression rekombinanter DNase II $\alpha$  gelingen könnte. Anstelle des bisher benutzten Hefestamms *K. lactis* böte sich hier *S. cerevisiae* an, da dieser Organismus sehr gut untersucht ist, und es für Überexpressionen von rekombinanten Proteinen in diesem, schon viele Protokolle gibt.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Etablierung eines baculoviralen Expressionsystems für humane DNase II $\alpha$ . Die dabei verwendeten Insektenzellen, weisen alle wichtigen Zellkomponenten auf, so dass essentielle posttranslationale Modifikationen durchgeführt werden. Oft werden von rekombinanten Proteinen in diesem System höhere Ausbeuten erzielt, als es bei Expressionen in z.B. Säugerzellen der Fall ist. In vielen Fällen ist es daher schon gelungen, rekombinante Proteine oder Teile davon aus bakuloviralen Expressionssystemen zu kristallisieren wie z.B. die Proteasedomäne des menschlichen Plasma-Kallikreins<sup>106</sup>.

### 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Teilprojekte behandelt, die beide zur Aufklärung der strukturellen Natur der aktiven Spezies der apoptotischen Endonukleasen Endonuklease G (EndoG) und Desoxyribonuklease IIα (DNase IIα), beitragen sollten.

Aus Säugerzellen gewonnene bovine EndoG wurde zuvor bereits weitgehend biochemisch charakterisiert und für das Protein ein Homolgiemodell erstellt<sup>34</sup>. Zu dessen Verifikation wäre es notwendig, Kristallstruktur- oder NMR-spektroskopische Analysen durchzuführen. Um dafür geeignete Proteinpräparationen herzustellen, sollte EndoG in *E. coli* überexprimiert und gereinigt werden. Da EndoG dabei in *inclusion bodies* abgelagert wird, wurden in diesem Teil der Arbeit mehrere biochemische Strategien angewandt um aktive EndoG in löslicher Form oder durch Renaturierung aus *inclusion bodies* zu gewinnen. Expression von EndoG als Fusion mit dem löslichkeitsfördernden Protein NusA führte zu dem Ergebnis, dass sowohl das Fusionsprotein, als auch EndoG nach Abspaltung von NusA durch Thrombin zwar löslich, aber inaktiv waren. In anderen Ansätzen gelang es immerhin durch den Einsatz von Detergenzien in Verbindung mit dem künstlichen Chaperon  $\beta$ -Cyclodextrin lösliche EndoG aus *inclusion bodies* zu erhalten, aber keine Präparation des Enzyms verfügte über zufrieden stellende Nukleaseaktivität. Auch ein Matrix-basierter Rentaurierungsversuch unter Verwendung des iFOLD<sup>TM</sup>-Systems mit 92 verschiedenen, empirisch ermittelten Renaturierungspuffern brachte hier nicht den gewünschten Erfolg.

Zur Charakterisierung des aktiven Zentrums von lysosomaler DNase II $\alpha$  sowie der Beantwortung der Frage, ob die aktive Spezies dieses Enzyms eine dimere oder monomere (pseudodimere) Struktur aufweist, wurde im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit nach erfolgreicher Etablierung eines Expressionssytems in Säugerzellen eine *alanine scanning* Mutagenese des Enzyms durchgeführt. Es wurden solche Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht, die in den vorgeschlagenen Modellen, zu den postulierten N- und C-terminalen PLD-Motiven HxK-x<sub>n</sub>-N-x<sub>n</sub>-(E/Q/D) gehören<sup>70,71</sup>. Die Ergebnisse des *alanine scannings* weisen stark darauf hin, daß das katalytische Zentrum der humanen DNase II $\alpha$  von zwei PLD-Motiven gebildet wird, und die aktive Spezies folglich ein Monomer bzw. Pseudodimer ist. Gelfiltrationsanalysen sowie Coimmunopräzipitationsassays mit unterschiedlich Epitopfusionierten DNase II $\alpha$ -Varianten lieferten darüber hinaus zusätzliche Hinweise auf eine pseudodimere Struktur der aktiven DNase II $\alpha$ .

# 6 Anhang

# 6.1 Abkürzungsverzeichnis

μ Ω	mikro- (10 <sup>-6</sup> ) Ohm
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Alanin oder Ampere oder Adenin
AAP	Agaroseauttragsputter
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ad	auffüllen auf
AIF	apoptosis inducing factor
AMP	Ampicillin
Apat-1	apoptosis activating factor-1
AS	Aminosäure(n)
BAX	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BFR	Bakterioferritin
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	bcl-2 interacting mediator of cell death
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
С	Cytosin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CAD	caspase activated DNase
ссс	covalently closed circle
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
CPS-6	ced-3 protease suppressor (family member) protein
CTD	C-terminale Domäne
d	desoxy-
D	Aspartat
Da	Dalton
DFF	DNA fragmentation factor
DISC	death inducing signalling complex
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP_Mix	
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP

DTE DTT	Dithioerythrol Dithiothreitol
E E coli	Glutamat Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGL-1	endoG-like-1
EndoG	Endonuklease G
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FasL	Fas ligand
g	Gramm
G	Guanin
GAAD	GzmA-activated DNase
GrpE	glucose-regulated protein E
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Tranferase
GuHCl	Guanidiniumchlorid
GzmA	Granzym A
GzmB	Granzym B
h	Stunde
Н	Histidin
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsp	heat shock protein
ICAD	inhibitor of CAD
IGAAD	inhibitor of GAAD
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilo(x10 <sup>3</sup> )basenpaare
K	Lysin
K. lactis	Kluyveromyces lactis
1	Liter
LB	Luria-Bertani-
lın	linear DNA
m	milli- $(10^{-3})$
M	molar
MBP	maltose binding protein
$Me^{2+}$	2-(IN-INIOPPROTINO)-ethansuitonsaure-Monohydrat
wie	zweiwertiges Metallion
111111	winnute

n	nano- (10 <sup>-9</sup> )
Ν	Asparagin
NI	nach Induktion
NMR	nuclear magnetic resonance
NTD	N-terminale Domäne
NusA	N utilization substance A
oc	open circle DNA
OD	optische Dichte
	-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLD	Pospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	5 5 5
Q	Glutamin
-	
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA interference
rpm	revolutions per minute
1	1
S	Serin
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
sc	supercoiled DNA
sec	Sekunde
SDS	Natrium(sodium)dodecylsulfat
SS	single stranded
STE	saline-Tris-EDTA
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
SUMO	small ubiquitin-related modifier
	-
Taq	Thermus aquaticus
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
Tet	Tetracyclin
tBid	truncated Bid
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	tween-tris-buffered saline
TSS	transformation storage solution
Т	Tyrosin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
	5 5
ü.N.	über Nacht
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt

VI	vor Induktion
Vol.	Volumenanteile
wt	Wildtyp
W	Watt
YFP	yellow fluorescent protein
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon (O-Methylester)

# 6.2 Verwendete PCR-Primer

Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung angegeben

• Primer zur Amplifikation des bovinen EndoG Gens und Generierung der Konstrukte pBBI-EndoG und pET44-EndoG

### Hinprimer: 5'-eGbos1

catgccatggaattccatatggcggggcttcccgcggt

#### Rückprimer:3'-eGbos1

gcgggatccgtcgacttacttgctgccagcagtgat

 Primer zur Amplifikation des humanen DNase IIα Gens des Klons 5502061 (Invitrogen) und Generierung des Konstruktes pCI-DII-His

#### **Hinprimer: fNDII**

gctgctagcaccgccatgatcccgctgctgctgca

#### **Rückprimer: rX-StDII**

gcgcggccgcttactcgaggatcttataagctctgct

• Primer zur Generierung von pCI-DII-FH Konstrukten

#### Hinprimer: fNDII (s.o.)

### **Rückprimer: DIIrevFH**

ctcctcgagcttatcgtcgtcatccttgtaatc

• Primer zur Generierung von pCI-DII-HA Konstrukten

Hinprimer: fNDII (s.o.)

### Rückprimer: 3'DII-HA

gcgcggccgcttaagcgtaatctggaacatcgtatgggtaagcgctgatcttataagctctgctggg

• Primer zur Generierung des pEGFP-N1-DII Konstruktes Hinprimer: fNDII (s.o.)

Rückprimer: rX-StDII (s.o.)

 Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante H113A (Name des Primers:H113A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für KasI.

tcttccatgcgtggcgccacgaagggtgtc

 Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante K115A. (Name des Primers: K115A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für Scal.

cgtgggcacacggcaggagtactgctccttgac

 Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante H122A. (Name des Primers: fDIIH122A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für Hpy99I.

ctgctccttgacgc<u>cgacggggg</u>cttctgg

- Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante S131A. (Name des Primers: S131A KpnI) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für KpnI. tggctggtccacgcggtacctaacttc
- Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante Q155A. (Name des Primers: Q155A AclI) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für AclI. tgtacctacggggcaacgttactctgtgtgtct

 Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante K230A. (Name des Primers: K230A SelI) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für Bsh1236I (Isoschizomer von SelI).

cagagetttgc<u>cgcg</u>ttcagcaaatttgg

- Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante H295A. (Name des Primers: H295A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für MslI.
   agcacagaggacgcatccaaatggtgc
- Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante K297A. (Name des Primers: K297A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für Eco47III.
   acagaggaccacagcgcttggtgcgtgtcc
- Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante D311A. (Name des Primers: D311A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für BseMI.
   acctgcgtgggtgcaatgaatcggaac
- Primer zur Generierung der DNase IIα Mutante N313A. (Name des Primers: N313A) Unterstrichen ist die eingeführte Erkennungssequenz für PauI.

 $gtgggtgacatg\underline{gcgcgc}aaccagggagag$ 

 Antisense Primer f
ür die Mutagenese von DNase Πα zur Herstellung der Mutanten H113A, K115A, H122A, H130A, S131A und Q155A

### DIIrev1

gttatagacccaggggta

 Antisense Primer f
ür die Mutagenese von DNase IIα zur Herstellung der Mutanten K230A, H295A, K297A, D311A und N313A

### DIIrev(-)

gatettataagetetget

• Primer zur Sequenzierung von Inserts in pCI-DII-His Konstrukten

DIIrev1 (s.o.) und DIIrev(-) (s.o.)

• Primer zur Sequenzierung von Inserts in pCI-DII-FH Konstrukten

DIIrev1 (s.o.)

und rev\_PolyA

gcaatagcatcacaaatttcac

• Primer zur Generierung des Konstruktes pCI-YFP-FH

### Hinprimer: 5'EGFPdual

ccggctagcaagaaggagatataccatgggtaccgttaacgtgagcaagggcgaggag

### Rückprimer: rFHis6

gcgcggccgcttagtgatggtgatggtgatggcgctcttatcgtcgtcatccttgtaatc

• Primer zur Generierung des Konstruktes pCI-YFP-HA

### Hinprimer: fkOZ

gctgctagcaaaggagatataccatgggtaccggtgaattctctagagtcgacgtgagcaagggcgaggag

### Rückprimer: 3'YFPHA\_1

gcgcggccgcttaagcgtaatctggaacatcgtatgggtaagcgctctcgaggtcgaccttgtacagctcgtccat

# 6.3 Verzeichnis von Lösungen und Puffern

### Puffer für Gelelektrophoresen

• **TBE-Puffer:** 

100 mM Tris 100 mM Borsäure 2.5 mM EDTA pH 8.3

### • TPE-Puffer:

80 mM Tris-Phosphat 2 mM EDTA pH 8.0 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

### • Coomassie-Färbelösung:

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

### • 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

### • Laemmli-Laufpuffer:

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

### 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* 11 H<sub>2</sub>O

### • TSS-Lösung:

LB-Medium mit: 40 % (w/v) PEG 6000 5 % (v/v) DMSO 50 mM MgCl<sub>2</sub> pH 6.0-6.5

### • STE-Puffer:

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

### Puffer für Arbeiten mit EndoG

### • EndoG-Aufschlußpuffer:

20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4 100 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 0.1 % (v/v) Triton X 100 5 mM DTT

### • EndoG-Spaltpuffer:

20 mM MES-NaOH, pH 6.0 1 mM EDTA 1 mM DTT 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> 6 % (v/v) Glycerin 0.01 % (v/v) Triton X 100 0.01 % (w/v) BSA

### Puffer für Arbeiten mit DNase IIa

•

PBS: 10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, pH 7.4 1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 137 mM NaCl 2.7 mM KCl

### • DNase IIa-Lysispuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7.5 200 mM NaCl 1 mM EDTA 2 % (v/v) Triton X 100 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pro 10 ml Puffer

- TBS:
   50 mM Tris-HCl, pH 7.5
   150 mM NaCl
- Saure Glycinlösung: 100 mM Glycin-HCl, pH 3.5
- DNase IIα-Reaktionspuffer: 200 mM NaAc-HCl, pH 4.5 5 mM EDTA
- Lysispuffer A:
  10 mM HEPES-NaOH, pH 7.5
  500 mM NaCl
  1 mM EDTA
  1 mM 2-Mercaptoethanol
  20 mM Imidazol
  1 % (v/v) Triton X 100
  1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pro 10 ml Puffer

### • DNase IIα-His-Waschpuffer:

10 mM HEPES-NaOH, pH 7.5
500 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM 2-Mercaptoethanol
20 mM Imidazol
1 mM PMSF

### • DNase IIα-His-Gelfiltrationspuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7.5 500 mM NaCl 1 mM EDTA 0.01 % (v/v) Triton X 100 0.5 mM PMSF

# 6.4 Aminosäuresequenzen von boviner EndoG und humaner DNase IIα

### **Bovine EndoG (299 AS)**

001	mqllragltl	algaglgaaa	eswwrqrada	ratpgllsrl	pvlpvaaaag	lpavpgapag
061	ggpgelakyg	lpgvaqlksr	asyvlcydpr	trgalwvveq	lrpeglrgdg	nrsscdfhed
121	dsvhayhrat	nadyrgsgfd	rghlaaaanh	rwsqkamddt	fylsnvapqv	phlnqnawnn
181	lekysrsltr	tyqnvyvctg	plflprtead	gksyvkyqvi	gknhvavpth	ffkvlileaa
241	ggqielrsyv	mpnapvdeai	plehflvpie	sierasgllf	vpnilarags	lkaitagsk

### Humane DNase IIa (360 AS)

001	miplllaall	cvpagaltcy	gdsgqpvdwf	vvyklpalrg	sgeaaqrglq	ykyldessgg
061	wrdgralins	pegavgrslq	plyrsntsql	afllyndqpp	qpskaqdssm	rghtkgvlll
121	dhdggfwlvh	svpnfpppas	saayswphsa	ctygqtllcv	sfpfaqfskm	gkqltytypw
181	vynyqlegif	aqefpdlenv	vkghhvsqep	wnssitltsq	agavfqsfak	fskfgddlys
241	gwlaaalgtn	lqvqfwhktv	gilpsncsdi	wqvlnvnqia	fpgpagpsfn	stedhskwcv
301	spkgpwtcvg	dmnrnqgeeq	rgggtlcaql	palwkafqpl	vknyqpcngm	arkpsrayki

## 6.5 Modelle boviner EndoG und humaner DNase II $\alpha$



Abb. 5-1: Modell von boviner EndoG: Abgebildet ist das auf Kristallstrukturen verwandter Nukleasen basierende Homologiemodell von boviner EndoG als Dimer. Strukturen, die zum  $\beta\beta\alpha$ -*metal-finger* Motiv gehören, sind farblich ( $\beta$ -Faltblätter in grün und  $\alpha$ -Helices in rot) dargestellt. Für die Aktivität benötigte Kofaktoren sind als gelbe Kugeln gezeigt. Weiterhin sind neun Aminosäurereste hervorgehoben, deren katalytische Relevanz getestetet wurde<sup>34</sup>.

#### Anhang



Abb. 5-2: Modell von humaner DNase II $\alpha$ : Gezeigt ist das aktuelle 3D Strukturmodell der aktiven Spezies der humanen DNase II $\alpha$ . Es handelt sich um eine monomere bzw. pseudodimere Struktur. Aminosäurereste, die vermutlich zum aktiven Zentrum, welches hier aus zwei PLD-Motiven gebildet wird, gehören sind orange gefärbt (siehe auch Abb. 4-2). In magentarot dargestellt sind die Asparaginreste, die bei der nativen DNase II $\alpha$ glykosyliert vorliegen. Die DNase II $\alpha$  verfügt außerdem über drei Dissulfidbrücken, die hier in gelb abgebildet sind<sup>71</sup>.

# 6.6 Verwendete Plasmide











# 6.7 Die iFold<sup>TM</sup>-Matrix

# 7 Literaturverzeichnis

- 1. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M. Programmed Cell Death--I. Cytology Of Degeneration In The Intersegmental Muscles Of The Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* 11, 123-33 (1965).
- 3. Horvitz, H.R., Sternberg, P.W., Greenwald, I.S., Fixsen, W. & Ellis, H.M. Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode Caenorhabditis elegans. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 2**, 453-63 (1983).
- 4. Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-2 (1988).
- 5. Ryan, A.E., Shanahan, F., O'Connell, J. & Houston, A.M. Fas ligand promotes tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cell Cycle* **5**, 246-9 (2006).
- 6. Vaux, D.L. & Korsmeyer, S.J. Cell death in development. *Cell* **96**, 245-54 (1999).
- 7. Jacobsen, M.D., Weil, M. & Raff, M.C. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* **133**, 1041-51 (1996).
- 8. Raff, M. Cell suicide for beginners. *Nature* **396**, 119-22 (1998).
- 9. Samejima, K. & Earnshaw, W.C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 677-88 (2005).
- 10. Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 108-16 (2003).
- 11. Nagata, S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* **23**, 853-75 (2005).
- 12. Lagarkova, M.A., Iarovaia, O.V. & Razin, S.V. Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J Biol Chem* **270**, 20239-41 (1995).
- 13. Solovyan, V.T., Bezvenyuk, Z.A., Salminen, A., Austin, C.A. & Courtney, M.J. The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 21458-67 (2002).
- 14. Oliveri, M. et al. DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol* **31**, 743-51 (2001).
- 15. Widlak, P. & Garrard, W.T. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* **94**, 1078-87 (2005).
- 16. Parrish, J.Z. & Xue, D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in C. elegans. *Mol Cell* **11**, 987-96 (2003).
- 17. Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D. & Lieberman, J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **112**, 659-72 (2003).
- 18. Shiokawa, D. & Tanuma, S. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* **40**, 143-52 (2001).
- 19. Krieser, R.J. et al. Deoxyribonuclease IIalpha is required during the phagocytic phase of apoptosis and its loss causes perinatal lethality. *Cell Death Differ* **9**, 956-62 (2002).
- 20. McIlroy, D. et al. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 14, 549-58 (2000).
- 21. Napirei, M. et al. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* **25**, 177-81 (2000).

- 22. Anzai, N. et al. Types of nuclear endonuclease activity capable of inducing internucleosomal DNA fragmentation are completely different between human CD34+ cells and their granulocytic descendants. *Blood* **86**, 917-23 (1995).
- 23. Shiokawa, D., Kobayashi, T. & Tanuma, S. Involvement of DNase gamma in apoptosis associated with myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* **277**, 31031-7 (2002).
- 24. Shiokawa, D. & Tanuma, S. Differential DNases are selectively used in neuronal apoptosis depending on the differentiation state. *Cell Death Differ* **11**, 1112-20 (2004).
- 25. Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**, 32-43 (2007).
- Sehra, S. & Dent, A.L. Caspase function and the immune system. *Crit Rev Immunol* 26, 133-48 (2006).
- 27. Scheel-Toellner, D. et al. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 876-9 (2002).
- 28. MacFarlane, M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* **139**, 89-97 (2003).
- 29. Green, D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1-4 (2000).
- 30. Kandasamy, K. et al. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* 63, 1712-21 (2003).
- 31. Shi, Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 677-84 (2006).
- 32. Bao, Q. & Shi, Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**, 56-65 (2007).
- 33. Uren, R.T. et al. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem* **280**, 2266-74 (2005).
- 34. Schafer, P. et al. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol* **338**, 217-28 (2004).
- 35. Li, L.Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-9 (2001).
- 36. Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X. & Garrard, W.T. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* **276**, 48404-9 (2001).
- 37. Susin, S.A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6 (1999).
- 38. Thomas, D.A., Du, C., Xu, M., Wang, X. & Ley, T.J. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* **12**, 621-32 (2000).
- 39. Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. & Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**, 287-96 (1999).
- 40. Ruiz-Carrillo, A. & Renaud, J. Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. *Embo J* **6**, 401-7 (1987).
- 41. Cote, J. & Ruiz-Carrillo, A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* **261**, 765-9 (1993).
- 42. Ohsato, T. et al. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur J Biochem* **269**, 5765-70 (2002).
- 43. Huang, K.J., Zemelman, B.V. & Lehman, I.R. Endonuclease G, a candidate human enzyme for the initiation of genomic inversion in herpes simplex type 1 virus. *J Biol Chem* **277**, 21071-9 (2002).
- 44. Huang, K.J., Ku, C.C. & Lehman, I.R. Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8995-9000 (2006).
- 45. Arnoult, D. et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* **22**, 4385-99 (2003).
- 46. Parrish, J. et al. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans. *Nature* **412**, 90-4 (2001).
- 47. Zhang, J. et al. Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15782-7 (2003).
- 48. Irvine, R.A. et al. Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol Cell Biol* **25**, 294-302 (2005).
- 49. Ishihara, Y. & Shimamoto, N. Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *J Biol Chem* **281**, 6726-33 (2006).
- 50. Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W.T. & Widlak, P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* **10**, 821-30 (2005).
- 51. Parrish, J.Z. & Xue, D. Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development. *Chromosoma* **115**, 89-97 (2006).
- 52. Kawane, K. et al. Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol* **4**, 138-44 (2003).
- 53. Evans, C.J. & Aguilera, R.J. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene* **322**, 1-15 (2003).
- Lyon, C.J. & Aguilera, R.J. Purification and characterization of the immunoglobulin switch sequence-specific endonuclease (Endo-SR) from bovine spleen. *Mol Immunol* 34, 209-19 (1997).
- 55. Baker, K.P., Baron, W.F., Henzel, W.J. & Spencer, S.A. Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. *Gene* **215**, 281-9 (1998).
- 56. Harosh, I., Binninger, D.M., Harris, P.V., Mezzina, M. & Boyd, J.B. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. *Eur J Biochem* **202**, 479-84 (1991).
- 57. MacLea, K.S., Krieser, R.J. & Eastman, A. Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease IIalpha. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 415-21 (2002).
- 58. Laskowski, M., Steberl, E.A., Akka, R. & Watson, P. Partial purification of DNase II from thymus. *Biochim Biophys Acta* **13**, 595-6 (1954).
- 59. Bernardi, G. & Griffe, M. Studies On Acid Deoxyribonuclease. Ii. Isolation And Characterization Of Spleen-Acid Deoxyribonuclease. *Biochemistry* **3**, 1419-26 (1964).
- 60. Barry, M.A. & Eastman, A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **300**, 440-50 (1993).
- 61. Barry, M.A., Reynolds, J.E. & Eastman, A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* **53**, 2349-57 (1993).
- 62. Wu, Y.C., Stanfield, G.M. & Horvitz, H.R. NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* **14**, 536-48 (2000).
- 63. Kawane, K. et al. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* **292**, 1546-9 (2001).

- 64. Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H. & Nagata, S. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat Immunol* **6**, 49-56 (2005).
- 65. Kawane, K. et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**, 998-1002 (2006).
- 66. Takeshita, H. et al. Identification of the three non-identical subunits constituting human deoxyribonuclease II. *FEBS Lett* **440**, 239-42 (1998).
- 67. Wang, C.C., Lu, S.C., Chen, H.L. & Liao, T.H. Porcine spleen deoxyribonuclease II. Covalent structure, cDNA sequence, molecular cloning, and gene expression. *J Biol Chem* **273**, 17192-8 (1998).
- 68. Cheng, Y.C., Hsueh, C.C., Lu, S.C. & Liao, T.H. Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. *Biochem J* **398**, 177-85 (2006).
- 69. MacLea, K.S., Krieser, R.J. & Eastman, A. Structural requirements of human DNase II alpha for formation of the active enzyme: the role of the signal peptide, N-glycosylation, and disulphide bridging. *Biochem J* **371**, 867-76 (2003).
- 70. Cymerman, I.A., Meiss, G. & Bujnicki, J.M. DNase II is a member of the phospholipase D superfamily. *Bioinformatics* **21**, 3959-62 (2005).
- 71. Schafer, P., Cymerman, I.A., Bujnicki, J.M. & Meiss, G. Human lysosomal DNase II{alpha} contains two requisite PLD-signature (HxK) motifs: Evidence for a pseudodimeric structure of the active enzyme species. *Protein Sci* **16**, 82-91 (2007).
- 72. Stuckey, J.A. & Dixon, J.E. Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol* **6**, 278-84 (1999).
- 73. Meiss, G., Franke, I., Gimadutdinow, O., Urbanke, C. & Pingoud, A. Biochemical characterization of Anabaena sp. strain PCC 7120 non-specific nuclease NucA and its inhibitor NuiA. *Eur J Biochem* **251**, 924-34 (1998).
- 74. Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172-5 (1989).
- 75. Hames, B.D. & Rickwood, D. Gel Electrophoresis of Proteins, 2nd ed. IRL Press, Oxford (1990).
- 76. Rickwood, D. & Hames, B.D. Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, 2nd ed. IRL Press, Oxford (1990).
- 77. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
- 78. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).
- 79. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23 (1979).
- 80. Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. (1989).
- 81. McPherson. Evolution of polymerase chain reaction to a quantitative laboratory tool. *Clin Chem* 41, 1065-7. (1995).
- 82. Mullis, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**, 17-27 (1992).
- 83. Kirsch, R.D. & Joly, E. An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res* 26, 1848-50 (1998).
- 84. Sessa, G. & Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* **9**, 310-8 (1968).

- 85. Gao, X. & Huang, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* **2**, 710-22 (1995).
- 86. Kunitz, M. Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol* **33**, 349-62 (1950).
- 87. Rozema, D. & Gellman, S.H. Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B. *J Biol Chem* **271**, 3478-87 (1996).
- 88. De Marco, V., Stier, G., Blandin, S. & de Marco, A. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 766-71 (2004).
- 89. Liao, T.H., Liao, W.C., Chang, H.C. & Lu, K.S. Deoxyribonuclease II purified from the isolated lysosomes of porcine spleen and from porcine liver homogenates. Comparison with deoxyribonuclease II purified from porcine spleen homogenates. *Biochim Biophys Acta* **1007**, 15-22 (1989).
- 90. Chang, H.C. & Liao, T.H. Reassociation of deoxyribonuclease II with the lysosomal membrane isolated from porcine spleen. *Arch Biochem Biophys* **280**, 320-4 (1990).
- 91. Shlyapnikov, S.V. et al. Atomic structure of the Serratia marcescens endonuclease at 1.1 A resolution and the enzyme reaction mechanism. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 567-72 (2000).
- 92. Marston, F.A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. *Biochem J* **240**, 1-12 (1986).
- 93. Nallamsetty, S. & Waugh, D.S. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expr Purif* **45**, 175-82 (2006).
- 94. Pingoud, A.U., C. *Arbeitsmethoden der Biochemie*, de Gruyter, Berlin; New York, (1997).
- 95. Chow, M.K. et al. The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res* **34**, D207-12 (2006).
- 96. Waugh, D.S. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol* 23, 316-20 (2005).
- 97. Marblestone, J.G. et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci* **15**, 182-9 (2006).
- 98. Machida, S. et al. Cycloamylose as an efficient artificial chaperone for protein refolding. *FEBS Lett* **486**, 131-5 (2000).
- 99. Lanckriet, H. & Middelberg, A.P. Operational regimes for a simplified one-step artificial chaperone refolding method. *Biotechnol Prog* **20**, 1861-7 (2004).
- 100. Beckmann, B. Justus-Liebig-Universität (2006).
- 101. Ponting, C.P. & Kerr, I.D. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci* **5**, 914-22 (1996).
- 102. Leiros, I., Secundo, F., Zambonelli, C., Servi, S. & Hough, E. The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure* **8**, 655-67 (2000).
- 103. Liao, T.H. The subunit structure and active site sequence of porcine spleen deoxyribonuclease. *J Biol Chem* **260**, 10708-13 (1985).
- 104. Gottlin, E.B., Rudolph, A.E., Zhao, Y., Matthews, H.R. & Dixon, J.E. Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9202-7 (1998).
- 105. Waite, M. The PLD superfamily: insights into catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1439, 187-97 (1999).
- 106. Tang, J. et al. Expression, crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma kallikrein. *J Biol Chem* **280**, 41077-89 (2005)