
Mechanismus der Inhibition und Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

— Dr. rer. nat. —

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl. -Biol. Daniel Kutscher
geboren am 27.01.1982
in Frankfurt am Main

Gießen, 2011

Für meine lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie (FB 08, Biologie und Chemie) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von März 2008 bis Januar 2011 unter der Leitung von PD Dr. Gregor Meiss angefertigt.

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

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Tina Trenczek
Institut für allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Stephanstraße 24
35390 Gießen

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit „Mechanismus der Inhibition und Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase“, selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet habe.

Gießen, den:

Unterschrift:

(Daniel Kutscher)

I. Publikationen

1. *Daniel Kutscher, Alfred Pingoud, Albert Jeltsch and Gregor Meiss*
Identification of protein-protein interaction sites involved in inhibition of the
Caspase-activated DNase (about to be re-submitted)

II. Teilnahme an Fachkonferenzen

1. NEB Meeting 2010 (Bremen)

- *The 6th New England Biolabs Meeting on DNA Restriction and Modification*
- 1.-6. August 2010
- Campus der Jacobs Universität, Bremen, Deutschland
- Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster
- „*Studies on the mechanism of CAD inhibition by ICAD*“

2. NACON VIII Conference (Sheffield)

- *The 8th International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids*
- 12.-16. September 2010
- *The Edge, The University of Sheffield, Sheffield, England*
- Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster
- „*Inhibition of the apoptotic nuclease CAD by ICAD-peptides*“

III. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Pingoud für die dauerhafte Unterstützung, die wertvollen Hinweise im Rahmen dieser Arbeit und die interessanten Diskussionen, sowie konstruktiven Kritiken in den Seminaren, die mich sowohl fachlich als auch persönlich weitergebracht haben.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Gregor Meiss für die Überlassung des interessanten Themas und die große Unterstützung gerade zu Beginn meiner Doktorarbeit. Außerdem danke ich dir dafür, dass du dich, trotz der neuen beruflichen Belastungen, weiterhin um mich gekümmert hast. Deine Art Wissen zu vermitteln, an wissenschaftliche Problemstellungen heranzugehen und mit Menschen umzugehen hat mich sehr geprägt!

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

Ich danke den ehemaligen Mitgliedern des Instituts (Jasmina, Steffi R. u. T., Wibke, Jana, Michele, Ines W. Paddy, Jochen, Vicki) für die schöne Zeit zu Beginn meiner Doktorarbeit. Kaum zu glauben, wie schnell die Zeit vergeht!

Marika, danke, dass du mit mir bis zum Schluss die „Stellung“ gehalten hast! Das letzte Jahr war bestimmt nicht einfach, aber die Tatsache, dass uns wir beide in dieser neuen Situation zurechtfinden mussten, hat sicherlich geholfen.

Heike, dir möchte ich zum einen natürlich für die Hilfe im Labor danken, zum anderen aber auch für die netten und motivierenden Gespräche in unserer Zeit als „Denkzellen-Kumpanen“, die ich sehr genossen habe!

Mr. A. D. Marx danke ich für seine treue Freundschaft und die zahlreichen Sportduelle. Du bist ein feiner Kerl, bleib so wie du bist!

Den Labor-Superhelden Benno, Ines F. und Roger, mit *Mighty Mert* als *Captain Hero*, danke ich für die vielen spannenden Abenteuer, die wir gemeinsam erlebt haben. Danke, dass ich zum Kreis der Auserwählten gehören durfte ☺ !!!

Den Mädels vom Sekretariat danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei jeglichen organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten.

Generell möchte ich allen Mitgliedern des Instituts ein herzliches Dankeschön für das gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft aussprechen.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung danken.

Meinen zahlreichen Praktikanten und Praktikantinnen wünsche ich eine zufriedene Zukunft und danke euch für die schöne und auch für mich lehrreiche Zeit.

Lena, danke, dass du immer so verständnisvoll warst. Ich bin glücklich, dass wir uns gefunden haben und freue mich auf unsere nächsten gemeinsamen Schritte, wo auch immer wir sie bestreiten werden und wie auch immer sie aussehen mögen ☺ ! *Yes we can !!!*

Am allermeisten danke ich jedoch meinen Eltern und meinem Bruder Andreas, die mich in all den Jahren bedingungslos unterstützt haben. Mir ist bewusst, dass es ein sehr großes Geschenk ist in einer solch warmherzigen und loyalen Familie aufzuwachsen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Apoptose	1
1.1.1 Apoptose und Krankheiten.....	2
1.1.2 Apoptotische Signaltransduktionswege	2
1.1.2.1 Rezeptorvermittelte Apoptose	2
1.1.2.2 Granulavermittelte Apoptose.....	3
1.1.2.3 Mitochondriale Apoptose	3
1.1.2.4 Aktivierung von Caspasen.....	4
1.1.2.5 DNA Fragmentierung im Zuge der Apoptose	5
1.2 Nukleasen	5
1.2.1 Einteilung der Nukleasen	6
1.2.2 Aktive Zentren von Nukleasen, das H-N-H Motiv.....	6
1.2.3 Biologische Funktion von Nukleasen	7
1.3 DFF: Der DNA-Fragmentierungsfaktor	7
1.3.1 Interaktion von CAD und ICAD	8
1.3.1.1 Bisherige strukturelle Informationen	9
1.4 Die Caspase-aktivierte DNase (CAD/DFF40).....	11
1.5 Der Inhibitor der DNase CAD	12
1.6 Die Inhibition von Nukleasen	14
1.7 Hochspezifische Nukleasen in der Gentherapie.....	16
1.8 Ziel dieser Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Geräte.....	19
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Radiochemikalien.....	21
2.1.4 Größenstandards	22
2.1.4.1 Protein Größenstandards	22
2.1.4.2 DNA Größenstandards	22
2.1.5 Enzyme	23
2.1.5.1 Restriktionsenzyme	23
2.1.5.2 Proteasen und DNA-modifizierende Enzyme	24
2.1.5.3 <i>Homing</i> -Endonukleasen	24
2.1.6 Oligonukleotide	24
2.1.7 Kits	26
2.1.8 Antikörper	26
2.1.9 Fluorophore	27
2.2 Mikrobiologisches Arbeiten.....	27
2.2.1 Nährmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen.....	27
2.2.2 <i>E. coli</i> Stämme.....	28
2.2.3 Plasmidvektoren	29
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen	31
2.2.4.1 TSS-kompetente Zellen.....	31
2.2.4.2 Elektrokompente Zellen.....	32
2.2.4.3 Z-kompetente Zellen	32
2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit DNA	32
2.2.5.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen	32
2.2.5.2 Transformation elektrokompenter Zellen.....	33
2.2.5.3 Transformation Z-kompetenter Zellen	33
2.2.6 Glycerinkulturen von <i>E. coli</i>	33
2.3 Molekularbiologisches Arbeiten	34
2.3.1 Die Gelelektrophorese	34
2.3.1.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.3.1.3 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
2.3.2 Plasmid-DNA Isolation	35
2.3.3 Ethanol fällung	35
2.3.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	36
2.3.5 Klonierung und Modifikation von DNA	36
2.3.5.1 DNA Verdau mittels Restriktionsenzyme.....	36

2.3.5.2	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.3.6	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	37
2.3.6.1	PCR Standardbedingungen.....	37
2.3.6.2	PCR-Standardansatz	38
2.3.6.3	Mutagenese-PCR Standardbedingungen.....	38
2.3.6.4	Mutagenese-PCR Standardansatz.....	39
2.3.6.5	Inverse PCR.....	39
2.3.7	Radioaktives Markieren von Nukleinsäuren	40
2.3.7.1	PCR mit [α - 32 P] dATP.....	40
2.3.7.2	Messung und Quantifizierung von Radioaktivität.....	41
2.3.8	Expression rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	41
2.3.8.1	Expression von Proteinen im präparativen Maßstab	43
2.3.8.2	Aufschluss von Zellen mittels Ultraschall	43
2.3.9	Reinigung rekombinanter Proteine.....	44
2.3.9.1	Affinitätschromatographie.....	44
2.3.9.1.1	Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie	44
2.3.9.1.2	Ni ²⁺ - NTA Affinitätschromatographie	44
2.3.9.1.3	Strep-Tactin Sepharose Affinitätschromatographie	45
2.3.9.2	Ionenaustauschchromatographie	45
2.3.9.2.1	Anionenaustauschchromatographie (MonoQ-Säule).....	45
2.3.9.2.2	Kationenaustauschchromatographie (Heparin-Säule).....	46
2.3.9.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie	46
2.3.9.4	Gelfiltration	46
2.3.10	Charakterisierung von Proteinen.....	47
2.3.10.1	Konzentrationsbestimmungen.....	47
2.3.10.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.3.10.3	CD-Spektroskopie von Proteinen	47
2.3.10.4	Aktivierung der Nuklease CAD.....	48
2.3.10.5	Nuklease-Aktivitätsassay	48
2.3.10.6	Nuklease Inhibitionssassays (ICAD)	48
2.3.10.7	Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD	49
2.3.10.8	Fluoreszenzassays.....	49
2.3.11	Die SPOT <i>peptide (array) synthesis</i> Methode.....	49
2.3.11.1	Synthese der SPOT-Membranen	50
2.3.11.2	Anwendung der SPOT-Methode zur Analyse der CAD-ICAD Interaktionen.....	50
2.3.11.3	Anwendung der SPOT-Methode zur Analyse der ICAD-ICAD Interaktionen.....	51
2.3.11.4	Anwendung der SPOT-Methode zur Analyse der CAD-Topoisomerase II α Interaktionen.....	54
2.3.12	Charakterisierung von Peptiden.....	62
2.3.12.1	CAD Inhibitionsassays (Peptide)	62
2.3.12.2	NucA Inhibitionsassays	63
2.3.12.3	Ultrafiltration	63
2.3.12.4	CD-Spektroskopie von Peptiden	63
2.3.13	Generation einer hochspezifischen CAD	63
2.3.13.1	EMSA Versuche	64
2.3.13.2	Spaltassays.....	64
2.3.14	Kristallisationsstudien	64
2.3.14.1	Kristallisationsreagenzien.....	64
2.3.14.2	Inkubationsbedingungen	65
2.3.15	Interaktions- <i>modelling</i>	65
2.4	Verwendung von Online-Datenbanken.....	65
2.4.1	Proteinsequenzen.....	65
2.4.2	Sekundärstrukturvorhersagen von Proteinen und Peptiden.....	65
2.4.3	<i>In-Silico</i> Charakterisierung von Proteinen.....	65

3. ERGEBNISSE

3.1	SPOT-Membran Versuche	66
3.1.1	CAD - ICAD Interaktionsstudien	66
3.1.1.1	CAD SPOT-Membran.....	66
3.1.1.2	Interaktion mit der CAD C1-Domäne.....	66
3.1.1.2.1	Interaktion mit der CAD Dimerisierungsdomäne	67
3.1.1.2.2	Interaktion im Bereich der Zn ²⁺ -Bindestelle von CAD.....	68
3.1.1.2.3	Interaktion mit dem katalytischen Zentrum.....	68
3.1.1.2.4	Interaktion mit der NLS-Region	68
3.1.1.2.5	Weitere Interaktionen	68
3.1.1.3	Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen CAD SPOT-Membran Daten	69
3.1.1.4	ICAD SPOT-Membran.....	70

3.1.1.4.1	Interaktion mit der ICAD D1-Domäne	70
3.1.1.4.2	Interaktion mit den Caspase-3 Spaltstellen	70
3.1.1.4.3	Interaktion mit der inhibitorischen Domäne (D2)	71
3.1.1.4.4	Interaktion mit der C-terminalen D3-Domäne	71
3.1.1.5	Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen ICAD SPOT-Membran Daten	72
3.1.2	Interaktionsmodell.....	72
3.1.3	ICAD - ICAD Interaktionsstudien.....	74
3.1.4	Topoisomerase II alpha - CAD Interaktionsstudien.....	75
3.2	CAD Inhibition durch ICAD-abgeleitete Peptide	76
3.2.1	Inhibitionsassays mit ICAD-abgeleiteten Peptiden.....	77
3.2.2	Inhibitionsassays mit „scrambled“ B1 Peptid	78
3.2.3	Inhibitionsassays mit Peptid B2	79
3.2.4	Titrationenversuche mit den Peptiden B1 und B2	80
3.2.5	NucA Inhibitionsassays.....	82
3.2.6	Strukturvorhersage für die Peptide B1 und B2.....	84
3.2.7	CD-Spektrum von Peptid B1	85
3.3	Untersuchungen zur CAD Inhibition durch ICAD	86
3.3.1	ICAD-S Y195 Varianten mit stark reduzierter Inhibition	86
3.3.2	ICAD E143R Varianten mit reduzierter CAD Inhibition	89
3.3.3	Graphische Darstellung der ICAD Inhibitionsassays.....	92
3.3.4	CD-Spektroskopie.....	93
3.3.5	Sekundärstrukturvorhersage für die Region um Position Y195	94
3.4	Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD	95
3.4.1	Aktivitätsassay mit ICAD ^{TEV}	95
3.4.2	Mutation der Caspase-3 Spaltstellen in ICAD ^{TEV}	96
3.4.3	Fluoreszenzversuche mit ICAD ^{TEV} Variante ²²¹ DAVA ²²⁴	97
3.5	ICAD Kristallisationsstudien	99
3.5.1	Etablierung einer geeigneten Expressions- und Reinigungs- Methode für ICAD-S	99
3.5.2	Kristallisation.....	100
3.6	Erstellen einer hochspezifischen CAD-Nuklease durch Fusion mit I-SceI.....	101
3.6.1	Etablierung einer geeigneten Expressions- und Reinigungs- Methode.....	101
3.6.2	EMSA Versuche.....	102
3.6.3	Spaltassays	103
4.	DISKUSSION	104
4.1	SPOT-Membran Versuche	104
4.1.1	CAD - ICAD Interaktionsstudien	104
4.1.1.1	CAD SPOT-Membran.....	105
4.1.1.2	ICAD SPOT-Membran.....	107
4.1.2	ICAD - ICAD Interaktionsstudien.....	108
4.1.3	Topoisomerase II alpha - CAD Interaktionsstudien.....	108
4.2	CAD Inhibition durch ICAD-abgeleitete Peptide	109
4.3	Untersuchungen zur CAD Inhibition durch ICAD	110
4.4	Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD	113
4.5	ICAD Kristallisationsstudien	114
4.6	Erstellen einer hochspezifischen CAD-Nuklease durch Fusion mit I-SceI.....	114
5.	ZUSAMMENFASSUNG	117
6.	ANHANG	120
6.1.1.1	Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen CAD SPOT-Membran Daten	120
6.1.1.2	Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen ICAD SPOT-Membran Daten	121
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
8.	LITERATUR	126

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein fundamentaler, genetisch festgelegter Bestandteil der Entwicklung und zellulären Homöostase vielzelliger Organismen^{1, 2}. Sie erlaubt die Ausbildung von Körperstrukturen im Zuge der Embryogenese und sorgt für die Beseitigung überflüssiger, kranker oder infizierter Zellen³⁻⁵. Der programmierte Zelltod wurde dabei zum ersten Mal 1842 von Carl Vogt im Rahmen von Untersuchungen bezüglich der Entwicklung von Kaulquappen, beschrieben⁶. Vogt stellte dabei fest, dass Amphibien während der Ontogenese unerwünschtes Gewebe (Schwanz, Schwimmhäute) gezielt durch Zelltod abbauen können. Später (1972) prägte John Kerr, zusammen mit Andrew Wyllie, den Begriff Apoptose, um den „natürlichen“ Zelltod während der Ontogenese vom „Unfalltod“ einer Zelle (Nekrose) abzugrenzen². Die Nekrose ist dabei im Vergleich zur Apoptose ein unkontrollierter Prozess, der eine inflammatorische Reaktion zufolge hat^{7, 8}. Weiter kann Apoptose (Programmierter Zelltod Typ I) vom Zelltod durch Autophagie (Programmierter Zelltod Typ II) unterschieden werden^{9, 10}. Letztere dient normalerweise der Homöostase von physiologischen Prozessen innerhalb einer Zelle, wie zum Beispiel dem Abbau alter und der Produktion neuer Zellbestandteile (Proteine, Zellorganelle)¹¹⁻¹³. Jedoch kann Autophagie unter bestimmten Umständen auch zum Zelltod führen¹⁴. Während der Apoptose führen biochemische Prozesse zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle und darauf folgend zum Zelltod. Diese Veränderungen beginnen mit dem Schrumpfen der Zelle, das durch den proteolytischen Abbau des Cytoskeletts (Spaltung der Aktinfilamente) ausgelöst wird¹. Nun verdichtet sich das Chromatin zu einer einheitlichen Masse (Chromatinkondensation; Pyknose), die Kernhülle wird aufgelöst und es kommt zum Abbau der chromosomalen DNA (Karyorrhexis) durch apoptotische Nukleasen^{15, 16}. So entstehen die für die Apoptose typischen DNA Fragmente von ca. 180-185 bp, ein Prozess, der als biochemisches Merkmal der Apoptose gilt¹⁷⁻²¹. Schließlich formt die Membran Bläschen (*membrane-blebbing*) aus denen die sogenannten „*apoptotic bodies*“ hervorgehen¹. Um die Überreste im Anschluss abzubauen bzw. wiederzuverwerten, aber auch um Entzündungsreaktionen zu vermeiden, werden diese von Makrophagen phagozytiert²². Hierbei dienen Veränderungen der Plasmamembran, wie zum Beispiel die Translokation von Phosphatidylserin aus der Zelle auf die Zelloberfläche, als Signal²³. Die aufgenommenen Zellreste verschmelzen nun mit den Lysosomen der Makrophagen und werden durch deren Hydrolasen und Phosphatasen vollständig abgebaut. An dieser Stelle wird auch die bereits fragmentierte DNA durch lysosomale DNase II vollständig degradiert^{24, 25}. Zum heutigen Verständnis der Kontrollmechanismen des programmierten Zelltods haben vor allem Untersuchungen von Robert Horvitz und seinen Kollegen beigetragen. Sie untersuchten die Genese somatischer Zellen des Nematoden *C. elegans* und konnten dabei die wichtigsten von etwa 14 Genen (*ced-3*, *ced-4*, *ced-9*; *ced*: *Cell death abnormal*), die am programmierten Zelltod beteiligt sind, nachweisen^{26, 27}. Horvitz wurde im Jahr 2002 für seine herausragenden Entdeckungen mit dem Nobelpreis in Medizin ausgezeichnet.

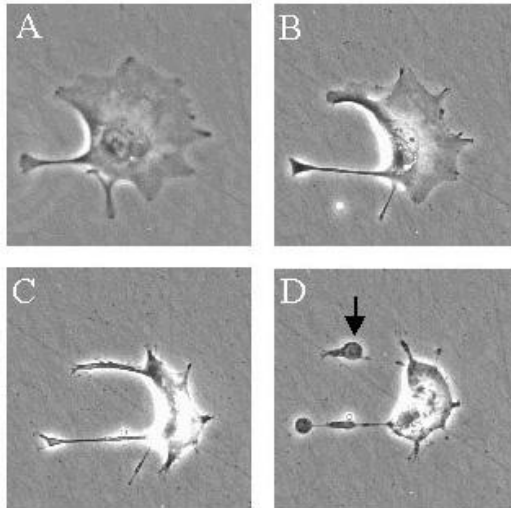


Abbildung 1: Verschiedene Stadien der Apoptose

Gezeigt ist eine Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten der Apoptose. A-C: Die Zelle beginnt zu schrumpfen und nimmt eine hufeisenartige Form an. D: Die Membran bildet Bläschen (*membrane-blebbing*) aus denen die sogenannten „*apoptotic bodies*“ (siehe Pfeil) hervorgehen. Um die Überreste im Anschluss abzubauen bzw. zu recyceln, aber auch um Entzündungsreaktionen zu vermeiden, werden diese von Makrophagen phagozytiert. (Quelle: www.reading.ac.uk)

1.1.1 Apoptose und Krankheiten

Neben der Wichtigkeit von Apoptose im Rahmen der Ontogenese und der zellulären Homöostase wird eine Fehlregulation der Apoptose mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei wird eine Störung des apoptotischen Gleichgewichts vermutet, durch die es entweder zu einer verminderten oder aber zu einer erhöhten Apoptoserate kommt. So ist bekannt, dass eine übermäßige Apoptose eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson, spielt^{28, 29}. Außerdem steht eine erhöhte Apoptoserate in Verbindung mit dem Creutzfeldt-Jakob-Syndrom und AIDS^{30, 31}. In letzterem Fall führt verstärkte Apoptose zum Absterben von Immunzellen in Folge einer HIV-Infektion. Durch den übermäßigen Verlust an T-Helferzellen können nun eigentlich harmlose Zweiterkrankungen lebensbedrohlich werden. Eine verminderte Apoptoserate kann zu unkontrollierter Zellproliferation und damit verbunden zur Entstehung von Krebs führen³². Ziel der derzeitigen Forschung ist es Wege zu finden, um den Zelltod bei Krebserkrankungen gezielt auszulösen³³.

1.1.2 Apoptotische Signaltransduktionswege

Eine große Vielfalt von Signalen kann Apoptose auslösen. Dabei wird in extrinsische und intrinsische Signale unterschieden. Zu den Signaltransduktionswegen, die durch extrinsische Signale, also extrazelluläre Signale aktiviert werden, zählt die rezeptorvermittelte Apoptose und die granulavermittelte Apoptose. Bei den intrinsischen Signalen handelt es sich im Gegensatz dazu um intrazelluläre Signale, die unter Mitwirkung der Mitochondrien Apoptose auslösen. Einen durch intrinsische Signale vermittelten Signaltransduktionsweg stellt die mitochondriale Apoptose dar.

1.1.2.1 Rezeptorvermittelte Apoptose

Bei der rezeptorvermittelten Apoptose binden extrazelluläre Signale in Form von Liganden (TNF, Tumornekrosefaktor; FasL bzw. CD95L) an ihren entsprechenden Rezeptor (TNF-R1/R2; FasR)³⁴

³⁶. Die Rezeptoren sind dabei Transmembran-Proteine, die eine Kommunikation zwischen Zelläußerem und Zellinnerem ermöglichen und das Signal so in den Intrazellularraum übertragen³⁷. Dies geschieht durch Oligomerisierung des Rezeptors und anschließende Rekrutierung eines Adaptermoleküls (FADD bzw. TRADD), das über eine DED-Domäne (*death effector domain*) verfügt. Im weiteren Verlauf bindet die DED-Domäne der Procaspase-8, eine Pro-Initiatorcaspase, an die DED-Domäne des Adaptermoleküls, sodass ein Rezeptor-assoziiertes Proteinkomplex, der sogenannte DISC (*death-inducing signaling complex*) entsteht³⁸. Nun gelangen die gebundenen Pro-Initiatorcaspasen in räumliche Nähe und können ihre autokatalytische Eigenschaft entfalten³⁹. Dies führt zur Spaltung und damit einhergehend zur Aktivierung der Procaspase-8 zu Caspase-8, die sich nun vom Komplex löst und ins Cytosol entlassen wird^{39, 40}. In Folge dieser Aktivierung werden nun weitere Initiatorcaspasen aktiviert, bis schließlich so genannte Effektorcaspasen aktiviert werden (siehe 1.1.2.4).

1.1.2.2 Granulavermittelte Apoptose

Bei dieser Art der apoptotischen Signaltransduktion sekretieren T-Zellen oder Killer-Zellen das porenbildende Protein Perforin sowie so genannte Granzyme⁴¹. Letztere sind Proteasen der Serin-Protease-Familie. Durch die Perforin-induzierte Porenbildung gelangen die Granzyme in die Zielzelle und aktivieren proteolytisch proapoptotische Proteine⁴². Hierbei wird unter anderem auch die Nuklease GAAD (Granzym A-aktivierte DNase) durch Granzym A aktiviert, die den Abbau chromosomaler DNA bewirkt. Ein anderes Granzym, Granzym B, ist wiederum in der Lage den DNA Fragmentierungsfaktor DFF, ähnlich wie Caspase-3, zu aktivieren^{43, 44}. Die aktivierte Untereinheit des DFF-Komplexes (DFF40) induziert nun ebenfalls den Abbau der DNA.

1.1.2.3 Mitochondriale Apoptose

Die mitochondriale Apoptose wird nicht durch extrazelluläre, sondern intrazelluläre bzw. intrinsische Signale ausgelöst⁴⁵⁻⁴⁸. Solche Stimuli können Toxine, oxidativer Stress oder aber auch die Schädigung der DNA sein. Im Zuge der mitochondrialen Apoptose werden proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, wie beispielsweise Bax (*bcl-2 associated protein x*) produziert⁴⁹. Dadurch verlagert sich das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren zugunsten der Proapoptotischen. Hinzukommend werden anti-apoptotische Proteine (z.B. Bcl-2 und Bcl-X_L) durch Bindung von proapoptotischen Proteinen wie PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) inhibiert⁵⁰. Das proapoptotische Protein Bax, ein Kanalprotein, bildet daraufhin Poren in der äußeren Membran der Mitochondrien und ermöglicht so die Freisetzung von Cytochrom-C ins Cytoplasma^{49, 51}. Cytochrom-C lagert sich nun mit weiteren Proteinen zusammen und induziert die Bildung des Apoptosoms, einem Proteinkomplex aus Cytochrom-C, APAF-1 (Apoptose-Proteasen aktivierender Faktor) und Procaspase-9^{52, 53}. Procaspase-9 wird nun, ähnlich wie Procaspase-8 während der rezeptorvermittelten Apoptose, autokatalytisch aktiviert und kann anschließend weitere Effektor-Caspasen anschalten. Ein zusätzliches mitochondriales Intermembranraum-Protein ist AIF (Apoptose induzierender Faktor)⁵⁴. AIF verfügt über eine NADH Oxidase Aktivität und partizipiert ebenfalls an der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran⁵⁵. Einmal im Cytosol löst es in einem Caspase-unabhängigen Weg Apoptose aus⁵⁵. Neben Cytochrom-C und AIF ist auch EndoG (Endonuklease G) ein Protein aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. EndoG kann nach Freisetzung ebenfalls Apoptose auslösen^{56, 57}.

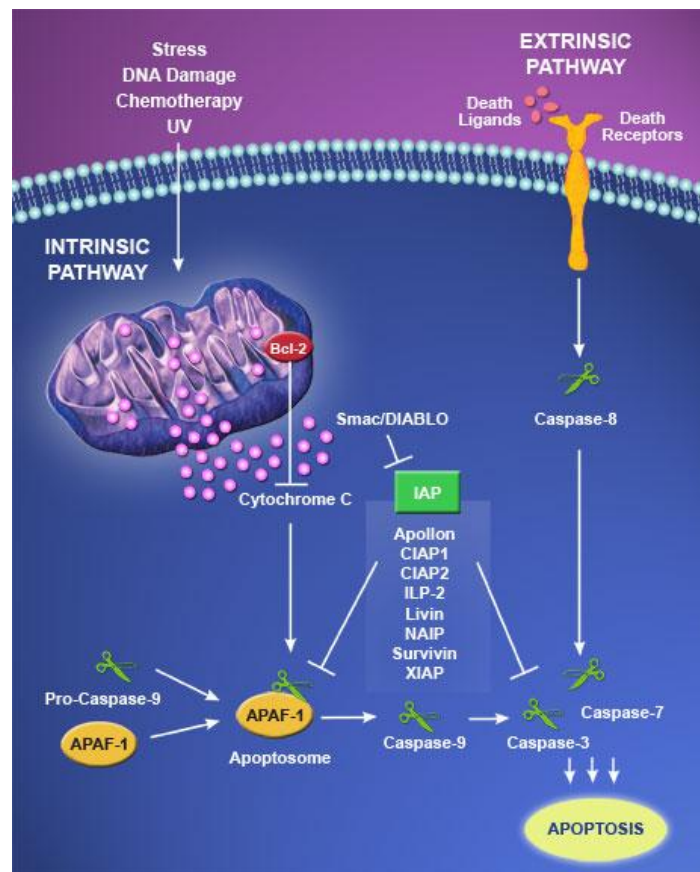


Abbildung 2: Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs

Der intrinsische Weg (links im Bild) wird durch Stimuli wie Toxine, oxidativer Stress oder aber auch die Schädigung der DNA ausgelöst. Nach der Ausschüttung von Cytochrom-C aus dem Mitochondrium ins Cytoplasma bildet sich das Apoptosom und Procaspase-9 wird aktiviert. Beim extrinsischen Signalweg (rechts im Bild) bindet in einem ersten Schritt ein Todesligand (z.B.: FasL) an den Todesrezeptor (z.B.: FasR). Nun kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors wodurch im Cytosol der so genannte DISC entsteht und Caspase-8 aktiviert wird. Beide Signaltransduktionswege führen letzten Endes zur Aktivierung von Caspase-3. IAP-Proteine (*inhibitor of apoptosis*) wie CIAP1 oder Survivin, das fast nur in Krebszellen produziert wird, können die Apoptose hemmen, indem sie an aktivierte Caspasen binden. IAP-Proteine können dabei sowohl auf den intrinsischen, als auch auf den extrinsischen Signalweg wirken. (Quelle:www.imgenex.com)

1.1.2.4 Aktivierung von Caspasen

Nach der Aktivierung der Procaspasen (Procaspase 8+9) während der intrinsischen oder extrinsischen Signaltransduktionswege können nachfolgend so genannte Effektorcaspasen (Caspase 2, 3, 7) prozessiert werden. Diese Effektorcaspasen sind dann wiederum in der Lage spezifische Substrate zu spalten⁵⁸. Aktivierte Caspase-3 spaltet beispielsweise die Inhibitor-Untereinheit des apoptotischen DFF-Komplexes und schaltet so die Fragmentierung der DNA an⁵⁹. Generell betrachtet sind Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) Cystein-Proteasen, die Peptidbindungen C-terminal von einem Aspartat schneiden^{58, 60}. Die Kontrolle der Caspasen erfolgt über IAPs (*inhibitors of apoptosis*; siehe Abbildung 2). Alle IAPs besitzen eine oder mehrere BIR-Domänen (*Baculovirus IAP repeat*), die für die direkte oder

indirekte Inhibition der Caspasen benötigt werden. Bisher konnte eine Beteiligung von Caspasen am programmierten Zelltod nur bei höher entwickelten, vielzelligen Organismen wie Nematoden, Insekten und Wirbeltieren sicher nachgewiesen werden. Dennoch kommen Caspasen auch in anderen Organismen vor, wie die Metacaspasen in Pflanzen, Pilzen und Protozoen, sowie die Paracaspasen in Metazoen und dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*⁶¹. Unsicher ist jedoch, ob diese, den Caspasen verwandte, Proteine auch an Signalwegen des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Jüngste Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass Metacaspasen (Typ I) in Pflanzen den Zelltod kontrollieren⁶². Bekannt ist auch, dass die Caspasen der höher entwickelten Organismen aus den Paracaspasen hervorgegangen sind⁶³.

1.1.2.5 DNA Fragmentierung im Zuge der Apoptose

Das biochemische Kennzeichen der Apoptose ist die nukleosomale Fragmentierung der DNA. Hierbei wird die chromosomale DNA in oligonukleosomale Bruchstücke mit einer Länge von $n \times 200$ Basenpaaren fragmentiert. Diese internukleosomale DNA-Spaltung, in der die „*linker region*“ zweier benachbarter Nukleosomen gespalten wird, führt in apoptotischen Zellen primär CAD (Caspase-aktivierte DNase) aus^{64, 65}. Interessanterweise ist dieser Schritt jedoch für die Apoptose nicht unmittelbar wichtig, da auch mit Cytochalasin B (entkernt die Zellen) behandelte Zellen Apoptose, samt der charakteristischen morphologischen Veränderungen, ausführen können⁶⁶. Bevor die chromosomale DNA in die beschriebenen kleineren Fragmente gespalten wird, kommt es jedoch erst zur hochmolekularen Spaltung des Chromatins in Fragmente von ca. 50-300 kb⁶⁷, einem Prozess an dem Topoisomerase II α beteiligt ist^{68, 69}. Neben den zellautonomen Nukleasen, zu denen die zuvor erwähnte Nuklease CAD, sowie die mitochondriale Nuklease Endo G (Endonuklease G) gehören, gibt es hinzukommend die so genannten akzessorischen Nukleasen²⁵. Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise DNase II, eine monomere Nuklease aus der Phospholipase-D Familie, die in den Lysosomen der Makrophagen lokalisiert ist⁷⁰. Diese Nukleasen übernehmen die Aufgabe des „*waste management*“, also der vollständigen Beseitigung der durch die zellautonomen Nukleasen gelieferten DNA-Fragmente²¹. Akzessorische Nukleasen, zu denen auch DNase I zählt, scheinen überlebenswichtig zu sein. So erwies sich ein *knock-out* von DNase II in Mäusen als letal²⁵. Generell bedeutet die komplette Beseitigung der apoptotischen Körperchen und Abbauprodukte scheinbar mehr als nur bloße Abfallbeseitigung, behält man im Blick, dass durch sie die Eliminierung von Wirtszellen und Eindringlingen kontrolliert, sowie Entzündungsreaktionen unterdrückt werden⁷¹.

1.2 Nukleasen

Allgemein bezeichnet man Stoffe bzw. Moleküle als Nukleasen, die in der Lage sind die Spaltung von Nukleinsäuren zu katalysieren. Hier müssen, neben der vertrauten Gruppe von enzymatischen Nukleasen, auch kleinere chemische Stoffe wie zum Beispiel Imidazol, das ebenso in der Lage ist die Spaltung von Nukleinsäuren zu katalysieren, genannt werden^{72, 73}. Auch erwähnenswert sind die Ribozyme, da sie gerade im Hinblick auf die Evolution des Lebens von großer Bedeutung waren. Diese RNA-Moleküle sind ebenfalls in der Lage die Spaltung von Phosphodiesterbindungen zu katalysieren⁷⁴.

1.2.1 Einteilung der Nukleasen

Die Einteilung von Nukleasen in verschiedene Klassen kann aufgrund verschiedenster Kriterien durchgeführt werden. Zu nennen ist hier beispielsweise die Art der verdauten Nukleinsäure. RNasen (Ribonukleasen) spalten RNA, DNasen (Desoxyribonukleasen) spalten DNA. Ebenso werden Nukleasen bezüglich ihrer Sekundärstrukturspezifität eingeteilt (Einzelstränge oder Doppelstränge). Eine weitere gängige Einteilung erfolgt anhand der Strukturspezifität der Nuklease. Hier unterscheidet man in sequenzspezifische und sequenzunspezifische Nukleasen. Restriktionsenzyme erkennen beispielsweise hochspezifische Erkennungssequenzen von 4-8 bp, *homing*-Endonukleasen sogar Erkennungssequenzen von 18-30 bp⁷⁵⁻⁷⁸. Die so genannten unspezifischen Nukleasen weisen hingegen keine spezifische Erkennungssequenz auf und spalten Nukleinsäuren ohne Sequenzselektivität⁷⁹. Zuletzt sei noch die Klassifizierung nach Art des Angriffs der Spaltung erwähnt. Spaltet das Enzym das DNA-Substrat von den Enden her, wird dieses als Exonuklease bezeichnet, erfolgt die Spaltung im Inneren, so handelt es sich laut Nomenklatur um eine Endonuklease.

1.2.2 Aktive Zentren von Nukleasen, das H-N-H Motiv

Obwohl die Spaltung von DNA und RNA von zum Teil strukturell äußerst unterschiedlichen Enzymen katalysiert wird, zeigt es sich, dass dabei lediglich eine überschaubare Anzahl von strukturell und funktionell unterschiedlichen aktiven Zentren beteiligt ist. Beispiele für solche aktiven Zentren sind das PD(D/E)XK Motiv, das bei Restriktionsendonukleasen wie BamHI und EcoRI vorkommt, das LAGLIDADG Motiv, das bei mehreren *homing*-Endonukleasen (I-Crel, I-SceI, I-Dmol) vorzufinden ist, das GIY-YIG Motiv (beispielsweise bei der Excinuklease UvrC) oder aber das H-N-H Motiv, das im Folgenden näher beschrieben wird⁸⁰⁻⁸⁵. Das H-N-H Motiv findet man in vielen verschiedenen Familien von Nukleasen. Es ist so z.B. in der Familie der hochspezifischen *homing*-Endonukleasen (I-BasI, I-Hmul, I-Ppol) und der T4 Endonuklease VII (Prozessierung von Holliday *junctions*) vertreten. Außerdem ist es bei verschiedenen sequenzunspezifischen Nukleasen, wie NucA (*Anabaena* Nuklease), der periplasmatischen Endonuklease Vvn (*Vibrio vulnificus*), der *Serratia* Nuklease, den *E. coli* Toxinen Colicin E7 und E9, sowie den apoptotischen Nukleasen CAD und EndoG zu finden⁸⁶⁻⁹⁵. Dabei formt das H-N-H Motiv eine Struktur, die als $\beta\beta\alpha$ -Metall (Me)-Finger beschrieben wird⁹⁶. Diese besteht aus zwei anti-parallel verlaufenden β -Strängen und einer α -Helix. Der erste hochkonservierte Histidinrest des H-N-H Motivs dient als allgemeine Base in der Katalyse von Phosphodiesterbindungen⁹⁷. Der Asparaginrest (H-N-H) hält eine wichtige stabilisierende Funktion inne und der zweite Histidinrest (H-N-H) koordiniert das für die Katalyse wichtige Metallion (Mg^{2+})^{98, 99}. Dieser zweite Histidinrest ist nicht so stark konserviert wie die beiden anderen Reste der H-N-H Motivs. So kann an dieser Position durchaus auch ein Asparaginrest gefunden werden (H-N-N). Eine Untergruppe der H-N-H Motiv Nukleasen weist interessanterweise auf einem der beiden β -Stränge ein hochkonserviertes Sub-Motiv, das so genannte DRGH Motiv auf¹⁰⁰. Zu dieser Gruppe gehören z.B. NucA und EndoG^{92, 100}. Der Histidinrest in diesem Sub-Motiv (DRGH) entspricht dabei dem ersten Histidinrest des H-N-H Motivs.

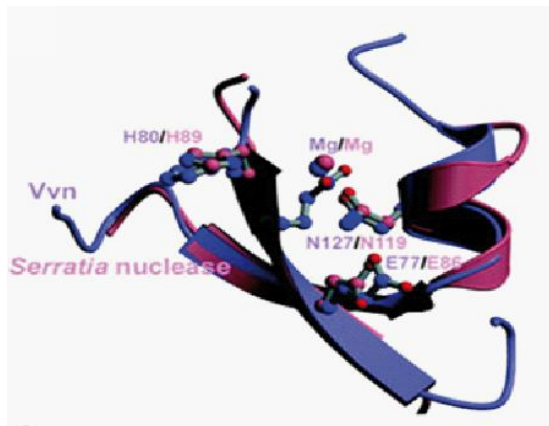


Abbildung 3: Überlagerung zweier aktiver Zentren

Gezeigt ist die Überlagerung des aktiven Zentrums der Endonuklease *Vvn* (blau) mit dem $\beta\alpha$ -Me-Finger Motiv der *Serratia* Nuklease (magenta)⁹⁵. Die aktiven Zentren der verschiedenen Nukleasen zeigen eine ähnliche Struktur. Quelle:⁹⁶

1.2.3 Biologische Funktion von Nukleasen

Die biologische Funktion von Nukleasen in der Natur ist sehr vielfältig. Nukleasen dienen manchen Organismen, wie zum Beispiel *Serratia marcescens*, vermutlich der Versorgung mit Nährstoffen für das Zellwachstum^{79, 101}. Weiter wurde berichtet, dass extrazelluläre Nukleasen, wie die Nuklease von *Vibrio cholerae*, bei der Invasion des Wirts und bei Infektionen eine Rolle spielen¹⁰². Andere Nuklease, wie die *Neurospora crassa* Endonuklease, Rad52 und Nuc1 sind an der DNA Reparatur und Rekombination beteiligt¹⁰³⁻¹⁰⁵. Ebenso an der Reparatur von DNA beteiligt ist die Endonuklease MthH, die im Enzymkomplex mit anderen Proteinen (MthHLS, *mismatch repair system*) für das Ausschneiden falsch eingebauter Basen in der DNA sorgt¹⁰⁶. In Pflanzen wurden ebenso Nukleasen gefunden. Hier ist die Mungbohnen Nuklease eines der am besten charakterisierten Enzyme. Sie wird mit der Zellteilung in Verbindung gebracht¹⁰⁷. Außerdem sind Nukleasen zu erwähnen, die bei der Replikation eine Rolle spielen. Solche Enzyme, die DNA entwinden, sind beispielsweise die Topoisomerasen¹⁰⁸. Interessant sind auch die so genannten Restriktionsenzyme, die Bakterien vor viraler DNA schützen sollen. Hier werden spezifische Erkennungssequenzen des Restriktionsenzymes in der bakteriellen DNA methyliert und somit vor der Spaltung geschützt. Nicht modifizierte DNA Sequenzen, die sich zum Beispiel auf von Viren (Bakteriophagen) injizierter DNA befinden, werden jedoch erkannt und verdaut⁷⁶. Große Bedeutung hat in den letzten Jahren der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) gewonnen. Hier spielen RNasen wie Dicer und Drosha eine entscheidende Rolle^{109, 110}. Weiter sorgen während der Apoptose apoptotische Nukleasen für den Abbau der chromosomalen DNA. Hierfür ist vor allem der DNA Fragmentierungsfaktor DFF verantwortlich, auf den im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird^{20, 111}.

1.3 DFF: Der DNA-Fragmentierungsfaktor

Eines der Kennzeichen der Apoptose ist die DNA-Fragmentierung durch apoptotische Nukleasen, die erstmals 1980 von Wyllie *et al.* beschrieben wurde¹. Interessanterweise wurde dieses Phänomen bereits vier Jahre vor der eigentlichen Erkenntnis beobachtet, dass das eukaryotische Genom in Nukleosomen verpackt ist, und zwei Jahre vor der Prägung des Begriffs „Apoptose“^{2, 112, 113}. Erst wesentlich später wurde dann der für dieses Phänomen hauptsächlich verantwortliche

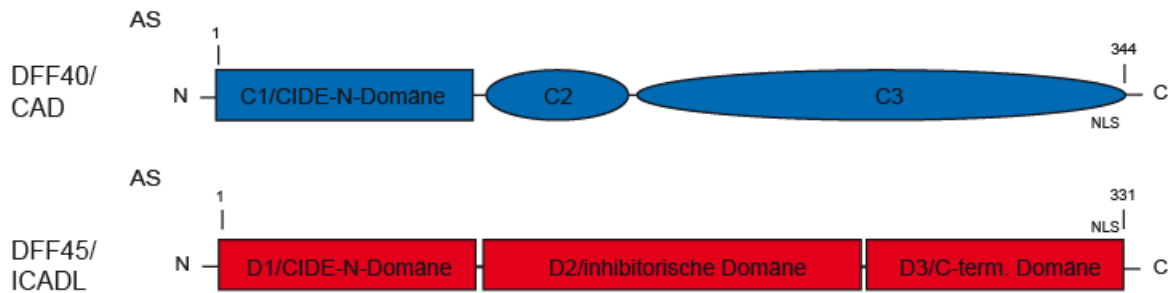


Abbildung 4: Schematische Darstellung des heterodimeren DFF-Komplexes

Der heterodimere DFF-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, DFF40/CAD und DFF45/ICADL. Beide Untereinheiten sind dabei aus drei Domänen zusammengesetzt. Die N-terminalen Domänen von DFF40/CAD und DFF45/ICAD weisen Homologien auf und sind weiter dem N-terminalen Bereich der CIDE-(*cell death inducing DFF like effector*) Proteine sehr ähnlich.

Enzym-Komplex, DFF, aus HeLa-Zellextrakten isoliert und identifiziert⁶⁵. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der DFF-Komplex aus zwei Untereinheiten, einer 40- und einer 45-kDa Untereinheit, besteht. Außerdem erkannte man, dass der DFF-Komplex durch Caspase-3 aktiviert werden kann. 1998 konnten Nagata *et al.* den DFF-Komplex ebenfalls nachweisen^{64, 114}. Hierbei handelte es sich jedoch um das murine Homolog von humanem DFF, so dass die beiden Untereinheiten in ICAD (DFF Untereinheit mit einer Größe von 45 kDa; DFF45) und CAD (DFF Untereinheit mit einer Größe von 40 kDa; DFF40) umbenannt wurden. Die Abkürzung CAD steht hierbei für Caspase-aktivierte DNase und ICAD für Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase. Ebenfalls konnten Nagata *et al.* in diesen Studien zeigen, dass DFF40/CAD die Untereinheit ist, die nukleolytisch aktiv ist. Anfänglich wurde zunächst fälschlicherweise angenommen, dass der DFF Komplex in nicht apoptotischen Zellen ein cytoplasmatischer Protein-Komplex sei, wurde er doch aus der cytoplasmatischen Fraktion von HeLa-Zellen isoliert. Später konnte jedoch demonstriert werden, dass der DFF-Komplex im Kern lokalisiert ist¹¹⁵. Neuere Studien lassen sogar vermuten, dass DFF transient mit Chromatin assoziiert ist und im DNA-gebundenen Zustand aktiviert werden kann¹¹⁶. Für diese Erkenntnis spricht auch, dass sowohl DFF40/CAD, als auch DFF45/ICAD über eine so genannte C-terminale Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear location signal*) verfügen, über die der Transport vom Cytoplasma (Ort der Translation) in den Kern gesteuert wird, und DFF45/ICAD-L ebenfalls im Kern lokalisiert zu sein scheint¹¹⁷⁻¹¹⁹. Während der Translation von DFF assistieren die generellen Chaperone Hcp70 und Hsp40 der korrekten Faltung von DFF¹²⁰. Zur Stöchiometrie des DFF-Komplexes finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Die ursprüngliche Annahme, dass CAD/DFF40 und ICAD/DFF45 einen heterodimeren Komplex bilden, scheint von neueren Erkenntnissen widerlegt zu sein. Diese beschreiben den DFF-Komplex als Dimer „(ICAD/CAD)₂“¹²¹.

1.3.1 Interaktion von CAD und ICAD

Bis *dato* gibt es noch keine kompletten strukturellen Informationen über den DNA Fragmentierungsfaktor DFF. Daher ist es weitestgehend unbekannt, wie die beiden DFF Untereinheiten CAD und ICAD miteinander interagieren. Lediglich für den Komplex der N-terminalen Domäne von CAD und ICAD existiert bisher eine NMR-Struktur¹²². Auf Basis dieser Struktur, aber auch durch Sequenzvergleiche zwischen ICAD und CAD, kann man erkennen, dass die N-terminalen Bereiche beider Proteine starke Homologien zueinander aufweisen. Weiter zeigt

dieser Bereich Homologien zum N-terminalen Bereich der CIDE-(*cell death inducing DFF like effector*) Proteine, weshalb in der Literatur teilweise auch der Begriff CIDE-N-Domäne für die jeweilige N-terminale Domäne von CAD und ICAD verwendet wird¹²³. Die beiden N-terminalen CIDE-N-Domänen von CAD und ICAD haben dabei ein Faltungsmuster, das der Familie der Ubiquitin-Strukturen (*ubiquitin α/β roll superfold*) zugeordnet werden kann^{122, 124}. Anhand der NMR-Struktur von Otomo *et al.*, aber auch durch biochemische Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass Lys12, Lys21 und Lys35 von CAD mit Asp66 and Asp71-74 von ICAD interagieren. Asp66 liegt hierbei im so genannten EDL-loop, einem in der CIDE Protein Familie hochkonservativen Motiv¹²⁵. Zusätzlich kommt es zu einem weiteren wichtigen Kontakt zwischen Phe22 von CAD mit den Seitengruppen von Thr68 und Ile69 von ICAD¹²². Die NMR-Struktur lässt außerdem erkennen, dass die CIDE-N-Domänen aus jeweils einer α -Helix und fünf β -Strängen bestehen. Es wird angenommen, dass die Interaktion der beiden N-terminalen CIDE-N-Domänen von CAD und ICAD die erste Kontaktaufnahme beider Proteine darstellt und schon während der Translation der CAD-Polypeptidkette am Ribosom etabliert wird¹²⁰.

1.3.1.1 Bisherige strukturelle Informationen

Wie bereits beschrieben ist eine NMR-Struktur des N-terminalen Komplexes von CAD und ICAD bisher die einzige strukturelle Information zur Interaktion beider DFF-Untereinheiten im Komplex¹²².

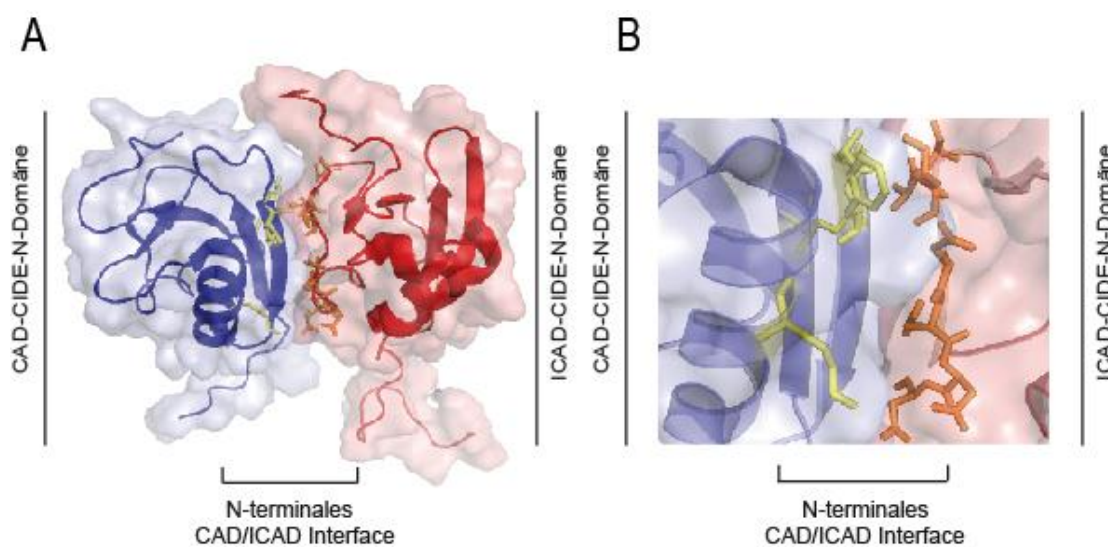


Abbildung 5: N-terminales CAD-ICAD Interface

Gezeigt ist das N-terminale CAD-/CAD Interface. A: Gesamtansicht der beiden CIDE-N-Domänen von CAD (blau) und ICAD (rot) des N-terminalen Komplexes. B: Detailansicht des Komplexes der N-terminalen Domänen von CAD (C1 bzw. CIDE-N; blau) und ICAD (D1 bzw. CIDE-N; rot). Aminosäurereste, die wichtige Kontakte zwischen den beiden Untereinheiten vermitteln, sind gelb (ICAD) bzw. orange (CAD) hervorgehoben. (Abbildung nach¹²²; pdb codes: 1f2r und 1c9f)

Weiter wurde von Woo *et al.* die Kristallstruktur der aktivierten, dimeren Nuklease präsentiert¹²⁶. Jedoch war in diesen Studien die Diffraktion der Proteinkristalle im Bereich der C1-Domäne von CAD zu schwach, so dass strukturelle Informationen lediglich für die C2- und C3-Domäne abgeleitet werden konnten.

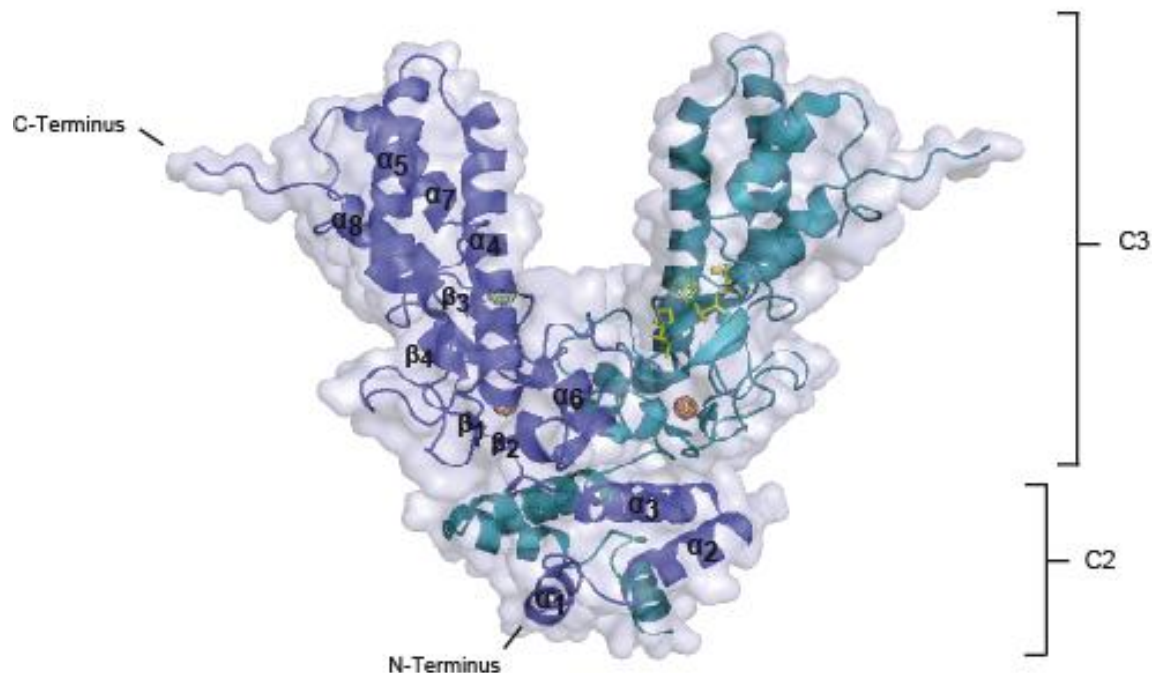


Abbildung 6: Struktur der C2- und C3-Domänen von aktivierter, homodimerer Nuklease CAD

Die Abbildung zeigt die Struktur der C2- und C3-Domäne der aktivierten, homodimeren Nuklease CAD. Die C2-Domäne besteht aus drei α -Helices (α_{1-3}). Die beiden CAD-Untereinheiten wurden verschieden farblich markiert (blau und cyan). Die C3-Domäne enthält das aktive Zentrum ($\beta\alpha$ -Me-Finger Motiv). Die für die Katalyse wichtigen Reste (gelb) sind nur in einer Untereinheit (cyan) dargestellt. Die C3-Domänen der beiden Untereinheiten formen eine tiefe Spalte, in der die DNA gebunden (α_4 -Helix) und gespalten wird. Die beiden C2-Domänen formen ein α -helicales Interface, das wahrscheinlich für die Dimerisierung von CAD entscheidend ist¹²⁶. Die orangefarbene Kugel stellt das für die Struktur von CAD wichtige Zn^{2+} -Ion dar, das für die Katalyse wichtige Mg^{2+} ist grün markiert. (Abbildung nach¹²⁶; pdb code: 1v0d)

Wie die Struktur der C2- und C3-Domäne von aktivierter CAD zeigt, formen die C3-Domänen der beiden CAD Untereinheiten eine Art offene Schere. Diese offene Scherenstruktur ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass das Enzym zwischen kompakter DNA und zu schneidender internukleosomaler DNA unterscheiden kann. Dadurch entsteht die typische Leiter mit DNA Fragmenten von $x=n \cdot \text{ca. } 200 \text{ bp}$ ¹⁵. Außerdem ermöglicht die Struktur die Modellierung eines möglichen DNA-Enzym-Komplexes, da die α_4 -Helix, wie Mutationsstudien zeigen, in der Lage ist DNA zu binden (wahrscheinlich kontaktiert sie hierbei die große Furche der DNA)¹²⁷. Die DNA befindet sich dadurch in der Scherenstruktur, wodurch das aktive Zentrum von CAD optimal für Interaktionen zur kleinen Furche der DNA ausgerichtet ist und Phosphodiesterbindungen angreifen kann. Außerdem konnte anhand der Struktur gezeigt werden, dass die C2-Domänen der beiden CAD Untereinheiten ein Interface ausbilden, das wichtig für die Dimerisierung der aktivierten DNase ist¹²⁶.

Für DFF45 ist zudem die Struktur des C-Terminus verfügbar, die eine lange C-terminale α -Helix (α_4 -Helix, nach¹²⁸) erkennen lässt. Außerdem formt der C-Terminus zwei weitere α -Helices (α_2 und α_3), die durch eine Anzahl hydrophober Aminosäurereste (α_2 -Helix: Leu260, Val263; α_3 -Helix: Leu271, Leu275; α_4 -Helix: Val285, Gln286, Cys289, Leu293) eng an die α_4 -Helix angelagert sind. Eine zusätzliche α -Helix, die α_1 -Helix, ragt aus dieser Struktur heraus¹²⁸.

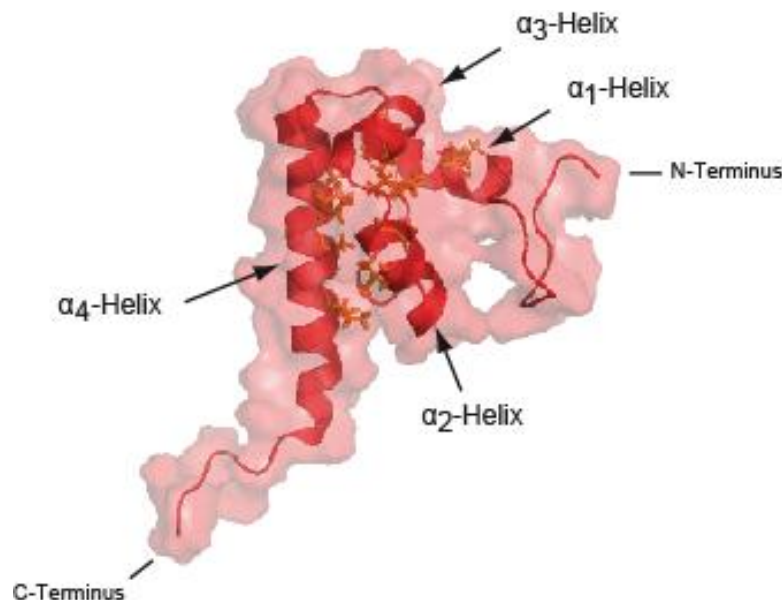


Abbildung 7: Struktur des C-Terminus von DFF45

Die Struktur des C-Terminus (D3-Domäne; rot) von DFF45 umfasst vier α -Helices. Die für die Stabilisierung der Helixstruktur wichtigen hydrophoben Aminosäurereste sind orange dargestellt. (Abbildung nach¹²⁸; pdb code; 1yr)

1.4 Die Caspase-aktivierte DNase (CAD/DFF40)

Die Nuklease CAD (Caspase-aktivierte DNase) ist eine Zucker-spezifische Endonuklease, die um ein Basenpaar versetzte Doppelstrangbrüche in der DNA hervorruft^{64, 99}. Einzelsträngige DNA oder RNA sind keine Substrate für CAD und inhibieren die Spaltaktivität des Enzyms¹²⁹. Gleiches gilt für anionische Polymere wie zum Beispiel Heparin¹²⁹. CAD ist ein basisches Protein, das aus insgesamt 344 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Bisherige strukturelle Informationen zu CAD lassen drei Domänen vermuten. Die N-terminale C1-Domäne ist dabei der D1-Domäne von ICAD homolog. Außer bei CAD und ICAD findet man diese Domäne auch bei den CIDE-Proteinen, wodurch in der Literatur häufig auch der Begriff CIDE-N-Domäne für die N-terminalen Domänen von ICAD und CAD verwendet wird. Interessanterweise stehen die CIDE-Proteine auch in Verbindung mit Apoptose. Die C2-Domäne (Aminosäurereste 86-131) formt, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, drei α -Helices und vermittelt wahrscheinlich die Homodimerisierung/ Homooligomerisierung von CAD Untereinheiten nach ihrer Aktivierung. Die Stöchiometrie von CAD ist in der Literatur unterschiedlich beschrieben, wie man anhand der Kristallstruktur von CAD jedoch sehen kann (Abbildung 6), stellt die kleinste funktionelle Einheit der aktivierten Nuklease ein Dimer dar¹³⁰. Die C3-Domäne (Aminosäurereste 132-328) beinhaltet das aktive Zentrum der Nuklease. Wie bereits erwähnt gehört CAD zur Familie der $\beta\beta\alpha$ -Metall (Me)-Finger Nukleasen⁹¹. Als allgemeine Base fungiert Histidin 263, das ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff aktiviert⁹⁷. Ein zweites Histidin (His308) ist zusammen mit Asp262 an der Koordination des katalytisch wichtigen Mg^{2+} beteiligt⁹⁹. Die Reste His242, Cys229, Cys238 und Cys307 sind wichtig für das Binden des für die Struktur von CAD wichtigen Zn^{2+} -Ions¹²⁶. Im Anschluss an den C-terminalen *loop* der C3-Domäne tritt das C-terminale Ende heraus. Dieses verfügt über die Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear location signal*), die die Bindung von Importin- α vermittelt¹¹⁷. In bisherigen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine mit DNA

präinkubierte Nuklease eine stimulierte Aktivität zeigt und, dass CAD mit Topoisomerase II α , einem Chromatinprotein, das Helix Windungen von doppelsträngiger DNA spalten und auflockern kann, interagiert^{116, 131}. Diese Interaktion stimuliert dabei ebenso die Aktivität von CAD¹³¹. Weiter wurden Interaktionen von CAD mit den Hitzeschockproteinen Hsc70 (*heat-shock cognate protein* 70) und Hsp40 (*heat-shock protein* 40), sowie mit Histon H2A.X (Core-Histon Variante) und HMGB1 (*high-mobility group protein* B1) nachgewiesen^{111, 131-134}. Letztere Interaktion stimuliert dabei, ebenso wie die Interaktion mit Topoisomerase II α , die DNA Spaltung von CAD¹¹¹. Im Gegensatz dazu inhibieren der Komplex aus Ebp1 (Verringert Zellwachstum) und AKT (Unterdrückt Apoptose durch Phosphorylierung von Zielproteinen) sowie der Komplex aus B23-PI3P (Protein B23, Nukleophosmin; PI3P, Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphat, *second messenger*) die Nukleaseaktivität¹³⁵⁻¹³⁷. Bei dem Protein B23 handelt es sich um ein Oncoprotein, das in wachsenden Zellen und Tumorzellen überexprimiert und durch PI3P aktiviert wird. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass CAD die Zelldifferenzierung vorantreibt, indem sie durch gezielte Schnitte die chromosomale Umgebung bestimmter Promotor Regionen modifiziert und so die Gen-Expression verändern kann¹³⁸.

1.5 Der Inhibitor der DNase CAD

Im Gegensatz zu CAD ist der Inhibitor von CAD ein relativ saures nukleocytoplasmatisches Protein. ICAD verfügt über zwei Caspase (Caspase-3, Caspase-7) Spaltstellen, ¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴. Die aus der Spaltung resultierenden drei Fragmente (D1, D2, D3), die eine Größe von 10-15 kDa haben, weisen eine relativ geringe Affinität zur Nuklease auf und dissoziieren von dieser. So haben BIAcore Untersuchungen mit immobilisierter Nuklease DFF40 ergeben, dass die isolierte D1-Domäne einen K_D -Wert von 18 μ M, die isolierte D2-Domäne einen K_D -Wert von 6 μ M und die isolierte D3-Domäne einen K_D -Wert von 14 μ M aufweist¹³⁹. Im Gegensatz dazu wurde für das volle Länge Protein DFF45 ein K_D -Wert im unteren nanomolaren Bereich ermittelt¹³⁹. Da die Fragmentierung von DNA ein effektiver Weg ist um Zellen absterben zu lassen, hat ICAD eine äußerst wichtige Kontrollfunktion in nicht-apoptotischen Zellen inne. Diese Kontrolle findet auf mehreren Ebenen statt. Zum einen verfügt ICAD über eine für die Nuklease essentielle Chaperon-ähnliche Aktivität¹⁴⁰. Zur Herstellung einer potentiell nukleolytisch aktiven Nuklease muss die DNase CAD deshalb mit ihrem Inhibitor zusammen exprimiert werden (die Expression von nur DFF40/CAD führt zu einem inaktiven Enzym)^{64, 115, 141}. Zum anderen gewährleistet erst der Inhibitor den Transport von CAD in den Zellkern, da für diesen Importin- α vermittelten Prozess das Zusammenspiel beider Kernlokalisierungssignale (von CAD und ICAD) notwendig ist^{117, 119, 142}. Sobald der DFF-Komplex im Zellkern lokalisiert ist und sich in räumlicher Nähe zur chromosomalen DNA befindet, zeigt sich nun die inhibitorische Wirkung von ICAD, die eine nukleolytische Aktivität von CAD unterbindet¹¹⁴. Von ICAD existieren zwei Isoformen, eine Kleinere und eine Größere. Sie werden ausgehend von zwei verschiedenen mRNAs translatiert, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die kleinere Isoform, ICAD-S (DFF35), lässt im Vergleich zur größeren Isoform, ICAD-L (DFF45), einen verkürzten C-Terminus erkennen und besteht nicht wie ICAD-L aus 331 Aminosäuren, sondern lediglich aus 265 Aminosäuren. Dabei sind beide Proteine bis zur Aminosäure Glu261 identisch aufgebaut. Bei ICAD-S schließt sich nun C-terminal die Sequenz 262-VGKN-265 an, die kein Kernlokalisierungssignal beinhaltet. Es wird vermutet, dass diese kurze Sequenz die α_2 -Helix (α_2 -Helix nach¹²⁸) komplettiert. Der weitere C-terminale Aufbau von ICAD-L (DFF45) wurde bereits in 1.3.1.1 näher beschrieben. Interessanterweise wirkt eine solche

Verkürzung der C-terminalen Domäne auf die Chaperon-ähnliche Eigenschaft von ICAD, denn ICAD-S verfügt nur noch über eine sehr geringe Chaperon-ähnliche Aktivität¹⁴³.

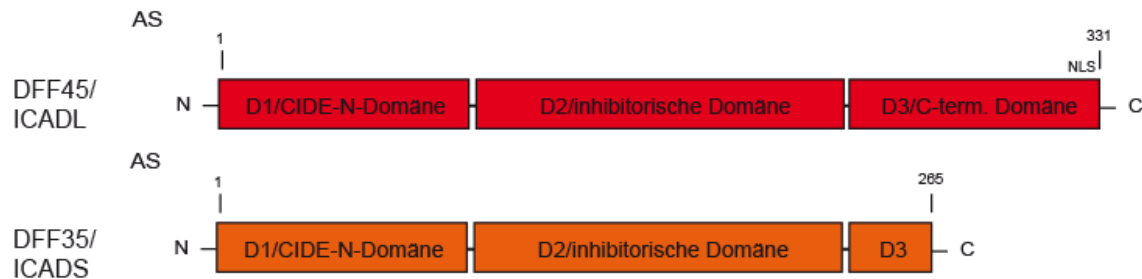


Abbildung 8: Schematische Darstellung der beiden ICAD Isoformen

Gezeigt ist die schematische Illustration der beiden ICAD Isoformen ICAD-S (orange) und ICAD-L (rot). Die Einteilung der Domänen erfolgte nach deren funktionellen Eigenschaften. Die beiden Isoformen werden ausgehend von zwei verschiedenen mRNAs translatiert, die durch alternatives Spleißen entstehen. ICAD-S verfügt über einen verkürzten C-Terminus.

Eine weitere sehr interessante Beobachtung bezüglich der Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD konnten Xiao *et al.* machen¹⁴⁴. In diesen Untersuchungen wurden die Caspase Spaltstellen von ICAD durch TEV-Protease Spaltstellen substituiert, was zur Folge hatte, dass die Nuklease keinerlei Spaltaktivität mehr erkennen ließ. In diesen Experimenten wurde ICAD entsprechend mit TEV-Protease inkubiert und so erfolgreich von CAD abgespalten. Xiao *et al.* schlossen daraus auf eine Beteiligung der Caspase Spaltstellen an der Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD¹⁴⁴. Eine Beteiligung weiterer Region an der Faltungshelferaktivität von ICAD, neben dem C-Terminus, könnte die residuelle Faltungshelferaktivität von ICAD-S erklären. Da ICAD-S über kein Kernlokalisierungssignal verfügt, ist es im Cytoplasma zu finden^{64, 119}. Dementsprechend ist auch der Komplex aus ICAD-S/DFF35 und CAD/DFF40 cytoplasmatisch¹⁴³. Generell stellt sich die Frage warum es eine zweite Isoform des Inhibitors gibt. Diskutiert wird diese Frage von Gu *et al.*, die in ICAD-S hauptsächlich eine Art *back-up* System sehen, das als Alternative zu ICAD-L die Nuklease CAD inhibieren und kontrollieren kann¹⁴⁵. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verteilung von ICAD-S und ICAD-L in bestimmten Organen und Geweben sehr unterschiedlich ist. So konnte im menschlichen Gehirn, aber auch in anderen Organen der Ratte, exklusiv nur ICAD-S nachgewiesen werden¹⁴⁶. Eventuell wird in diesen Geweben/Organen die geringere Faltungshelferaktivität von ICAD-S durch andere „Helferproteine“ kompensiert. Die Beobachtungen zeigen jedoch, dass die Funktion von ICAD-S nicht einzig als *back-up* verstanden werden kann. Im Zuge der Untersuchungen zur Faltung und Aktivität von CAD wurde weiter festgestellt, dass Hsc70 und Hsp40 denaturierte CAD zwar wieder rückfalten können, jedoch keine enzymatische Aktivität wieder herstellen konnten. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass ICAD alleine zwar die Aggregation von CAD nicht verhindern konnte, im Zusammenspiel mit Hsc70 und Hsp40 konnte CAD jedoch rückgefaltet und außerdem wieder enzymatisch aktiv werden¹²⁰. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass ICAD CAD erst erkennt, sobald sich dieses schon in einem fast-nativen Zustand befindet und im Anschluss eine Art „*fine-tuning*“ durchführt, die CAD eine katalytische Aktivität gewährleistet¹²⁰. Eine Einteilung von ICAD in Domänen ist zum einen über die bereits erwähnten Caspase Spaltstellen möglich. Durch diese Einteilung ergeben sich drei Domänen, die den ICAD Fragmenten nach Caspase-3/7 Spaltung entsprechen (D1, D2, D3). Eine weitere Möglichkeit stellt die Einteilung nach funktionellen Eigenschaften dar. Auch hier würde sich eine Unterteilung in drei Domänen anbieten, ist doch bekannt, dass die N-terminale Domäne (AS 1-85) der Bindung von CAD dient, die C-terminale Domäne (AS 239-331) eine Chaperon-ähnliche

Aktivität aufweist und der mittlere Abschnitt mit der Inhibition von CAD in Verbindung gebracht wird^{122, 147, 148}.

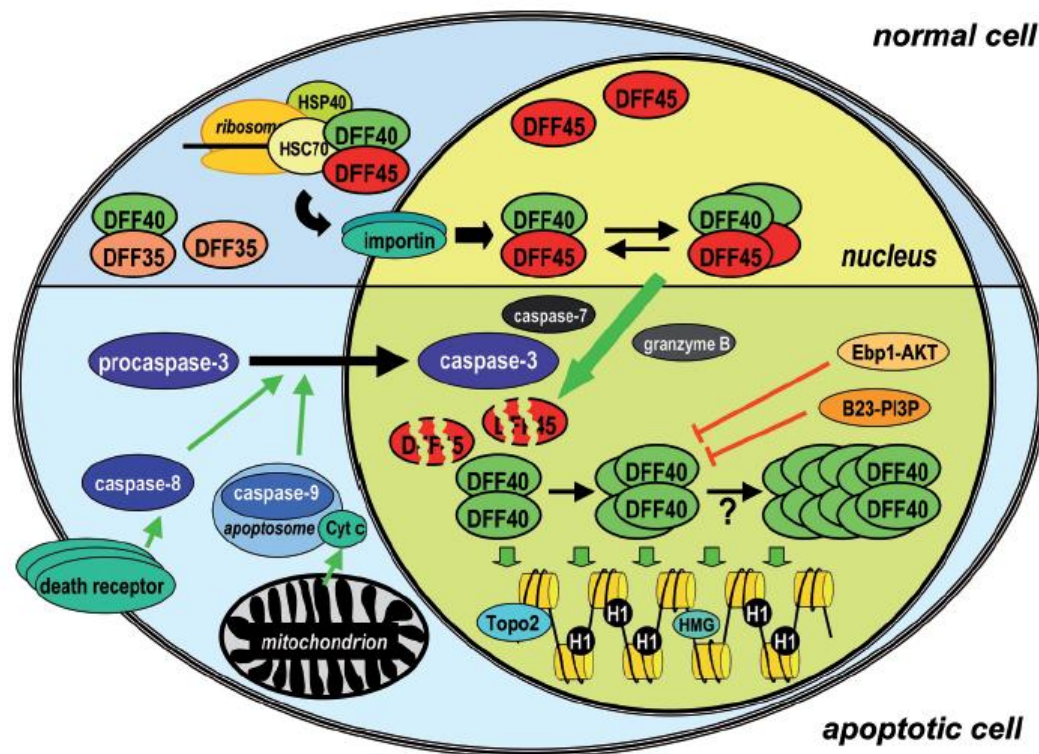


Abbildung 9: Darstellung des DFF Lebenszyklus

Gezeigt ist eine Übersicht des DFF Lebenszyklus. Die Struktur und Stöchiometrie der Untereinheiten von DFF sowie deren intrazelluläre Lokalisation in "normalen" und apoptotischen Zellen (jeweils über und unter der horizontalen Linie) sind schematisch dargestellt. Illustriert sind ebenfalls die Interaktionspartner des DFF-Komplexes. Die aktivierte Nuklease CAD/DFF40 wird vom Komplex Ebp1-AKT und B23-PI3P gehemmt^{135, 136}. Interaktionen mit Topoisomerase II α und HMGB1 hingegen stimulieren die Aktivität der Nuklease. Die Aktivierung erfolgt durch apoptotische Stimuli. Quelle:¹³⁰.

1.6 Die Inhibition von Nukleasen

Die Kontrolle potentiell toxischer Proteine, wie es z.B. Nukleasen sind, ist eine für den Wirtsorganismus überlebenswichtige Aufgabe. So haben Bakterien im Laufe der Evolution ausgeklügelte Mechanismen entwickelt, um sich dagegen zu schützen und diese Enzyme gezielt einsetzen zu können. Die Aktivität mancher Nukleasen, wie zum Beispiel die der *Serratia* Nuklease aus *Serratia marcescens*, wird durch die Ausbildung von Disulfidbrücken reguliert¹⁴⁹. Aufgrund des reduzierenden Milieus in der Zelle entstehen diese nur nach der Sekretion, im Zellinneren ist die Nuklease somit inaktiv. In anderen Fällen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, hat die Natur hochspezifische Proteine entwickelt, die die Aktivität der Nukleasen inhibieren. Dabei verwenden solche proteinogenen Inhibitoren, zu denen zum Beispiel Im7, NuiA und EndoGI gehören, zum Teil grundverschiedene Strategien. Der Inhibitor Im7 (*immunity protein 7*) hemmt das *E. coli* Toxin Colicin E7 beispielsweise über einen so genannten *exosite* Mechanismus¹⁵⁰. Hierbei

kontaktiert das relativ saure Protein Im7 die Nuklease Colicin E7 hauptsächlich in einer bestimmten basischen Region, die sich weit entfernt vom aktiven Zentrum befindet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Im7 keinen allosterischen Effekt induziert¹⁵¹. Interessanterweise bindet Colicin E7 (ColE7) in der Nähe dieser Region auch die zu spaltende Substrat-DNA. Dies lässt vermuten, dass der Im7-Inhibitor die Endonuklease ColE7 hemmt, indem er das elektrostatische Umfeld der DNA Binderegion so verändert, dass die negativ geladene Substrat-DNA abgestoßen wird. Der Komplex aus ColE7 und Im7 ist folglich nicht in der Lage DNA

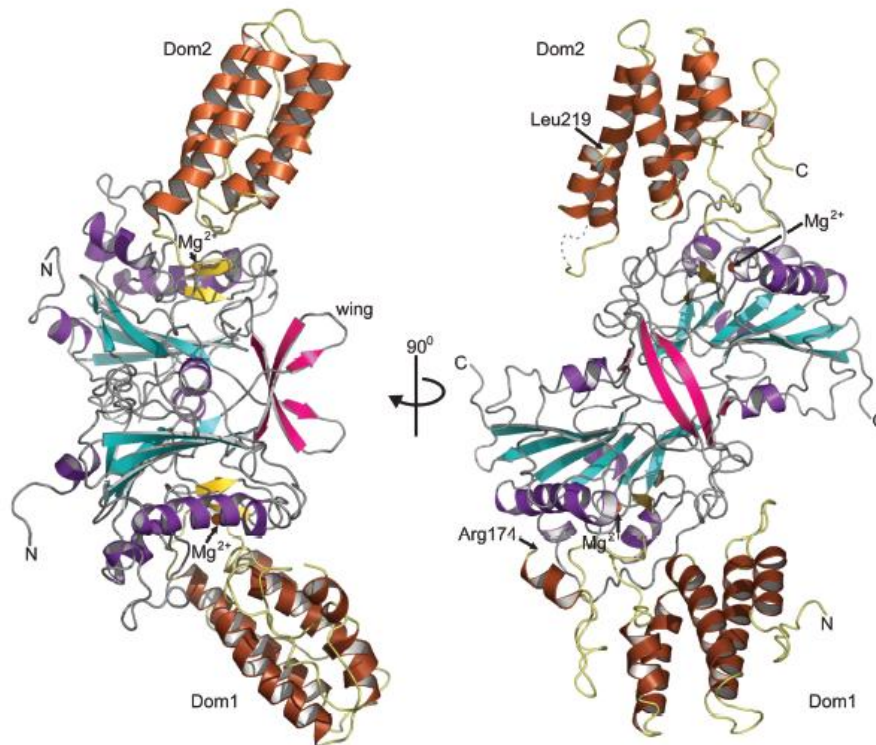


Abbildung 10: Gesamtstruktur des dEndoG/dEndoGI-Komplexes

Der erste Abschnitt (links im Bild) zeigt den dEndoG/dEndoGI Komplex. Die α -Helices von dEndoG sind in lila, die β -Stränge des zentralen β -Faltblatts in cyan dargestellt. Die beiden β -Stränge, die an der Metallionbindung beteiligt sind, sind gelb hervorgehoben. Das gebundene Metallion ist als orangefarbene Kugel illustriert. Die Domäne 1 (Dom1) und Domäne 2 (Dom2) von EndoGI (braun dargestellt) umspannen das dEndoG Dimer. Die *linker*-Struktur, die die beiden EndoGI Domänen verbindet, würde beim Arg174 der Dom1 beginnen und die Polypeptidkette mit Leu219 der Dom2 verbinden. Der zweite Abschnitt (rechts im Bild) entspricht Abschnitt 1, jedoch wurde die Darstellung um 90°C gedreht. Quelle¹⁵⁷

zu binden¹⁵². Der Inhibitor NuiA hingegen komplexiert in der Zelle mit Nuklease A (NucA), einer unspezifischen Endonuklease aus *Anabaena* sp. und kontrolliert so die Aktivität von NucA^{153, 154}. Dabei zeigt die NucA-NuiA Kristallstruktur, dass NuiA direkt mit dem katalytisch wichtigen Metallion Mg^{2+} und Aminosäureresten des aktiven Zentrums von NucA interagiert¹⁵⁵. EndoGI besteht aus zwei sehr ähnlichen Domänen, die über eine Polypeptidkette miteinander verbunden sind. Dabei bindet ein EndoGI Molekül zwei EndoG Moleküle¹⁵⁶. Wie anhand der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 10), inhibiert EndoGI die mitochondriale Nuklease EndoG in zweierlei Hinsicht. Zum einen wird durch den Inhibitor das aktive Zentrum von EndoG blockiert und zum anderen wird im Komplex aus EndoGI und EndoG die Oligonukleotid Bindung gehemmt¹⁵⁷.

1.7 Hochspezifische Nukleasen in der Gentherapie

Hochspezifische Nukleasen, zu denen die so genannten *homing*-Endonukleasen gehören, erkennen sehr spezifisch DNA-Sequenzen und können so präzise Schnitte im Genom vollziehen. In Verbindung mit der Gentherapie, bei der defekte Gene durch gesunde Gene in der Zelle eines Individuums über homologe Rekombination ersetzt werden, um Erbkrankheiten oder Gendefekte zu behandeln, könnten diese Nukleasen ein nützliches Werkzeug sein, da ein spezifischer Doppelstrangbruch die homologe Rekombination um mehrere Größenordnungen stimuliert. Neben den natürlichen hochspezifischen Nukleasen werden zurzeit auch maßgeschneiderte hochspezifische Nukleasen entwickelt. Als Beispiel wären hier die Zinkfinger-nukleasen (ZFN) zu nennen, die aus einer katalytischen Domäne (z.B. der Spaltdomäne von FokI) und einer hochspezifischen DNA-Bindedomäne (Zinkfingerprotein) zusammen gesetzt sind¹⁵⁸. Sobald zwei ZFN-Monomere in räumlicher Nähe und richtiger Orientierung an die DNA binden, können die beiden FokI-Untereinheiten dimerisieren und katalytisch aktiv werden (die aktive Form von FokI ist ein Dimer)¹⁵⁹. Als problematisch erwies sich bisher bei diesen maßgeschneiderten hochspezifischen Nukleasen jedoch das so genannte *off-site cleavage*, also das Spalten von nicht adressierter DNA, aufgrund eines unkontrollierten Dimerisierens der FokI-Untereinheiten¹⁵⁸. Eine solche unkontrollierte DNA Spaltung ist für die Zelle hochtoxisch¹⁶⁰.

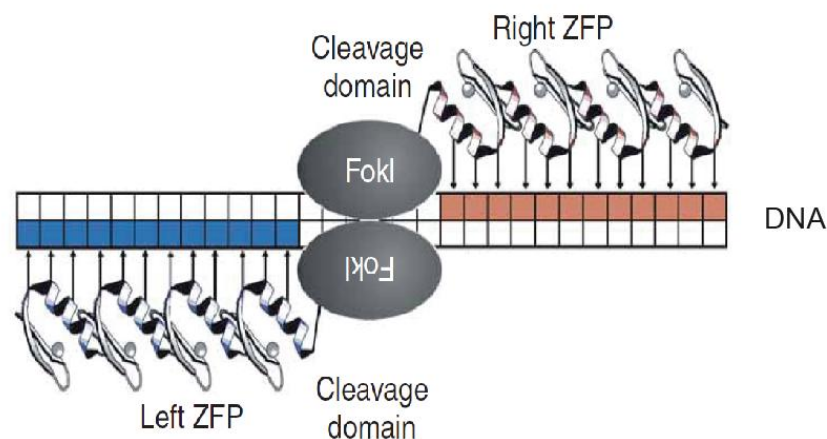


Abbildung 11: DNA Erkennung und Spaltung einer Zinkfinger-Nuklease

Gezeigt ist die Skizze einer Zinkfinger-Nuklease, die an die Ziel-DNA gebunden ist. Jede ZFN besteht aus der katalytischen Domäne (*cleavage domain*) von FokI, die an ein Zink-Fingerprotein (ZFP) gebunden ist. Die Zink-Fingerproteine erkennen jeweils spezifisch die linke oder rechte DNA-Sequenz (blaue und rote Felder). Sobald beide Zink-Fingerproteine an die DNA gebunden sind, können die FokI Domänen dimerisieren und die DNA spalten. Abbildung nach ¹⁵⁸.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Wechselwirkungen der beiden Protein-Untereinheiten des DFF-Komplexes, CAD und ICAD, näher biochemisch analysiert werden. Im primären Fokus stand hierbei der Mechanismus der Inhibition der Caspase-aktivierten DNase durch ihren Inhibitor ICAD. Da bis *dato* noch keine komplette Struktur des DFF-Komplexes verfügbar ist, sollten mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen unter anderem auf Basis der SPOT (*peptide array*) Methode untersucht werden. In anderen Ansätzen, zum Teil ausgehend von den Ergebnissen der SPOT Methode, sollte in so genannten Inhibitionsversuchen überprüft werden, ob mutierte ICAD Proteine noch in der Lage sind, die Nuklease CAD zu inhibieren. Weiter sollten ICAD-abgeleitete Peptide synthetisiert werden, um zu ermitteln, ob diese eine inhibitorische Wirkung entfalten. Neuere Erkenntnisse legen dar, dass die Chaperon-ähnliche Aktivität von ICAD nicht nur von dessen C-terminaler Domäne vermittelt wird. Daher sollte im Zuge der biochemischen Charakterisierung der Wechselwirkungen von CAD und ICAD auch überprüft werden, inwiefern Mutationen, die außerhalb der C-terminalen Domäne von ICAD liegen, einen Einfluss auf die korrekte Faltung der Nuklease CAD haben. Weiter sollte das bereits in der Arbeitsgruppe laufende Projekt der Kristallisation des DFF-Komplexes bzw. der DFF-Untereinheiten fortgeführt werden und durch neue Expressionssysteme und Techniken ausgedehnt werden.

Da die bisher in der Literatur beschriebenen maßgeschneiderten hochspezifischen Nukleasen, wie z.B. die Zinkfingernukleasen eine hohe Zytotoxizität aufweisen, bestand ein weiteres, jedoch untergeordnetes, Teilprojekt darin, die unspezifische DNase CAD an die hochspezifische,

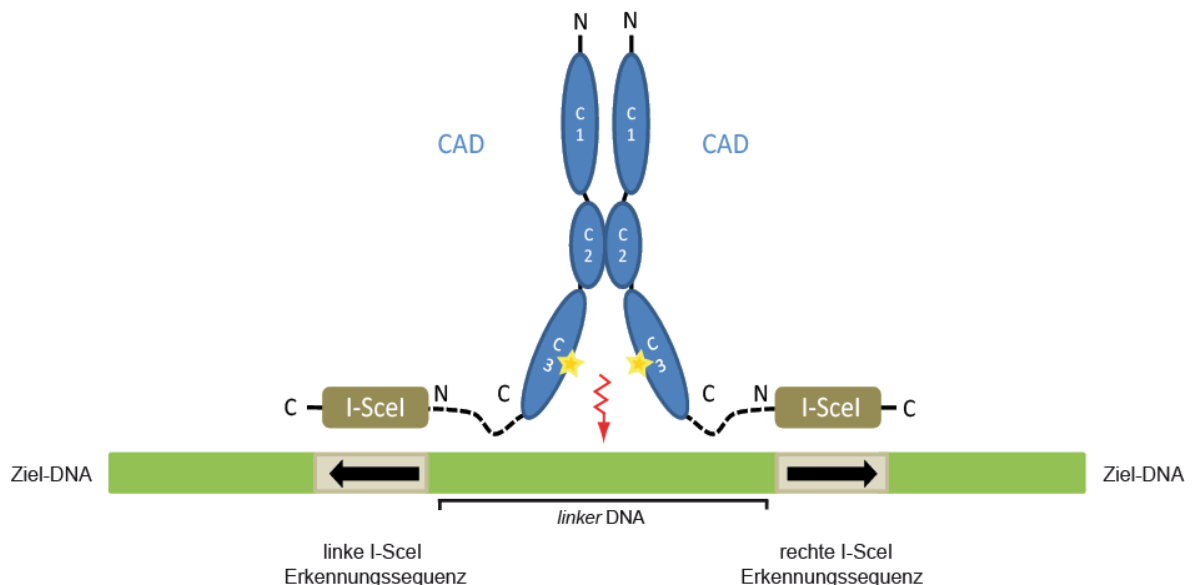


Abbildung 12: Schematische Illustration des Fusionsproteins CAD-I-SceI

Dargestellt ist das dimerisierte Fusionsprotein CAD-I-SceI (CAD, blau; I-SceI, braun) gebunden an I-SceI spezifische DNA. Die Ziel-DNA verfügte über zwei I-SceI Erkennungssequenzen (linke und rechte Erkennungssequenz; die Orientierung der Erkennungssequenzen ist mit einem Pfeil markiert), die durch eine *linker*-DNA Sequenz voneinander getrennt sind. Die aktiven Zentren von CAD sind jeweils mit einem gelben Stern illustriert. Die proteingene *linker*-Region (AS-Sequenz: GGGGS) zwischen CAD (blau) und I-SceI (braun) ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die spezifische Spaltung eines solchen Substrats sollte zwischen den beiden I-SceI Erkennungssequenzen erfolgen (roter Pfeil).

monomere *homing*-Endonuklease I-SceI zu fusionieren¹⁶¹. Ähnlich wie bei den Zinkfingernukleasen sollte hierbei CAD den Part der DNA Spaltung übernehmen (entspricht der Funktion von FokI) und I-SceI als hochspezifisches DNA-Bindeprotein (18 bp Erkennungssequenz) eingesetzt werden (entspricht der Funktion des Zinkfinger Proteins)¹⁶². Aus diesem Grund sollte eine CAD Variante verwendet werden, die kaum noch in der Lage ist DNA zu binden (CAD R250A) und eine I-SceI Variante eingesetzt werden, die keine katalytische Aktivität mehr zeigt (I-SceI D44S). Nach dem Herstellen des Fusionproteins sollte zunächst überprüft werden, ob eine stabile Expression möglich ist. Anschließend sollte experimentell bestimmt werden, ob das Fusionskonstrukt in der Lage ist, DNA spezifisch zu binden. Weiter sollte analysiert werden, ob das Protein CAD-I-SceI DNA spezifisch spalten kann. Dazu sollte eine Substrat-DNA hergestellt werden, die über zwei I-SceI Erkennungssequenzen verfügt, um so, wie im Falle der Zinkfingernukleasen, ein Dimerisieren der beiden Monomere in räumlicher Nähe zur DNA, nach Aktivierung von CAD, zu gewährleisten. Ein solches Fusionsprotein könnte später als Werkzeug in der Gentherapie eingesetzt werden. Gerade im Hinblick auf das Problem der Zytotoxizität bisheriger maßgeschneiderter, hochspezifischer Nukleasen könnte ein Vorteil von CAD als katalytische Einheit sein, dass diese DNase über ihren Inhibitor kontrolliert werden kann. Außerdem ist CAD, im Gegensatz zu FokI, einer Nuklease aus dem *Flavobacterium okeanoikoites*, ein Enzym, das natürlicherweise chromosomale DNA als Substrat spaltet.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Die in der folgenden Liste alphabetisch aufgeführten Geräte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet. Standardgeräte eines biochemischen Labors, wie zum Beispiel Pipetten oder Vortexer wurden nicht aufgelistet.

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav	Tecnomara/Integra Biosciences
BioDocAnalyse	Biometra
Biosys™ 2000 Series-HPLC-System	Beckman
Blotter Blue Flash Semi-dry	Serva
Brutschrank	Mommsen
Centrifugal Filter Units	Millipore
Electrophoresis Power Supply-EPS 3500	Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammer, horizontal	Biometra, Serva
Elektrophoresekammer, vertikal	Owl
Elektroporationsküvetten	Peqlab
Elektroporator Easyject	EquiBio
Fluoromax-4	Horiba Jobin-Yvon
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Applied Biosystems
Heizblock	Techne
HiTrap Phenyl Sepharose FF Säule	GE Healthcare
HiTrap™ Heparin Säule	GE Healthcare
HPLC-Gerät ÄKTA purifier	GE Healthcare
Innova 40 Luftschüttler	New Brunswick Scientific
Innova 4000 Luftschüttler	New Brunswick Scientific
Instant Imager	Canberra-Packard
J-710 Spektropolarimeter	Jasco
Kühlzentrifuge J2-HS Centrifuge	Beckman
Kühlzentrifuge J6-HC Centrifuge	Beckman
Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR	Canberra-Packard
Magnetrührer REO	Janke & Kunzel/Ikamak
MonoQ-HR 5.5 Säule	Pharmacia
ND-1000 Spectrophotometer Nano Drop	PeqLab
pH-Messelektrode N6280	Schott
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Seralpur PRO 90 CN-Reinstwasseranlage	Seral
Sonifier 250	Branson

Spectrophotometer U-3000	Hitachi
Sterilbank Bio 48	Faster
Superdex 200 10/300 GE Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
The Belly-Dancer	Stovall, Life Science Inc.
Thermal Cycler T-personal	Whatman Biometra
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf
Tischzentrifuge MiniSpin	Eppendorf
Tischzentrifuge Sorvall MC122V	Du Pont
Vakuumbzentrifuge Hetovac VR-1	HETO

2.1.2 Chemikalien

Im Folgenden werden, die während dieser Arbeit verwendeten, Chemikalien alphabetisch aufgelistet. Die Chemikalien besaßen den Reinigungsgrad *pro analysi* (p.a.).

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
2-Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid 40% Mix 1:29	AppliChem
Agar	AppliChem
Agarose	Eurogentec
Aluminiumsulfat Hydrat	AppliChem
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA	Sigma
Caspase Inhibitor	Sigma
Chaps	AppliChem
Chloramphenicol	AppliChem
Coomassie [®] Brilliant blue G250	AppliChem
D-Desthiobiotin	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
DMSO	Merck
dNTP Set	Fermentas
DTT	AppliChem
EDTA	AppliChem
EGTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidium Bromid	Roth
Glutathion (reduziert)	Merck
Glutathion Sepharose	Amersham Bioscience
Glycerin	AppliChem
Glycin	Merck

Hefeextrakt	AppliChem
HEPES	AppliChem
Imidazol	Merck
IPTG	AppliChem
Kaliumacetat	AppliChem
Kanamycinsulfat	AppliChem
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
MES-Monohydrat	AppliChem
Methanol	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
Ortho-Phosphorsäure	Roth
PMSF	AppliChem
Polyethylenglycol	Merck
Salzsäure	Merck
SDS	Roth
TEMED	Merck
Tetracyclin-Hydrochlorid	AppliChem
Tris	AppliChem
Triton X100	Merck
Trypton	AppliChem
Tween 20	Merck

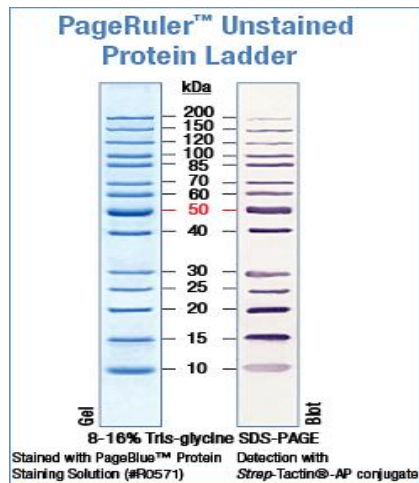
2.1.3 Radiochemikalien

[α -³²P]-dATP wurde von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen.

2.1.4 Größenstandards

2.1.4.1 Protein Größenstandards

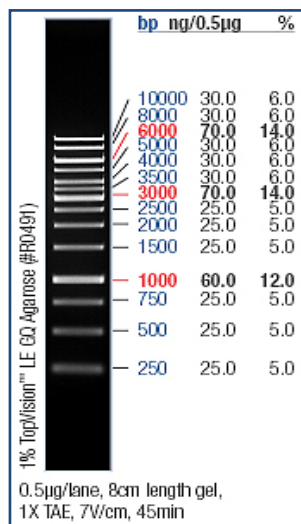
Page Ruler™ Unstained Protein Ladder:



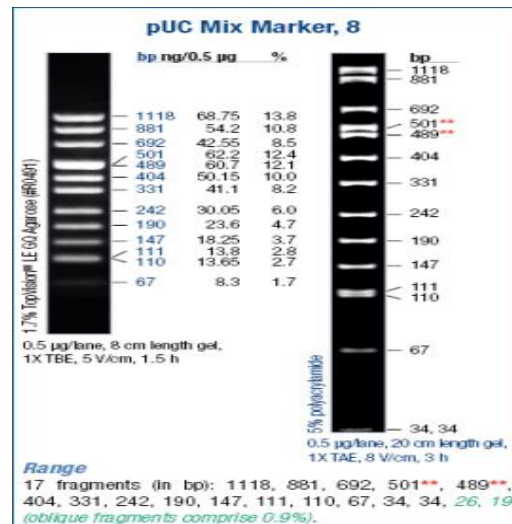
(Quelle: Fermentas)

2.1.4.2 DNA Größenstandards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas):



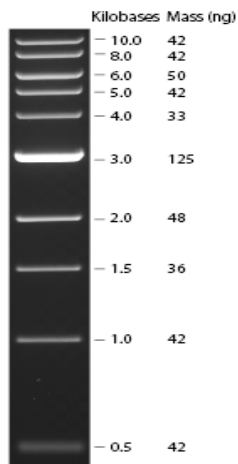
pUC Mix Marker, 8 (Fermentas):



(Quelle: Fermentas)

Neben den Standards der Firma Fermentas wurde teilweise auch der 1 kb DNA Standard der Firma NEB verwendet:

1 kb DNA ladder (NEB):



(Quelle: NEB)

2.1.5 Enzyme

2.1.5.1 Restriktionsenzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
AgeI	Fermentas	5`...A↓CCGGT...3`
Bfal	NEB	5`...C↓TAG...3`
BglI	Fermentas	5`...GCCNNNN↓NGGC...3`
BglII	Fermentas	5`...A↓GATCT...3`
BlnI	Fermentas	5`...GC↓TNAGC...3`
BoxI	Fermentas	5`...GACNN↓NNG...3`TC
DpnI	Fermentas	5`...GA ^{CH3} ↓TC...3`
EagI	Fermentas	5`...C↓GGCCG...3`
EheI	Fermentas	5`...GGC↓GCC...3`
FastDigest™ BamHI	Fermentas	5`...G↓GATCC...3`
FastDigest™ Sall	Fermentas	5`...G↓TCGAC...3`
MfeI	Fermentas	5`...C↓AATTG...3`
NcoI	Fermentas	5`...C↓CATGG...3`
NheI	Fermentas	5`...G↓CTAGC...3`
NotI	NEB	5`...GC↓GGCCGC...3`
RsaI	Fermentas	5`...GT↓AC...3`
Sall	Fermentas	5`...G↓TCGAC...3`
XhoI	NEB	5`...C↓TCGAG...3`
XmaI	Fermentas	5`...C↓CCGGG...3`

Für die Restriktionsverdau-Ansätze wurden, den Anweisungen der Hersteller entsprechend, die empfohlenen Puffer verwendet. Die jeweilige Schnittstelle der Restriktionsenzyme innerhalb der

Erkennungssequenz wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Methylierung einer Base in der Erkennungssequenz wurde mit einem hochgestellten CH₃ angedeutet.

2.1.5.2 Proteasen und DNA-modifizierende Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>
Caspase-3	Eigenherstellung
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Eigenherstellung
T4 DNA Ligase	Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Eigenherstellung
TEV-Protease	MoBiTec
Thrombin	GE Healthcare

2.1.5.3 *Homing*-Endonukleasen

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
I-SceI (D44S)	Eigenherstellung	5'...TAGGGATAA↓CAGGGTAAT...3' 3'...ATCCC↓TATTGTCCCATTA...5'

2.1.6 Oligonukleotide

Folgende alphabetisch geordnete Oligonukleotide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einbringen von Mutationen oder zwecks *screening* verwendet:

Name	Sequenz
3'ICAD-L	ACTGAGGGCAGCTTTGGACTC
3'ICADS (NotI)	GCGGCGGCCGCTAGTTCTTGCCACCTCCAAATCC
3'ICADS_Ende_XmaI	GAACCCGGGCTAGTTCTTGCCACCTCCAAATCCTGACTAGAT AAACT
3' shift CAD-ISceI	CGAAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG
3'ICADL (BglII)	AGAAGATCTCTACGAGGAGTCTCGTTTG
3'ICADL_rbs_EheI	GCGGCGCCTTCTAGATCTCTACGAGGAGTCTCGTTTG
3'ISceI (linker_AgeI_NheI_SalI_NotI)	GCGGCGGCCGCGTACGCTAGCACCAGTTGAACCACCACC ACCTTTCAGGAAAGTTTCGGAGGAGATAGT
3'ISceI(AgeI_NheI_SalI_NotI)	GCGGCGGCCGCGTACGCTAGCACCAGTTGAACCACCACC ACCGTAGCTTTCAGGAAAGTTTCGGAGGAGATAGT

3'ISceI_NotI	GTAGCGGCCGCTTTTCAGGAAAGTTTCGGAGGAGATAGT
3'mCAD CadSce (AgeI_NheI_Sall_NotI)	GCGGCGGCCGCGTTCGACGCTAGCACCGGTTGAACCACCACC ACCGCTAGCGCGCTTCCGAGCAGGGCGCTTCTT
3'mCAD(Sall)	GTCGTCGACCTAGCGCTTCCGAGCAGGGCG
5'ICAD 143EED145 to 143AAA145 (NotI)	ATCCTGCTGTCAGCGGCCGCCCTCCAAGCGCTC
5'ICAD D145R (BplI)	ATCATCCTGCTGAGCGAAGAGCGGCTCCAAGCGCTC
5'ICAD E143R (BplI)	ATCATCCTGCTGAGCCGGGAGGACCTCCAA
5'ICAD HisTag (NcoI)	CCACCATGGAACATCATCATCACCATCACGGATCCGATTAC
5'shift Cad-ISceI	GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGA
5'ICAD-NcoI	CCACCATGGAGCTGTGCGGGGA
Caspase TEV Insert (BamHI)	GATGAGCCGGACGAAAACCTGTATTTTCAGAGCGGATCCAGG GCAGGG
Caspase TEV Insert 2nd site (RsaI)	GATGCAGTTGACGAAAACCTGTACTTTTCAGAGCGGCACAGGC GTCGGC
chaperon 1.1 DtoA (EagI)	TTTGAGGCGGCCGAGCCGGAC
chaperon 1.2 EtoA (RsaI)	GCAGATGCCCCGGACGAAAACCTGTACTTTTCAGAGC
chaperon 1.3 PtoA (BglI)	GCCGATGAGGCCGACGAAAAC
chaperon 1.4 DtoA (RsaI)	GAGCCGGCCGAAAACCTGTACTTTTCAGAGCGGA
chaperon 2.1 DtoA (Sall)	GAAGAGCTGGCCGCAGTCGACGAAAACCTG
chaperon 2.3 VtoA (EagI)	CTGGATGCGGCCGACGAAAACCTG
chaperon 2.4 D to A (BoxI)	GATGCAGTTGCCGAAAACCTGTACTTTTCAGAGCGGGACAGGC GTCGGCAGAGAG
Fd-term-rev	TCTCCAAAAAAAAAAGCTCCA
ICAD E193R (MfeI)	CGCCAGTCCAAGCAATTGCTGCGACTTTACCTCCAG
ICAD Q190A (XbaI)	CCGCCAGTCCAAGGCACTTCTAGAACTTTACCTC
ICAD Q190P (BcgI)	AGCCCGCCAGTCGAAGCCACTGCTGGAACCTTTAC
ICAD Y195A (BglI)	CTCCTGGAACCTGCCCTCCAGGCCTTG
ICAD Y195P (XhoI)	CAAGCAGCTCCTCGAGCTTCCACTCCAGGCCTTG
ICADfor	CCACCATGGAGCTGTGCGGGGA
ICADrev	GTCGTCGACTTATCGCTGTGGTTCCCCAGG
ICADS Ende rev	CAACAATTGGTCGACGCGGCCGCTAGTTCTTGCCACCTCC AAATCCTGACTAGATAAACT
IR17down	AGAAGATCTCTAATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTAG AGCTCCAGCTTTTGTCCCT
IR17up	AGAAGATCTAGCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTACTCGG TACCCAATTCGCCCTATAG
IR23down	GCTGCTAGCCCTCTTAATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACT AGAGCTCCAGCTTTTGTCCCT
IR23up	GCTGCTAGCCCAGTTTAATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAC CAGGTACCCAATTCGCCCTATAG

long pBSKAfIII	ACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTC
long pBSKNael	GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAG
omp 3'	CGCAGTAGCGGTAAACGGCAG
omp 5'	GAGTTATTTTACCACTCCCTATCAG
pGEX2Tfor	CATCCTCCAAAATCGGAT
pGEX2Trev	GGTTTTACCGTCATCAC
PL_for	CCCCCGGGCTCACTTTCTGGCTGGAT
gelabeltes Oligonukleotid	5' 6Fam-CAAGATATCCAGCTGCCCCCCCCCAGCTGGATATCT TG 3'BHQ

2.1.7 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendungszweck</i>
<i>Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System</i>	<i>Promega</i>	<i>Isolation von high-quality Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (aus einer 3 ml E. coli Kultur)</i>
<i>Pure Yield™ Plasmid Midiprep System</i>	<i>Promega</i>	<i>Isolation von high-quality Plasmid-DNA im mittleren bis großen Maßstab (aus einer 250 ml E. coli Kultur)</i>
<i>Pure Yield™ Plasmid Maxiprep System</i>	<i>Promega</i>	<i>Isolation von high-quality Plasmid-DNA im großen Maßstab (aus einer 500 ml E. coli Kultur)</i>
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	<i>Promega</i>	<i>Reinigung von PCR-, Ligations- und Spaltansätzen</i>
<i>Z-competent E. coli Transformation Kit & Buffer Set</i>	<i>Zymo Research</i>	<i>Erstellen von Z-kompetenten Zellen</i>

2.1.8 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-GST Antikörper	Pharmacia Biotech
anti-goat Antikörper (<i>horseradish peroxidase conjugated</i>)	Boehringer Mannheim
Anti-FLAG® (<i>horseradish peroxidase conjugated</i>)	Sigma

2.1.9 Fluorophore

Fluorophor	Eigenschaften
5'-terminaler 6-FAM (6-Carboxyfluorescein)	Absorptionswellenlänge von 495 nm und eine Emissionswellenlänge von 517 nm
3'-terminaler BHQ-1 (Black Hole Quencher)	BHQ-1 ist ein sehr effizienter <i>Dark Quencher</i> für <i>Molecular Beacons</i> und FRET Sonden mit einer exzellenten spektralen Abdeckung aller Farbstoffe im grünen bis dunkel-gelben Emissionsbereich. <i>Quenching</i> Bereich: 480-580 nm

2.2 Mikrobiologisches Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getätigt wurden, wurden unter einer sterilen Werkbank, in einer keimfreien Umgebung durchgeführt. Es wurden außerdem keimfreie Geräte verwendet, die in einem gasdichten Druckbehälter (Autoklav) unter hohem Druck erhitzt (121°C, 2.5 bar) wurden. Die verwendeten Bakterienstämme waren hierbei verschiedene Stämme des Enterobakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*).

2.2.1 Nährmedium zur Anzucht von *E. coli* Stämmen

Die verschiedenen *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium (*lysogeny broth*) angezogen. LB-Medium setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

LB-Medium:

10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7.5 durch Titration von NaOH, durch Zugabe von H₂O auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter auffüllen

Damit ist LB-Medium ein vollwertiges Nährmedium für Bakterien. Für die Herstellung von Festmedien in Petrischalen wurde das ansonsten flüssige LB-Vollmedium erwärmt, mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar versetzt und dann in Petrischalen gegeben. Nach dem Abkühlen und Festwerden wurden die Petrischalen bei 4°C im Kühlraum gelagert. Zur Herstellung von Selektivmedien in Petrischalen wurde vor dem Befüllen der Petrischalen das LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Dabei sind die jeweiligen Antibiotikum-Konzentrationen vom Antibiotikum abhängig; für Ampicillin betrug die Endkonzentration 150 µg/ml, für Tetracyclin 10 µg/ml, für Kanamycin 25 µg/ml und für Chloramphenicol 30 µg/ml.

2.2.2 *E. coli* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden *E. coli* Stämme für Klonierungs- und Expressionszwecke eingesetzt. Die Liste beinhaltet neben dem Stammmamen auch den Genotyp und die jeweiligen Eigenschaften bzw. Verwendungsgründe. Generell erfolgte die Anzucht kleinerer Bakterien-Flüssigmediumkulturen (3 ml) in Glasröhrchen, größere Flüssigkulturen (500 ml) wurden in Schikanekolben oder normalen Kolben angezogen, wobei das Beheizen der Flüssigmediumkulturen entweder im Wasserbad oder im Luftschüttler stattfand. Im Gegensatz dazu erfolgte die Anzucht von Bakterien auf Festmedium in einer Petrischale im Brutschrank. Teilweise wurden auch Flüssigkulturen im 10 L Fermenter Maßstab angesetzt.

Stamm	Genotyp	Eigenschaften
TGE 900	[F ⁻ , su-1, ilv-1, bio(λ clts857 Δ Bam Δ H1)]	Mit dem <i>E. coli</i> Stamm TGE 900 ist es möglich die Transkription von Genen, die unter Kontrolle eines λ P _L -Promotors stehen, durch eine Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C anzuschalten. Der Grund hierfür ist die Fähigkeit dieses Stammes eine temperatursensitive Variante des λ -Repressors (λ -clts857) zu produzieren. Dieser λ -Repressor ist bei 28°C stabil und verhindert so das Ablesen der Gene. Wird die Temperatur erhöht kommt es zur Inaktivierung des λ -Repressor und die Transkription wird angeschaltet. Dieser Stamm, in Verbindung mit dem Plasmid pLK-HisFlag-ICAD-S sowie pLK-HisFlag-ICAD-L, wurde zur Überexpression des Proteins ICAD-S und ICAD-L verwendet.
BL21 Gold (DE3)	[F ⁻ , ompT, hsdS(rB ⁻ rB ⁻) dcm ⁺ ,Tetr, gal λ (DE3), endA, Hte]	Der Stamm BL21 Gold (DE3) verfügt über die codierende Sequenz für die T7-RNA-Polymerase, da diese lysogen durch den λ -Phagen DE3 in das Bakterienchromosom eingebracht wurde. Somit kann er der Expression T7-Promotor-kontrollierter Gene dienen. Die Induktion der T7 Polymerase (des lacUV5 Promotors) findet dabei durch IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid) Zugabe statt. Neben T7-Promotor kontrollierten Genen wurde dieser Stamm außerdem in Kombination mit dem Vektor pASK-CAD-I-Scel verwendet. Dieser verfügt über einen tet-Promotor. Die Proteinexpression wurde daher durch Anhydrotetracyclin Zugabe induziert.

XL1 Blue MRF	[Δ (mcrA)183, hsdSMR-mrr)173, endA1, sup-E44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F ⁻ pro AB lac ^q Z Δ M15 Tn 10(Tet ^r)]]	Dieser Stamm wurde, aufgrund seiner funktionslosen Endonuklease (endA1), für die Generierung von Plasmid-DNA verwendet. Die Zellen sind Tetracyclin resistent (Tet ^r), wodurch zusätzlich zum Antibiotikum, welches der Selektion des transformierten Plasmids dient, Tetracyclin auf die Platten gegeben werden kann. Dies hilft zum Beispiel bei der Unterdrückung von Satelliten-Kolonien.
Lk111 (λ)	[(rk-mk+), thi-1, thr-1, leuB6, tonA21, supE44, lacIqYZdeltaM15, hfr, lambda+]	Dieser Stamm wurde als Klonierungsstamm für die Arbeiten mit ICAD-S und ICAD-L verwendet. Später wurde ICAD-S bzw. ICAD-L dann mit Hilfe des Stamms TGE 900 in Verbindung mit dem Vektor pLK-HisFlag-ICAD-S/L überexprimiert.

2.2.3 Plasmidvektoren

Die für die Klonierung von DNA und die Überexpression von Proteinen verwendeten Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren sind in dieser Tabelle beschrieben:

Plasmid	Eigenschaften
pLK-HisFlag-ICAD-S / ICAD-L	Dieser Vektor entstand aus pLK-HisFlag-EndA1 durch Ersetzen von EndA1 cDNA mit der c-DNA aus murinem ICAD-S bzw. ICAD-L. Neben einer N-terminalen Sequenz, welche einen His-tag codiert, ist auch eine N-terminale Sequenz vorhanden, welche einen Flag-tag codiert. Der Vektor besitzt als Selektionsmarker ein Resistenzgen für Kanamycin. Die Transkription klonierter Gene steht hierbei unter der Kontrolle eines λ P _L -Promotors.
pACET-HisICAD-S/ICAD-L	Dieser Vektor besitzt als Selektionsmarker das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen (Cat-Gen). Er wurde zur Expression von ICAD-S und ICAD-L in BL21 Gold (DE3) Zellen verwendet. Die Transkription klonierter Gene wird hierbei durch den T7-Promotor kontrolliert. Das T7 Expressionssystem basiert jedoch auf der T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 und ist somit <i>E. coli</i> Zellen eigentlich fremd. Der Stamm BL21 Gold (DE3) verfügt jedoch über die codierende Sequenz für die T7-RNA-Polymerase, da diese lysogen durch den λ -Phagen DE3 in das Bakterienchromosom eingebracht wurde. Die Expression kann somit durch IPTG, ein nicht hydrolysierbares Lactose-Analogon, induziert werden.

pGEX-2T-mCAD	Da sich dieser Vektor besonders gut zur Expression von GST-Fusionsproteinen eignet, diente er in der vorliegenden Arbeit der Expression von GST- <i>tag</i> fusioniertem, murinem CAD-Wildtyp. Kontrolliert wird die Transkription der GST-CAD cDNA durch einen <i>tac</i> -Promotor, die Induktion kann somit durch IPTG erfolgen. Des Weiteren enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Da die Nuklease auf die Chaperonaktivität ihres Inhibitors angewiesen ist und somit nicht alleine exprimiert werden kann, wurde der Vektor pGEX-2T-mCAD zusammen mit dem Vektor pACET-DFF45 als Zwei-Plasmid-System eingesetzt ⁹⁷ . So wurde GST-CAD mit DFF45 ko-exprimiert. Nach erfolgreicher Überexpression des GST-CAD Fusionsproteins befindet sich direkt am C-terminalen Ende des GST- <i>tags</i> eine Thrombin-Spaltstelle (LVPRGS) durch die der GST- <i>tag</i> von CAD entfernt werden kann.
pACET-DFF45	Dieser Vektor besitzt als Selektionsmarker das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen (Cat-Gen). Wie bereits erwähnt, wurde dieser Vektor zusammen mit pGEX-2T-mCAD als Zwei-Plasmid-System eingesetzt. Die weiteren Charakteristika dieses Vektors wurden bereits im Zusammenhang mit dem Konstrukt pACET-HisICAD-S/ICAD-L näher erläutert.
pACET-HisDFF45	Wie auch der Vektor pACET-DFF45 wurde dieser Vektor zusammen mit pGEX-2T-mCAD als Zwei-Plasmid-System eingesetzt. Da in diesem Vektor DFF45 als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His ₆ - <i>tag</i> exprimiert wird, konnte dieses Konstrukt über eine Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die weiteren Charakteristika dieses Vektors wurden bereits im Zusammenhang mit dem Konstrukt pACET-HisICAD-S/ICAD-L näher erläutert.
pBluescriptSK(+)	Dieses Plasmid diente als Substrat für CAD in den Spalt- bzw. Inhibitionsassays. Außerdem wurde dieses Plasmid im Zusammenhang mit dem Fusionsenzym CAD-ISceI verwendet, da die ISceI DNA-Erkennungssequenzen in diesen Vektor eingebracht wurden. So sollte ein CAD-I-SceI spezifisches Substrat generiert werden.
pASK-CAD-ISceI-Strep	Dieser Vektor entstand aus dem Vektor pASK der Firma IBA BioTAGnology. Dazu wurde die codierende DNA-Sequenz für CAD aus pGex-2T-mCAD und die codierende DNA-Sequenz für I-SceI aus dem Vektor pET-Duet_D44S durch mehrere Klonierungsschritte aus den Ursprungsvektoren in pASK eingefügt. Am C-terminalen Ende des Fusionsproteins CAD-I-SceI befindet sich ein Strep- <i>tag</i> . Die Transkription wird durch einen <i>tet</i> -Promotor reguliert und kann durch Zugabe von Anhydrotetracyclin gestartet werden.

pETM-30-ICADS	Zur Expression des Fusionsproteins His ₆ -GST-ICAD-S wurde der Vektor pETM-30-ICADS verwendet. Da die Transkription klonierter Gene in diesem Vektor durch den T7-Promotor kontrolliert wird, wurden, wie bereits beschrieben, BL21 Gold (DE3) Zellen in Zusammenhang mit diesem Vektor verwendet. Aufgrund einer TEV-Protease Spaltstelle direkt am C-terminalen Ende des His ₆ -GST-tags kann dieser abgespalten werden, um somit ICAD-S ohne tag zu erhalten. Unter anderem aufgrund dieser Eigenschaft wurde dieser Vektor im Zuge der ICAD-S Überexpression für die Kristallisationsstudien verwendet. Als Selektionsmarker besitzt dieser Vektor ein Kanamycinresistenzgen.
pGEX-2T-DFF40-DFF45	Dieser bicistronische Vektor wurde zur Überexpression der Proteine DFF40 und DFF45 verwendet. DFF40 wird dabei als GST-Fusionsprotein exprimiert. Nach erfolgreicher Überexpression des GST-DFF40/DFF45 Komplexes befindet sich direkt am C-terminalen Ende des GST-tags eine Thrombin-Spaltstelle (LVPRGS) durch die der GST-tag von DFF40 entfernt werden kann. Die weiteren Charakteristika dieses Vektors wurden bereits im Zusammenhang mit dem Konstrukt pGEX-2T-mCAD näher erläutert.

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli ist normalerweise nicht in der Lage DNA aus der Umwelt aufzunehmen. Aus diesem Grund mussten die Zellen für eine erfolgreiche Transformation mit DNA kompetent gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden TSS-kompetente, elektrokompetente und Z-kompetente Zellen verwendet:

2.2.4.1 TSS-kompetente Zellen

Die Abkürzung TSS bezieht sich bei dieser Methode auf die verwendete TSS-Lösung (*Transformation and Storage solution*)¹⁶³. Diese besteht aus LB-Medium (pH 6.0-6.5) welches mit 40 % (w/v) PEG 600, 5 % (v/v) DMSO und 50 mM Mg²⁺ (MgCl₂) versetzt wurde. Die TSS-Lösung wurde nach dem Ansetzen autoklaviert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Für die TSS-Methode wurde am Vortag zunächst eine 3 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD^{600nm} (optische Dichte) von 0,3 - 0,5 angezogen. Eine OD^{600nm} von 0,3 - 0,5 entspricht hierbei der frühen logarithmischen Wachstumsphase der Zellkultur und ist die Phase, in der die Bakterien am vitalsten sind. Nach dem Erreichen der OD^{600nm} von 0,3 - 0,5 wurde die Zellkultur 10 Minuten bei 1000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun verworfen und das Zellpellet in 10 ml TSS (eiskalt) gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde nun á 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Die Lagerung der schockgefrorenen Aliquots erfolgte bei -80°C. Anzumerken sei noch, dass sämtliche Arbeitsschritte während des Erstellens der TSS-kompetenten Zellen auf Eis durchgeführt wurden, um eine ständige Kühlung der Zellen zu gewährleisten.

2.2.4.2 Elektrokompetente Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde am Vortag eine 50 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Am Folgetag wurden zwei 500 ml Kulturen mit je 10 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD^{600nm} von ca. 0,5 angezogen. Nun wurden die Zellen in einen Zentrifugenbecher gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 15 Minuten bei 1000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in je 250 ml 10 % Glycerin gelöst und in kleinere 250 ml Zentrifugenbecher umgefüllt. An dieser Stelle erfolgte ein nächster Zentrifugationsschritt (wiederum 15 Minuten bei 1000 g und 4°C). Nun wurde das Zellpellet in je 150 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (15 Minuten bei 1000 g und 4°C), anschließend wurde das vom Überstand befreite Zellpellet in je 20 ml 10 % Glycerin aufgenommen und sanft resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden nun in einem 50 ml Greinergefäß vereinigt und erneut abzentrifugiert (15 Minuten bei 1000 g und 4°C). Das Pellet wurde in 3-4 ml 10 % Glycerin gelöst und in Aliquots à 80 µl in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Die Lagerung der schockgefrorenen Aliquots erfolgte bei -80°C. Anzumerken sei noch, dass sämtliche Arbeitsschritte während des Erstellens der elektrokompetenten Zellen auf Eis durchgeführt wurden, um eine ständige Kühlung der Zellen zu gewährleisten. Dies galt auch für die beim Aliquotieren verwendeten Eppendorfgefäße. Außerdem sei anzumerken, dass das 10 %ige Glycerin am Vortag frisch hergestellt und nach dem Autoklavieren bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

2.2.4.3 Z-kompetente Zellen

Für die Bereitung Z-kompetenter Zellen wurde am Vortag eine 3 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden am folgenden Tag 500 µl abgenommen und in eine 50 ml Hauptkultur (SOB-Medium oder *Zymo-Broth*) überführt. Danach wurde die 50 ml Kultur in einem 500 ml Glaskolben bei 28°C im Luftschüttler bis zum Erreichen einer OD^{600nm} von ca. 0,5 inkubiert und dann für 10 min auf Eis gelagert. Nun wurde die Kultur bei 3000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Pellet in 5 ml eiskaltem 1 x Waschpuffer resuspendiert. Nun erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt (gleiche Parameter wie beim ersten Zentrifugationsschritt). Dieses Mal wurde das Pellet in 5 ml *competent*-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension à 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden nun bei -80°C gelagert.

Die Zusammensetzung der Puffer entsprach den Angaben des Herstellers (www.zymoresearch.com) und wurde nicht modifiziert.

2.2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen mit DNA

2.2.5.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen

Die Transformation TSS-kompetenter Zellen mit DNA erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurden die TSS-kompetenten Zellen aus dem -80°C genommen und vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach dem vollständigen Auftauen der Zellen wurden 10 -100 ng Plasmid-DNA hinzu gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock (42°C) für

zwei Minuten, auf den eine erneute Inkubation auf Eis (fünf Minuten) folgte. Nun wurden 800 µl steriles LB-Medium zu den Zellen gegeben und vorsichtig resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren. Hierzu wurden 50 µl bzw. 500 µl des Ansatzes auf einer Petrischale mit festem Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden nach einer kurzen Inkubationsphase kopfüber (diente der Vermeidung von Kondenswasser im Deckel) in den 37°C Brutschrank gestellt.

2.2.5.2 Transformation elektrokompenter Zellen

Bei dieser Art der Transformation wird die Zellwand der Bakterien durch kurze Hochspannungsimpulse für einen kleinen Zeitraum permeabel gemacht. Dies ermöglicht, dass exogene DNA in die Zelle gelangen kann.

Die Transformation elektrokompenter Zellen mit DNA erfolgte nach folgendem Protokoll:

In einem ersten Schritt wurde ein Aliquot der elektrokompenten Zellen aus dem -80°C Gefrierschrank genommen und langsam auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 10-100 ng salzfreie DNA zu den Zellen gegeben und das Zell-DNA Gemisch dann in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde anschließend mit einem flusenfreien Tuch abgetrocknet. Nun erfolgte die Transformation bei einer maximalen Kapazität von 50 µF, einem Widerstand von 150 Ω, einer Spannung von 1350 Volt, einer Stromstärke von 25 mA und einer maximalen Leistung von 25 Watt. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml frischen und sterilen LB-Medium aufgenommen und nach dem Überführen in ein Eppendorfgefäß bei 37°C (für eine Stunde) inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren. Hierzu wurden 50 µl bzw. 500 µl des Ansatzes auf einer Petrischale mit festem Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden nach einer kurzen Inkubationsphase kopfüber (diente der Vermeidung von Kondenswasser im Deckel) in den 37°C Brutschrank gestellt.

2.2.5.3 Transformation Z-kompenter Zellen

Für die Transformation Z-kompenter Zellen mit DNA wurden zwischen 50-100 ng Plasmid-DNA zu einem Aliquot Z-kompenter Zellen (zuvor langsam auf Eis aufgetaut) gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen auf einer angewärmten Agarplatte (mit dem entsprechendem Selektivmedium) ausplattiert.

2.2.6 Glycerinkulturen von *E. coli*

Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* Expressionsstämmen mit DNA und anschließender Überprüfung auf eine erfolgreiche Expression des Zielproteins hin, wurden in einigen Fällen Glycerinkulturen angefertigt. Die Glycerinkulturen haben den Vorteil, dass eine Vorkultur direkt mit einer kleinen Menge dieser beimpft werden kann und so keine erneute Transformation durchgeführt werden muss. Für das Erstellen einer Glycerinkultur wurde zunächst am Vortag eine 3 ml Kultur mit dem gewünschten *E. coli* Stamm beimpft. Am Folgetag wurde mit 100 µl dieser Vorkultur eine 3 ml Kultur frisch angeimpft. Nach dem Erreichen einer OD^{600nm} von 0.5 wurden 800 µl dieser Kultur abgenommen und mit 200 µl autoklaviertem Glycerin unter sterilen Bedingungen vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 20 Minuten und darauf folgend die Lagerung bei -80°C im Gefrierschrank.

2.3 Molekularbiologisches Arbeiten

2.3.1 Die Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren verwendet. Im Allgemeinen ist die Elektrophorese eine Methode um Gemische von Stoffen oder Teilchen, die in einem elektrischen Feld verschieden schnell wandern, aufzutrennen. Bei der Gelelektrophorese wandern die Teilchen durch ein sogenanntes Trägermaterial, das als Molekularsieb dient. Teilchen mit einem größeren Radius werden von diesem Molekularsieb stärker gehemmt als Teilchen mit einem kleineren Radius, wodurch die Stoffe ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Für die Auftrennung hochmolekularer Nukleinsäuren (> 1000bp) wurde in der vorliegenden Arbeit Agarose als Trägermaterial verwendet (Agarose-Gelelektrophorese), für die von niedermolekularen Nukleinsäuren (< 1000bp) Polyacrylamid (Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in allen Fällen mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Protein Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde jedoch in Anwesenheit von 0.1 % SDS (Sodiumdodecylsulfat) durchgeführt, weshalb dieses Verfahren auch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) genannt wird¹⁶⁴. SDS ist ein anionisches Tensid, das sich an Proteine lagert und dabei deren Eigenladung überdeckt. Dadurch ist gewährleistet, dass die Proteine eine konstante stark negative Ladungsverteilung aufweisen und allein aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt werden.

2.3.1.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von unspezifischer Plasmid-DNA Spaltung, von spezifischen Plasmid-DNA Spaltungen durch Restriktionsendonukleasen und zur Kontrolle von Plasmidpräparationen wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarose wurde hierfür in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) gelöst, so dass die Endkonzentration 0.8 % (w/v) betrug.

Die Zusammensetzung des TBE-Puffers sah wie folgt aus: 100 mM Tris, 100 mM Borsäure (Borat), 2.5 mM EDTA, pH 8.3

Die Proben für eine solche Agarose-Gelelektrophorese wurden vor dem Auftragen mit 0.2 Vol 5 x Agaroseauftragspuffer (AAP) versehen. Dieser Agaroseauftragspuffer enthielt: 250 mM EDTA, 25 % (w/v) Saccharose, 1.2 % (w/v) SDS, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte jeweils horizontal in den entsprechenden Kammern bei einer Spannung von maximal 10 V/cm.

Zum Sichtbarmachen der DNA wurden die Agarosegele nach dem Lauf in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) für 15 Minuten gefärbt und anschließend 15 Minuten in einem Wasserbad gewaschen. Ethidiumbromid, ein aromatisches Fluoreszenzmittel, interkaliert hierbei zwischen die Basenpaare von Nukleinsäuren, wobei die Intensität der Fluoreszenz-Emission bei Bestrahlung mit UV-Licht um den Faktor 50 zunimmt. Zwecks Archivierung wurden die Agarosegele samt „gefärbten“ DNA-Banden mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage fotografiert und anschließend gespeichert.

2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Wie bereits in 2.3.1 beschrieben wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von weniger als 1000 bp über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte vertikal bei einer Stromstärke von 45 mA, die Konzentration an Polyacrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid → 1:29) im Gel variierte dabei von 6 % bis 12 % (normalerweise jedoch 8 %). Der für diese Art der Gelelektrophorese verwendete Puffer war TPE-Puffer (Tris-Phosphat-EDTA): 80 mM Tris-Phosphat, 2 mM EDTA, pH 8.0.

Zum Auftragen der Proben wurde, wie auch bei der Agarose-Gelelektrophorese, der 5 x Agaroseauftragspuffer verwendet. Die Gele wurden nach dem Lauf für 10 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) gefärbt und anschließend 10 Minuten in einem Wasserbad gewaschen und wie bei der Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet (siehe 2.3.1.1).

2.3.1.3 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen wurden ebenfalls Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Durchführung entsprach hierbei dem von Ulrich Lämmli beschriebenen Protokoll¹⁶⁴. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid betrug 1:29. Der Lauf erfolgte bei 35 mA und, wie in 2.3.1 beschrieben, in Gegenwart von SDS. Anschließend wurden die Gele zunächst 3 x mit lauwarmem Wasser für fünf Minuten gewaschen und dann 30 Minuten mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. *Coomassie Brilliant Blue* lagert sich hierbei an die basischen Seitenketten von Aminosäuren und färbt so die Proteine. Um nicht gebundenes *Coomassie Brilliant Blue* zu entfernen wurde das Gel anschließend erneut in ein Wasserbad gelegt.

Zum Auftragen der Proben wurde Lämmli-Auftragspuffer (LAP) verwendet: 160 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) Mercaptoethanol, 20 % (w/v) Saccharose und 0.01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8).

2.3.2 Plasmid-DNA Isolation

Die Isolation von Plasmid-DNA im Rahmen dieser Arbeit erfolgte hauptsächlich mit Hilfe von speziellen Plasmid-Präparations-Kits aus dem Hause Promega. Die Anwendung der Kits entsprach den Anweisungen des Herstellers.

2.3.3 Ethanolfällung

In der Regel wurde, wie bereits in 2.3.2 erwähnt, Plasmid-DNA mit Hilfe von speziellen Plasmid-DNA Präparation-Kits extrahiert und gereinigt. In einigen Fällen entsprach die Reinheit der Präparate jedoch nicht den erforderlichen Ansprüchen. In diesen Fällen, aber auch zum Konzentrieren der Plasmid-DNA Proben, wurde im Anschluss an die Reinigung via Kits eine Ethanolfällung der Plasmid-DNA durchgeführt. Bei der Ethanolfällung wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von 2-3 Vol. absolutem Ethanol und 0.1 Vol 3M Natrium-Acetat gefällt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis erfolgt eine 60 minütige Zentrifugation bei 15000 g. Die zuvor gefällte DNA

befindet sich nun als Pellet am Boden des Eppendorfgefäßes. Nach dem Waschen mit kaltem 70 %igem Ethanol wird das Pellet getrocknet und danach in der gewünschten Menge H₂O gelöst.

2.3.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (1 A^{260 nm} entspricht 50 ng/µl dsDNA).

2.3.5 Klonierung und Modifikation von DNA

2.3.5.1 DNA Verdau mittels Restriktionsenzyme

Für die Analyse von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten (analytischer Restriktionsverdau), aber auch für den Transfer von DNA-Fragmenten von Vektor zu Vektor (präparativer Restriktionsverdau) wurden in der vorliegenden Arbeit Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese Enzyme, auch Restriktionsenzyme genannt, schneiden DNA an hochspezifischen Stellen. Typischerweise wurden für analytische Spaltungen 100 ng DNA eingesetzt und diese für 2-3 Stunden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Als Puffer für die Spaltreaktion wurde ebenfalls jeweils der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, die Enzymmenge lag bei 10 *units* pro Ansatz. Das Ansatzvolumen für einen solchen analytischen Restriktionsverdau lag üblicherweise bei 30 µl.

Für die präparativen Restriktionsspaltungen wurde ein Ansatzvolumen von 50 oder 100 µl gewählt. Die eingesetzte Menge an DNA lag bei 1-5 µg und die Menge an Restriktionsenzym bei 20 *units*. Wie auch bei den analytischen Restriktionsspaltungen wurde jeweils der vom Hersteller empfohlene Puffer und die vom Hersteller empfohlene Inkubationstemperatur gewählt. Die Inkubationszeit variierte zwischen 3-4 Stunden. In manchen Fällen wurden so genannte *FastDigest™ Enzymes* verwendet. Diese Enzyme sind, wie der Name bereits vermuten lässt, in der Lage 1 µg DNA in 5 Minuten und somit deutlich schneller als andere handelsübliche Restriktionsenzyme zu verdauen. Der Verdau erfolgte bei diesen Enzymen bei 37°C in dem vom Hersteller empfohlenen 1x *FastDigest Puffer*. Die Inkubationszeit wurde in der vorliegenden Arbeit in der Regel jedoch von 5 Minuten auf 15 Minuten erhöht und entsprach somit nicht den Herstellerangaben. Die Ausnahme stellten hier Enzyme mit einer „Star-Aktivität“ dar; bei solchen Enzymen wurde die vom Hersteller empfohlene Inkubationszeit eingehalten. Die präparativen Ansätze wurden im Anschluss an den Verdau über das Wizard® SV *Gel and PCR Clean-Up System* Kit gereinigt. Zum Auftragen der Proben, bzw. eines Teil der Proben zwecks Analyse mittels Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde diese mit 0.2 Vol AAP versehen.

2.3.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die durch den präparativen Restriktionsverdau modifizierten DNA-Fragmente (Insert) sollten in der Regel in einen anderen Plasmidvektor eingebracht werden. Dazu wurden 50 ng des restriktionsverdauten Vektors und die dreifache molekulare Menge an Insert zusammen mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an T4 DNA Ligase in T4 DNA Ligasepuffer inkubiert (das Ansatzvolumen entsprach 20 µl). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 2 Stunden.

Üblicherweise wurden 5 µl des Ansatzes anschließend direkt für die Transformation genutzt, in manchen Fällen wurde der Ligationsansatz jedoch zuvor mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System gereinigt.

2.3.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Mithilfe der PCR-Methode (engl.: *polymerase chain reaction*) können DNA Abschnitte vervielfältigt werden. Sie beruht auf dem Prinzip, dass ein DNA-*template* in sukzessiven Zyklen von Denaturierung, Primer Hybridisierung (*annealing*) und Polymerisation exponentiell amplifiziert werden kann. Neben der Amplifikation von DNA-Abschnitten diente die PCR in der vorliegenden Arbeit auch dem Einbringen von Mutationen in bestimmte DNA-Sequenzen, der Generation von Inserts oder Vektoren für Klonierungen und der Suche nach insert-positiven Klonen (*screening*) im Anschluss an Ligationen.

2.3.6.1 PCR Standardbedingungen

An dieser Stelle sollen die Standardbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen geschildert werden. Zum *screen* nach insert-positiven Klonen wurde in der Regel die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, während bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten im Rahmen einer Klonierung die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt wurde. Beide Polymerasen haben die Eigenschaft sehr hitzetolerant zu sein, letztere verfügt jedoch außerdem noch über eine 3`-5` Exonuklease-Aktivität, die ein so genanntes *proofreading* (Korrekturlesen) ermöglicht. Des Weiteren sei anzumerken, dass das PCR Protokoll in einigen Fällen an die Primereigenschaften bzw. an die Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz angepasst wurde.

Taq-Polymerase PCR Standardbedingungen:

In einem anfänglichen Schritt wurde die die DNA bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Danach folgten dreißig Zyklen, die jeweils aus 30 sec bei 95°C (Denaturierung), 30 sec bei 55°C (Hybridisierung) und 90 sec bei 72°C (Primerextension) aufgebaut waren. Nach den dreißig Zyklen folgte eine finale Elongation von 5 Minuten bei 72°C, um die Reaktion im Anschluss auf 4°C abzukühlen.

Pfu-Polymerase PCR Standardbedingungen:

Das Protokoll für die Standard *Pfu*-Polymerase PCR entsprach bis auf eine Änderung dem der *Taq*-Polymerase PCR. Diese Änderung bezog sich auf die Temperatur der Primerextension (68°C anstelle von 72°C).

2.3.6.2 PCR-Standardansatz

Die PCR Standardansätze sahen wie folgt aus:

Substanz	Menge/Volumen
<i>template</i>	100.0 ng
10x Puffer	0.1 Vol
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	200.0 µM
5'Primer	0.3 µM
3'Primer	0.3 µM
DNA-Polymerase	0.05 U/µl

Mit H₂O auf ein Endvolumen von 30-50 µl auffüllen.

Nach der *Pfu*-PCR erfolgte in der Regel ein DpnI-Verdau, um das *template*-Plasmid zu beseitigen. DpnI ist ein Restriktionsenzym, das nur schneidet, wenn seine Erkennungssequenz methyliert ist. Da dies beim *template*-Plasmid der Fall ist (*E. coli* verfügt über die so genannte *Dam*-Methylase [*desoxyadenosine methylation*], welche die pallindromische Sequenz GATC am Adenosin methyliert), nicht jedoch beim PCR-Produkt, wird folglich nur das *template*-Plasmid verdaut. Der Verdau erfolgte mit 0.5 *units* für 3 h bei 37°C unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Puffers.

2.3.6.3 Mutagenese-PCR Standardbedingungen

Aus bereits genannten Gründen (2.3.6) wurde die *Pfu*-Polymerase für die Mutagenese-PCR benutzt. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mutagenese-PCR Protokoll bestand prinzipiell aus zwei zusammenhängenden PCR-Schritten¹⁶⁵. Während des ersten PCR-Schritts wurde ein Megaprimer erstellt, der wiederum im folgenden PCR-Schritt als Primer für die Amplifikation des Plasmids diente. Im Folgenden sind die jeweiligen Protokolle des ersten und zweiten PCR-Schritts tabellarisch aufgelistet:

Erster PCR-Schritt:

Zyklus Nr.	Temperatur und Dauer
1 Zyklus	bei 94°C für 2 min
15-20 Zyklen	bei 94°C für 30 sec, 50°C für 1 min und 68°C für 1 min
1 Zyklus	68°C für 5 min
dann	4°C

Zweiter PCR-Schritt:

Zyklus Nr.	Temperatur und Dauer
1 Zyklus	bei 95°C für 90 sec
9 Zyklen	bei 95°C für 50 sec, 60°C für 50 sec und 68°C für 18 min
9 Zyklen	bei 95°C für 50 sec, 60°C für 50 sec und 68°C für 18 min + 10 sec
1 Zyklus	bei 68°C für 7 min
dann	4°C

2.3.6.4 Mutagenese-PCR Standardansatz

Der Standardansatz für die Mutagenese-PCR sah wie folgt aus:

Substanz	Menge	Volumen
<i>template</i>	100 ng	x µl
dNTPs	400 µM	10 µl
<i>forward</i> Primer	400 nM	5 µl
<i>reverse</i> Primer	400 nM	5 µl
Puffer	10 x	5 µl
<i>Pfu</i> -Pol.	2.5 U	1 µl
H ₂ O		24 - x µl
Total		50 µl

Ebenfalls wie bei der *Pfu*-PCR (siehe 2.3.6.2) wurde der Mutagenese-PCR Ansatz auch im Anschluss mit DpnI inkubiert.

2.3.6.5 Inverse PCR

Ein weiteres PCR Protokoll, das zum Einfügen von Mutationen verwendet wurde, ist die inverse PCR. Bei dieser Methode werden zwei Primer erstellt, die nicht wie bei einer normalen PCR aufeinander zugerichtet sind, sondern in die entgegengesetzte Richtung zielen. Dadurch wird das Plasmid in seiner vollen ursprünglichen Länge amplifiziert. Beinhaltet einer der Primer nun die Information für eine Modifikation der DNA, so ist auf diese Weise das Einfügen einer Mutation (Insertion, Punktmutation, Deletion) möglich. Wichtig ist außerdem zu erwähnen, dass die beiden gewählten Primer über dieselbe, neu eingefügte, Marker-Restriktionsschnittstelle verfügen müssen.

Ansatz für eine inverse PCR:

Substanz	Menge	Volumen
<i>template</i>	100 ng	x μ l
dNTPs	400 μ M	10 μ l
<i>forward</i> Primer	400 nM	5 μ l
<i>reverse</i> Primer	400 nM	5 μ l
Puffer	10 x	5 μ l
<i>Pfu</i> -Pol.	2.5 U	1 μ l
H ₂ O		24 - x μ l
Total		50 μ l

Für die inverse-PCR wird im Gegensatz zu einer Standard-PCR, ähnlich wie bei der Mutagenese-PCR, eine längere Extensionszeit gewählt:

Protokoll einer inversen-PCR

Zyklus Nr.	Temperatur und Dauer
1 Zyklus	bei 94°C für 120 sec
10 Zyklen	bei 95°C für 50 sec, 60°C für 50 sec und 68°C für 18 min
15 Zyklen	bei 95°C für 50 sec, 60°C für 50 sec und 68°C für 18 min + 10 sec
1 Zyklus	bei 68°C für 7 min

dann 4°C

Die linearen PCR Produkte wurden im Anschluss über das Wizard[®] SV *Gel and PCR Clean-Up System* gereinigt. Nun wurde das lineare PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease verdaut, deren singuläre Schnittstelle über die Primer neu in das Zielgen eingeführt wurde. Dies ermöglicht es das lineare PCR-Produkt in einer nachfolgenden Reaktion mit T4 DNA-Ligase zu zirkularisiert. Daraufhin kann *E. coli* mit diesem zirkulären Plasmid transformiert werden.

2.3.7 Radioaktives Markieren von Nukleinsäuren

Für die EMSA Versuche mit dem Fusionsprotein CAD-I-SceI wurde ein radioaktiv-markiertes DNA PCR-Produkt hergestellt.

2.3.7.1 PCR mit [α -³²P] dATP

Die PCR zum Erstellen des radioaktiv markierten DNA-Fragments entsprach in der Durchführung und in der Zusammensetzung einer üblichen Standard-PCR (2.3.6.1). Neben den auch bei der

Standard-PCR verwendeten dNTPs wurden bei der hier beschriebenen PCR jedoch 3 μl [α - ^{32}P] Adenosine 5'-triphosphate (10mCi/mL) zum Reaktionsmix (50 μl Komplettvolumen) hinzugegeben.

2.3.7.2 Messung und Quantifizierung von Radioaktivität

Die Strahlung des mit Hilfe des Wizard[®] SV *Gel and PCR Clean-Up System* gereinigten radioaktiv markierten PCR-Produkts wurde nun in Form von *counts* in einem Scintillationszähler quantifiziert. Außerdem wurde die DNA-Menge mittels Absorptionsmessung (bei 260 nm) ermittelt. Für die jeweiligen EMSA Experimente wurden dann im Anschluss ungefähr 1000 *counts* (entsprach einer Konzentration von 2.5 nM DNA) je Versuchsansatz (10 μl) eingesetzt. Die EMSA-Experimente wurden anschließend Polyacrylamid-gelelektrophoretisch (6 %) analysiert und mittels des Instant-Imagers ausgewertet. Als Puffersystem wurde bei diesen Versuchen TA-Puffer verwendet (33 mM Tris-acetate, pH 7.5).

2.3.8 Expression rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Proteine mit Hilfe von bestimmten Expressionssystemen in *E. coli* überexprimiert. Die verwendeten Expressionssysteme sowie die überexprimierten Proteine sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

A: Expression von GST-CAD

Die Nuklease CAD wurde mit Hilfe des *E. coli* Stammes BL21 Gold (DE3) in Verbindung mit dem Plasmid pGEX-2T-mCAD überexprimiert. Da CAD in Verbindung mit seinem Inhibitor ICAD bzw. DFF45 ko-exprimiert werden muss, wurde zu diesem Zweck ein Zwei-Plasmid System verwendet⁹⁷. Dieses bestand aus dem Vektor pACET-DFF45 und dem Vektor pGEX-2T-mCAD. Dabei wurde die Nuklease CAD als N-terminales Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert. Die Induktion dieses Systems erfolgte über IPTG (Endkonzentration 1 mM).

B: Expression von His-ICAD (S/L)

His-ICAD wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zum einen mit Hilfe des *E. coli* Stammes BL21 Gold (DE3) in Verbindung mit dem Plasmid pACET-His-ICAD-S/L und zum anderen mit Hilfe des Stammes TGE-900 in Verbindung mit dem Plasmid pLK-HisFlag-ICAD-S/L überexprimiert. Der Stamm TGE-900 enthält die temperatursensitive Mutante *clts857* des λ -Repressors in seinem Chromosom. Somit konnte die Induktion der λ -P_L-Promotor kontrollierten Genexpression über eine Temperaturerhöhung erfolgen. Die Zellen wurden dazu bei einer Temperatur von 28°C (bei dieser Temperatur ist der Repressor stabil) bis zu einer OD^{600nm} von 0.5 angezogen, anschließend erfolgte, zwecks Induktion, einer Erhöhung der Temperatur auf 42°C. Bei dieser Temperatur wird der Repressor inaktiviert und somit das λ P_L-System aktiviert.

C: Expression von DFF45

DFF45 wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *E. coli* Stammes BL21 Gold (DE3) in Verbindung mit dem Plasmid pACET-DFF45 überexprimiert. Die Induktion dieses Systems erfolgte über IPTG (Endkonzentration 1 mM).

D: Expression von His-DFF45

Das Protokoll zur Expression von His-DFF45 entsprach dem Protokoll für DFF45.

E: Expression von CAD-I-Scel

Das Fusionsprotein CAD-I-Scel wurde durch die Kombination des Stammes BL21 Gold (DE3) in Verbindung mit dem Plasmid pASK-mCAD-I-Scel-Strep überexprimiert. Da in diesem Plasmid das Überexpressions-System unter der transkriptionellen Kontrolle des tetA Promotors/Operators und Repressors steht, wurde die Überexpression durch Zugabe von geringen Mengen (200 ng/ml) von Anhydrotetracyclin (AHT) angeschaltet. Wie auch im Falle von GST-CAD, wurde das Fusionsprotein CAD-I-Scel in Kombination mit DFF45 ko-exprimiert. Hier wurde, aufgrund des zusätzlichen His₆-tags, das Plasmid pACET-His-DFF45 gewählt. Das so erstellte Zwei-Plasmid System bestand somit aus dem Vektor pACET-His-DFF45 und dem Vektor pASK-mCAD-I-Scel-Strep. An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass das Fusionsprotein CAD-I-Scel über einen C-terminalen Strep-tag verfügte. Zusammengefasst erfolgte die Induktion dieses Systems durch Zugabe von IPTG, zwecks Überexpression von His-DFF45, und durch Zugabe von AHT zur Überexpression des Fusionsproteins CAD-I-Scel.

Im Folgenden sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionssysteme und überexprimierten rekombinanten Proteine aufgelistet:

Protein	Verwendeter Vektor	<i>E. coli</i>		
		Expressionsstamm	Induktion	Antibiotikumresistenz
CAD	pGEX-2T-mCAD	BL21 Gold (DE3)	IPTG	Ampicillin
ICAD-S	pACET-His-ICAD-S	BL21 Gold (DE3)	IPTG	Chloramphenicol
	pLK-HisFlag-ICAD-S	TGE 900	28°C → 42°C	Kanamycin
ICAD-L	pACET-His-ICAD-L	BL21 Gold (DE3)	IPTG	Chloramphenicol
	pLK-HisFlag-ICAD-L	TGE 900	28°C → 42°C	Kanamycin
DFF45	pACET-DFF45	BL21 Gold (DE3)	IPTG	Chloramphenicol
	pACET-His-DFF45	BL21 Gold (DE3)	IPTG	Chloramphenicol
CAD-I-Scel	pASK-mCAD-I-Scel-Strep	BL21 Gold (DE3)	Anhydro-tetracyclin	Ampicillin
GFP-CAD	pET-Duet-HisGFPuv-CAD	BL21 Gold (DE3)	IPTG	Ampicillin

2.3.8.1 Expression von Proteinen im präparativen Maßstab

Im Besonderen nach der Klonierung von neuen Genen bzw. neuen Expressionsvektoren wurde zunächst im kleinen Maßstab (3 ml Kultur) überprüft, ob das gewünschte Protein überexprimiert wird. Dazu wurde ein Klon des zuvor transformierten Stammes in frisches, autoklaviertes LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt) überführt und bis zu einer OD^{600nm} von 0.5 angezogen. Vor der Induktion (VI) und nach der Induktion (NI) wurde jeweils ein Aliquot (500 μ l) abgenommen. Der Rest der Kultur wurde an dieser Stelle verworfen. Die Aliquots wurden anschließend bei 12.000 rpm für eine Minute abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 50 μ l LAP-Puffer (Lämmli-Auftragspuffer) resuspendiert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei 95°C wurden 10 μ l der Suspension auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Probe auf Überexpression zu überprüfen.

Konnte anhand des SDS-Gels eine Überexpression des gewünschten Proteins festgestellt werden, wurde mit demselben Klon eine 50 ml Vorkultur mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Mit 10 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag üblicherweise 2-4 x 500 ml Kulturen angeimpft. Diese Kulturen wurden ebenfalls bei einer OD^{600nm} von 0.5 induziert. Anzumerken sei, dass die Inkubationszeit von ICAD Kulturen nach der Expression in der Regel 5-6 Stunden betrug, während DFF-Kulturen in der Regel bei 28°C über Nacht inkubiert wurden. Wie auch beim Test der Expression im kleinen Maßstab wurden bei den Kulturen im großen Maßstab vor der Induktion (VI) und vor dem Abernten der Kulturen (NI) jeweils 500 μ l Aliquots abgenommen und, wie bereits beschrieben, gelelektrophoretisch auf eine erfolgreiche Überexpression getestet. Der Rest der Kultur wurde nun, nicht wie bei den Testkulturen im kleinen Maßstab verworfen, sondern in gekühlte Zentrifugengefäße überführt und bei 4000 rpm für 15 bis 20 Minuten (je nach Totalvolumen der Kulturen) abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun verworfen und das Zellpellet in 40 ml STE-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) gewaschen. Nun wurde die Zellsuspension in 50 ml Greiner Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 4000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wurde anschließend verworfen.

2.3.8.2 Aufschluss von Zellen mittels Ultraschall

Im Folgenden wurden die Zellen aufgeschlossen. Für den Zellaufschluss bieten sich theoretisch mehrere Möglichkeiten an. So zum Beispiel ein enzymatischer Aufschluss (z.B. mit Lysozym) oder aber die Inkubation der Zellen mit einem Detergenz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen jedoch hauptsächlich durch die Beschallung mit Ultraschall (Ultraschallaufschluss) geöffnet. Hierfür wurde das Zellpellet in Aufschlusspuffer gelöst und für 10 Minuten in 15 sec Intervallen (*duty cycle* 50 %, *output level* 5) dem Ultraschall exponiert. Da bei dieser Prozedur relativ viel Wärme entstehen kann, befanden sich die Zellen in zuvor gekühltem Aufschlusspuffer und wurden zusätzlich durch ein Eisbad gekühlt. Außerdem wurde für den Aufschluss ein Becherglasbehälter aus Glas gewählt (und kein Plastik), da Glas Wärme relativ gut leitet.

Aufschlusspuffer für DFF:	20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Triton
Aufschlusspuffer für ICAD:	20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Triton

Nach dem Zellaufschluss wurde die Suspension für eine Stunde bei 20.000 g und 4°C abzentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Separieren der löslichen Komponenten (anschließend im Überstand zu finden) von den unlöslichen Bestandteilen (anschließend im Pellet zu finden).

2.3.9 Reinigung rekombinanter Proteine

Bis auf das Protein DFF45 (in Verbindung mit dem Plasmid pACET-DFF45 exprimiert) wurden alle verwendeten Proteine zusammen mit einem *tag* exprimiert. Dieser ermöglichte die Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie.

2.3.9.1 Affinitätschromatographie

2.3.9.1.1 Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie

Das Fusionsprotein GST-CAD wurde über eine Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie im *batch*-Verfahren gereinigt. Als Matrix dienten hierbei Glutathion-Sepharose *beads* (900 µl). Diese wurden, nach einer 15 minütigen Equilibration mit Waschpuffer, zusammen mit dem löslichen Überstand der aufgeschlossenen Zellen (siehe 2.3.8.2) für drei Stunden bei 4°C unter leichtem Schütteln in einem 50 ml Greiner Röhrchen inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 25 ml Waschpuffer, ein Waschschrift mit 25 ml Hochsalzwaschpuffer und darauf folgend ein dritter Waschschrift mit 25 ml Waschpuffer. Die Inkubation mit Waschpuffer dauerte jeweils 15 Minuten (bei 4°C auf dem Schüttler). Nach der Inkubation wurde der jeweilige Puffer nach einer Zentrifugation des Puffer-*beads* Gemischs (800 rpm, 4°C, 5 Minuten) verworfen. Nun wurden die pelletierten *beads* in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Elutionspuffer versehen. In der Regel wurde die Elution 3 x mit jeweils frischem Elutionspuffer wiederholt, wobei die Inkubationszeit bei der ersten Elution 1 h, bei der zweiten 15 min und bei der dritten Elution 10 min (jeweils bei 4°C unter leichtem Schütteln) betrug. Um im Anschluss das Glutathion (red.) zu entfernen, wurden die Eluate über Nacht gegen einen Liter Dialysepuffer dialysiert.

Dialysepuffer:	20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps
Waschpuffer:	20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Triton
Hochsalzwaschpuffer:	20 mM HEPES pH 7.4, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Triton
Elutionspuffer:	20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Triton, 20 mM Glutathion (red.)

2.3.9.1.2 Ni²⁺ - NTA Affinitätschromatographie

Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit als His₆-Fusionsproteine exprimiert wurden (z.B. ICAD/DFF45), konnten über das IMAC-Verfahren (*immobilized metal ion affinity chromatography*) im *batch*-Verfahren gereinigt werden. Die Matrix bestand in diesem Fall aus Ni²⁺-NTA

(Nitrilotriessigsäure → stickstofforganischer Komplexbildner) Agarose *beads*. Die Arbeitsschritte entsprachen dabei denen der Glutathion-Sepharose *beads* Reinigung und sind 2.3.9.1.1 zu entnehmen. Unterschiedlich waren jedoch verwendeten Puffer (im Folgenden aufgelistet):

Dialysepuffer:	20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps
Waschpuffer:	20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Triton, 25 mM Imidazol
Hochsalzwaschpuffer:	20 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Triton
Elutionspuffer:	20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Triton, 250 mM Imidazol

2.3.9.1.3 Strep-Tactin Sepharose Affinitätschromatographie

Das Fusionsprotein CAD-I-Scel wurde C-terminal mit einem Strep-*tag* exprimiert. Der Strep-*tag* (in der vorliegenden Arbeit wurde der Strep-*tag* II verwendet) ist ein kurzes Peptid (8 Aminosäuren) mit der Sequenz WSHQPFEK, das mit einer sehr hohen Selektivität an Strep-Tactin (ein modifiziertes Streptavidin) bindet. Die Affinität des Strep-*tag* II ist hierbei zu Strep-Tactin um fast 100-fach höher als die zu Streptavidin.

Für die Reinigung von Strep-*tag* fusionierten Proteinen wurde Strep-Tactin Sepharose, in Verbindung mit der *gravity flow* Chromatographie verwendet. Dazu wurde die Strep-Tactin Sepharose (ca. 1 ml) in so genannte *gravity flow* Säulchen gegeben und diese mit 2 Säulenvolumen (CV) Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit dem Überstand des abzentrifugierten Zelllysats versehen und danach 3 x mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte die Elution mittels 1 ml Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Desthiobiotin). Die Eluate wurden nun über Nacht gegen den *storage*-Dialysepuffer (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps) dialysiert.

2.3.9.2 Ionenaustauschchromatographie

Neben der Reinigung durch die Technik der Affinitätschromatographie wurden die Proteine im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Teil auch mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Hierbei unterscheidet man, je nach Beschaffenheit der gelösten Teilchen, in Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie.

2.3.9.2.1 Anionenaustauschchromatographie (MonoQ-Säule)

Die Anionenaustauschchromatographie wurde hauptsächlich zur Reinigung des DFF-Komplexes im Anschluss an die primär durchgeführte Affinitätschromatographie verwendet. Durch diesen zweiten Reinigungsschritt konnten noch vorhandene, kleinere Verunreinigungen durch andere Proteine (aufgrund unspezifischer Bindung an die *beads*) oder durch DNA (komplexgebundene *E. coli*-DNA) entfernt werden. Der verwendete Anionenaustauscher war in allen Fällen eine MonoQ-HR 5/5-Säule, die jeweils vor und nach dem eigentlichen Lauf den Herstellerangaben

entsprechend gereinigt wurde. Nach dem Reinigen der Säule wurde zunächst ein Leergradient (100 mM NaCl → 400 mM NaCl in 15 Minuten) gefahren, zum einen, um zu schauen, ob die Säule erfolgreich gereinigt wurde, und zum anderen, um zu schauen, ob sämtliche Parameter korrekt eingegeben wurden und das HPLC-Gerät wie vorgeschrieben arbeitet. Im Anschluss an den Leergradienten wurden die Proben auf die Säule geladen, um danach den Gradienten (siehe Leergradient) zu starten. Die Flussrate lag bei 1 ml/min während des Laufs und bei 0,3 ml/min beim Beladen der Säule. Die Eluate wurden in jeweils 0,5 ml Fraktionen gesammelt und anschließend auf einem SDS-PAGE Gel analysiert. Fraktionen mit einem hohen Proteinanteil wurden über Nacht gegen Dialysepuffer dialysiert.

Niedrigsalzpuffer: 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaCl

Hochsalzpuffer: 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 400 mM NaCl

Dialysepuffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps

2.3.9.2 Kationenaustauschchromatographie (Heparin-Säule)

Die Kationenaustauschchromatographie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um bereits Caspase-3 aktivierte CAD von ICAD Spaltfragmenten zu reinigen. Es wurde eine HiTrap™ Heparin Säule der Firma GE Healthcare verwendet. Sämtliche Läufe wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Das Protokoll ist in Kapitel 2.3.10.4 näher beschrieben.

2.3.9.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Im Anschluss an die Reinigung von ICAD mittels Affinitätschromatographie wurde in der Regel ein zweiter Reinigungsschritt, die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), angeschlossen. Die HIC baut auf dem Prinzip der hydrophoben Wechselwirkung in Kombination mit dem Aussalzeffekt von Proteinen auf. Als Matrix wurde in der vorliegenden Arbeit eine Phenyl-Sepharose Säule verwendet. Die Proteine wurden zunächst über Nacht gegen HIC-Puffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM 2-Mercaptoethanol, 700 mM NaCl) dialysiert. Danach erfolgte das Beladen der Säule und im Anschluss die Elution. Zur Elution wurde ein Salzgradient (15 ml von 700-0 mM NaCl) appliziert. Die Eluate wurden in jeweils 0,5 ml Fraktionen gesammelt und anschließend auf einem SDS-PAGE Gel analysiert. Fraktionen mit einem hohen Proteinanteil wurden über Nacht gegen Dialysepuffer (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps) dialysiert.

2.3.9.4 Gelfiltration

Zur Reinigung der Proteinproben, die in den Kristallisationsstudien eingesetzt wurden, wurde die Gelfiltration als präparative Methode verwendet. Hauptziel war hier, von bereits gereinigten Proteinproben, mögliche Aggregate zu entfernen. Die verwendete Säule war eine Superdex 200 10/300 GL von GE Healthcare. Die Läufe erfolgten bei einem Maximaldruck von 1.5 MPa in

Laufpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM EDTA). Die Flussrate betrug 1 ml/min.

2.3.10 Charakterisierung von Proteinen

Nach der Reinigung bzw. gegebenenfalls nach der Dialyse wurden die Proteine über folgende Methoden charakterisiert:

2.3.10.1 Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde zum einen mittels Absorptionsmessung bei 280 nm und zum anderen über den Bradford Protein Test bestimmt.

A: Konzentrationsbestimmung über die Messung der Absorption

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm durch die Aufnahme eines Spektrums im Bereich von 320 nm bis 220 nm bestimmt.

Dabei wurde folgender Algorithmus in Kombination mit den spezifischen Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\epsilon_{\text{Protein}} = n \times \text{Trp} \times 5500 + n \times \text{Tyr} \times 1490 + n \times \text{Cys-S-S-Cys} \times 125 \text{ [M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

B: Konzentrationsbestimmung mittels Bradford Test

Bei der Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurde die Proteinkonzentration indirekt durch messen der Absorption bei 595 nm bestimmt. Grund dafür ist, dass der Farbstoff *Coomassie-Brilliant Blau G-250* (Absorptionsmaximum von 470 nm) in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein indirektes Maß für die Proteinkonzentration. Die Durchführung entsprach hierbei dem von Bradford beschriebenen Protokoll¹⁶⁶.

2.3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Molekulargewicht von Proteinen ermittelt bzw. anhand der verwendeten Marker abgeschätzt. Das Protokoll für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist in 2.3.1.3 beschrieben.

2.3.10.3 CD-Spektroskopie von Proteinen

Die CD- (Circulardichroismus) Spektroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit primär zur Analyse der Sekundärstrukturverhältnisse von Proteinen verwendet. Ziel war es hier zu überprüfen, ob eingefügte Mutationen einen Einfluss auf die korrekte Faltung des Proteins haben bzw. ob solche Mutationen zu einem Strukturverlust des Proteins führen. Die CD-Spektren wurden in einem

Bereich von 260 nm bis 180 nm (*far UV*) mit einem J-710 Spektropolarimeter von Jasco aufgenommen. Für die Messungen wurde der fertige Ansatz (170 µl) in eine Hellma 121.000 Küvette (Schichtdicke 0.2 mm) überführt. Typischerweise lag die Proteinkonzentration bei 10 µM, des Weiteren sei zu erwähnen, dass ein spezieller CD-Puffer verwendet wurde (10 mM Natrium-Phosphat, pH 7.4). Die Proteinproben wurden am Vortag gegen den CD-Puffer dialysiert, um die CD-Messungen störende Pufferbestandteile zu entfernen.

2.3.10.4 Aktivierung der Nuklease CAD

Wie bereits beschrieben (2.3.8) kann die Nuklease CAD nicht alleine exprimiert werden. Vielmehr wird die Anwesenheit von ICAD/DFF45 benötigt, um potentiell aktive Nuklease CAD zu produzieren. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Nuklease zunächst mit ihrem Inhibitor ko-exprimiert und im Komplex gereinigt. Zur Aktivierung wurde der Komplex nun über Nacht mit rekombinanter Caspase-3 Δ1-28 in geeigneter Konzentration inkubiert und so ICAD abgespalten. Am Folgetag wurde der Ansatz erneut mit Glutathion-Sepharose inkubiert, um CAD über seinen GST-tag zu binden. Nach dem Waschen erfolgte die Elution (siehe 2.3.9.1.1). Die Eluate mit aktivierter Nuklease CAD wurden nun für mindestens 3 h dialysiert (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM 2-Mercaptoethanol) und anschließend auf eine Heparin-Säule geladen, um noch vorhandene ICAD Fragmente vollständig zu entfernen. Die Elution erfolgte über einen ansteigenden Salzgradienten (15 min, 0-1 M). Die Fraktionen, die aktivierte CAD enthielten, wurden danach gegen einen *storage*-Puffer dialysiert (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Aktivität der nach diesem Protokoll gereinigten Nuklease wurde in Nuklease-Aktivitätsassays (2.3.10.5) bestimmt.

2.3.10.5 Nuklease-Aktivitätsassay

Um die Aktivität von gereinigter CAD (typischerweise 100 nM) zu ermitteln, wurde das Enzym bei 37°C mit Plasmid-DNA (pBluescriptSK+) als Substrat (typischerweise 2.5 nM) in Spaltpuffer inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit Agaroseauftragspuffer gestoppt und die Spaltung der DNA auf einem Agarosegel analysiert.

Der Spaltpuffer bestand dabei aus folgenden Komponenten: 20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerol, 0.01% CHAPS und 7.5 mM MgCl₂.

2.3.10.6 Nuklease Inhibitionssassays (ICAD)

Um die inhibitorische Aktivität von verschiedenen ICAD Varianten zu messen, wurden die gereinigten ICAD Proteine in verschiedenen Konzentrationen mit bereits aktivierter CAD (typischerweise 100 nM) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der so über Nacht wiederhergestellte Komplex aus Nuklease und Inhibitor (DFF-Komplex) wurde nun mit Plasmid-DNA (pBluescriptSK+) als Substrat (typischerweise 2.5 nM) in Spaltpuffer (siehe 2.3.10.5) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNA Spaltung wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Zum Auswerten der Daten wurden mit Hilfe eines *BioDocAnalyze* Gel-Analyse Systems (Biometra) die Intensitäten der DNA-Banden gemessen. Anschließend wurde die Abnahme der *supercoiled* Plasmid-DNA (sc Plasmid-DNA) quantifiziert, um so die Spaltaktivität des wiederhergestellten DFF-Komplexes zu ermitteln.

2.3.10.7 Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD

Im Zuge der Untersuchung der Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD, im Hinblick auf die Caspase-3 Spaltstellen von ICAD, wurde dieser mit zusätzlichen Protease (TEV-Protease; Sequenz: ENLYFQSG) Spaltstellen modifiziert. Diese wurden direkt am jeweiligen C-terminalen Ende der Caspase-3 Schnittstellen (¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴) inseriert ¹⁴⁴. Durch diese Insertion konnte ICAD^{TEV} nun auch bei mutierten Caspase-3 Spaltstellen durch TEV-Protease gespalten und CAD aktiviert werden. Die Inkubation mit TEV-Protease erfolgte dabei nach Herstellerangaben, im empfohlenen Puffer. In weiteren Schritten wurden nun die Aminosäurereste der Caspase-3 Spaltstellen von ICAD^{TEV} sukzessive durch einen Alaninrest ersetzt. Für die Analyse wurde die hochsensitive Methode FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) gewählt, durch die mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten DNA-Substraten (*molecular beacons*) die Aktivität der Nuklease ermittelt werden konnte. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine nicht korrekt gefaltete Nuklease das DNA Substrat nicht oder mit einer geringeren Spaltaktivität schneidet. So wurden die verschiedenen ICAD Varianten mit CAD ko-exprimiert, gereinigt und im Versuch indirekt über die Aktivität der Nuklease CAD, auf ihr Faltungsvermögen hin getestet.

2.3.10.8 Fluoreszenzassays

Für die Fluoreszenzassays wurde ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Substrat (5'-terminaler 6-FAM, 3'-terminaler BHQ-1) verwendet. Dieses DNA-Substrat wurde mit Hilfe eines entsprechend markierten Oligonukleotids erstellt. Dazu wurde das Oligonukleotid für 20 min in einem Heizblock bei 95°C inkubiert und dann samt Heizblock über Nacht langsam auf RT abgekühlt. Durch dieses langsame Abkühlen wurde gewährleistet, dass das Oligonukleotid, aufgrund partiell komplementärer Regionen, die gewünschte Struktur (Stamm-Schleife-Struktur) annahm. In diesem Zustand ist die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffs (Donor) durch eine auf dem Förster-Resonanzenergietransfer basierende Energieübertragung auf den Quencher (Akzeptor) unterdrückt. Wird der *molecular beacon* jedoch mit der Nuklease inkubiert und dadurch von dieser gespalten, so kann nach Anregung eine Zunahme der Donorfluoreszenz beobachtet werden, da nun aufgrund der räumlichen Distanz von Donor und Quencher eine Abnahme des Energietransfers stattfindet. Die Zunahme der Donorfluoreszenz wurde in der vorliegenden Arbeit bei 517 nm mit Hilfe eines Fluoromax-4 Geräts der Firma Horiba Jobin-Yvon gemessen.

2.3.11 Die SPOT *peptide (array) synthesis* Methode

Die SPOT *peptide (array) synthesis* Methode (SPOT-Methode) ist eine Technik zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen ¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Mit ihr lassen sich große Peptid-*libraries* kosteneffektiv generieren ^{171, 172}. Die Konzentration der Peptide ist dabei ausreichend hoch, um biochemische Studien durchzuführen ¹⁷³. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die SPOT Methode primär angewendet, um die Wechselwirkungen der Nuklease CAD mit ihrem Inhibitor ICAD zu analysieren. Hierfür wurde die jeweilige Aminosäuresequenz von CAD und ICAD auf der Membran in Form von 20mer Peptiden synthetisiert und mit dem jeweiligen Bindungspartner inkubiert. Die Peptide wiesen dabei eine Überlappung von 14 Aminosäuren von *spot* zu *spot* auf.

2.3.11.1 Synthese der SPOT-Membranen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten SPOT-Membranen wurden in Kollaboration mit der Jacobs Universität zu Bremen in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Albert Jeltsch synthetisiert. Die Synthese der Membranen fand dabei über eine konventionelle Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield statt¹⁷⁴. In einem ersten Schritt wurde der *array*, also die Anordnung der *spots* auf der Membran (= Definition der *spots*), durch eine Kupplung von aktivierten, Fmoc (Fluorenyl-methoxy-carbonyl) geschützten, Aminosäurederivaten auf die „Amino“-Oberfläche der Cellulose-Membran erstellt (Abbildung 13).

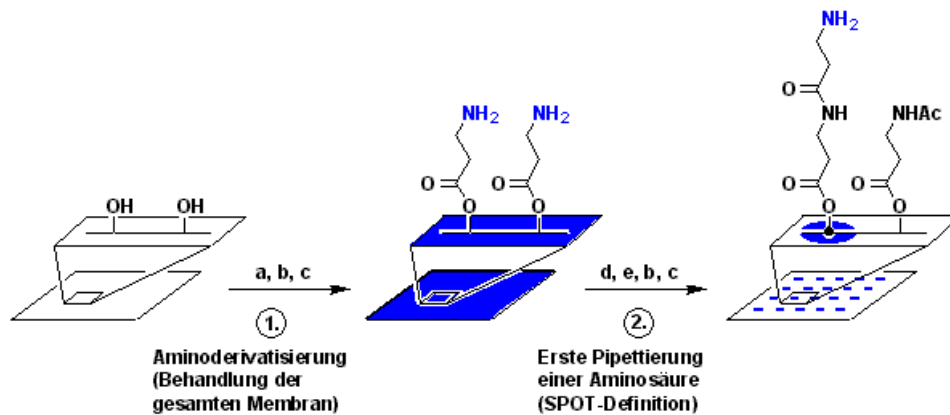


Abbildung 13: Schematische Darstellung der primären Schritte der SPOT-Membran Synthese

Die Abbildung skizziert schematisch die ersten Schritte der SPOT-Membran Synthese sowie die SPOT Definition. Schritt 1 zeigt die Aminoderivatisierung der Zellulosemembran durch Veresterung, Schritt 2 die anschließende SPOT-Definition durch Kupplung eines aktivierten Aminosäurederivats auf die Amino-Oberfläche der Cellulose-Membran. (Quelle: Darstellung und Screening von kombinatorischen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an planaren Oberflächen; Dissertation; Dirk Scharn; Humboldt-Universität zu Berlin)

Die übrigen Aminogruppen zwischen den *spots* wurden dabei durch Acetylierung geblockt. In einem nächsten Schritt wurden nun die Fmoc geschützten Aminosäurederivate durch Verwendung von DIC (Diisopropylcarbodiimid) aktiviert, um so die Kupplungsreaktion zu ermöglichen. Um das Entstehen hochreaktiver Acylharnstoff Produkte zu vermeiden (können Racemisierung der Aminosäuren verursachen) wurde HOBt (1-Hydroxy-benzotriazol) verwendet. So entsteht aus den Acylharnstoff Produkten eine weniger reaktive Esterverbindung. Die Fmoc-Schutzgruppe wurden nun mittels Piperidin-Zugabe vom Aminoterminus der Aminosäuren abgespalten und die Membran anschließend mit DMF (N,N Dimethylformamid) und Ethanol gewaschen. Nun konnte die nächste Syntheserunde beginnen. Im letzten Schritt der Kupplungsreaktion wurde TFA (Trifluoressigsäure) verwendet, um die funktionellen Seitengruppen der Peptide wieder zu aktivieren.

2.3.11.2 Anwendung der SPOT-Methode zur Analyse der CAD-ICAD Interaktionen

Die ICAD SPOT-Membran wurde zunächst über Nacht mit 5 % Milchpulver in TTBS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,3, 0,05% Tween-20 und 150 mM NaCl) geblockt. Am nächsten Tag wurde die SPOT-Membran dann für 10 Minuten mit TTBS-Puffer und anschließend für weitere 10 Minuten mit

Interaktions-Puffer (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) gewaschen. Die gewaschene ICAD-SPOT-Membran wurde nun für 90 Minuten mit 50 nM aktivierter GST-CAD in Interaktions-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran wieder für 10 Minuten mit Interaktions-Puffer und anschließend für 10 Minuten mit TTBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde nun mit einem anti-GST Antikörper in Block-Puffer (5 % Milchpulver in TTBS-Puffer) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit TTBS-Puffer wurde die Membran nun mit *horseradish peroxidase conjugated anti-goat* Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die SPOT-Membran wieder mit TTBS gewaschen und anschließend via ECL (*enhanced chemiluminescence*) -Reaktion analysiert und auf Interaktionen mit aktivierter CAD hin ausgewertet.

Das Protokoll für die Versuche mit der CAD SPOT-Membran ähnelte dem der ICAD SPOT-Membran. Hier wurde die CAD SPOT-Membran zunächst auch über Nacht mit 5 % Milchpulver in TTBS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.3, 0.05% Tween-20 und 150 mM NaCl) geblockt. Am nächsten Tag wurde die CAD SPOT-Membran dann für 10 Minuten mit TTBS-Puffer und anschließend für weitere 10 Minuten mit Interaktions-Puffer (20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) gewaschen. Die gewaschene CAD-SPOT-Membran wurde nun für 90 Minuten mit 50 nM HisFlag-ICAD-L in Interaktions-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran wieder für 10 Minuten mit Interaktions-Puffer und anschließend für 10 Minuten mit TTBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde nun mit einem anti-Flag Antikörper (*horseradish peroxidase conjugated*) in Block-Puffer (5 % Milchpulver in TTBS-Puffer) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurde die SPOT-Membran wieder mit TTBS gewaschen und anschließend via ECL (*enhanced chemiluminescence*) -Reaktion analysiert und auf Interaktionen mit ICAD hin ausgewertet.

Um unspezifische-elektrostatische Reaktionen zu vermindern wurden die Versuche mit den SPOT-Membranen auch mit höheren Salzkonzentrationen (0.5 M) im Wasch-Puffer wiederholt. Insgesamt wurden die Versuche mit beiden Membranen jeweils mindestens drei Mal durchgeführt.

2.3.11.3 Anwendung der SPOT-Methode zur Analyse der ICAD-ICAD Interaktionen

Neben den Versuchen zur Interaktion von CAD und ICAD wurde in der vorliegenden Arbeit auch ICAD-ICAD Interaktionen näher untersucht. Das Protokoll für die Versuche zur Analyse der ICAD-ICAD Interaktionen auf Basis der ICAD SPOT-Membran in Kombination mit HisFlag-ICAD-L entsprach dem der CAD SPOT-Membran (2.3.11.2).

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen (20mer Peptide mit einer Überlappung von 14 Aminosäuren von *spot* zu *spot*) der einzelnen *spots* der ICAD sowie der CAD SPOT-Membran tabellarisch dargestellt:

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der spots der ICAD und CAD SPOT-Membranen

ICAD SPOT-Membran:

Spot Nr.		Masse (Da)	Sequenz
1	A 1	2151.6	M-E-L-S-R-G-A-S-A-P-D-P-D-D-V-R-P-L-K-P
2	A 2	2233.7	A-S-A-P-D-P-D-D-V-R-P-L-K-P-C-L-L-R-R-N
3	A 3	2455.8	D-D-V-R-P-L-K-P-C-L-L-R-R-N-H-S-R-D-Q-H
4	A 4	2232.6	K-P-C-L-L-R-R-N-H-S-R-D-Q-H-G-V-A-A-S-S
5	A 5	2249.5	R-N-H-S-R-D-Q-H-G-V-A-A-S-S-L-E-E-L-R-S
6	A 6	2141.6	Q-H-G-V-A-A-S-S-L-E-E-L-R-S-K-A-C-E-L-L
7	A 7	2205.9	S-S-L-E-E-L-R-S-K-A-C-E-L-L-A-I-D-K-S-L
8	A 8	2171.9	R-S-K-A-C-E-L-L-A-I-D-K-S-L-T-P-I-T-L-V
9	A 9	2083.8	L-L-A-I-D-K-S-L-T-P-I-T-L-V-L-A-E-D-G-T
10	A10	2102.5	S-L-T-P-I-T-L-V-L-A-E-D-G-T-I-V-D-D-D-D
11	A11	2226.7	L-V-L-A-E-D-G-T-I-V-D-D-D-D-Y-F-L-C-L-P
12	A12	2262.7	G-T-I-V-D-D-D-D-Y-F-L-C-L-P-S-N-T-K-F-V
13	A13	2263.7	D-D-Y-F-L-C-L-P-S-N-T-K-F-V-A-L-A-C-N-E
14	A14	2314.7	L-P-S-N-T-K-F-V-A-L-A-C-N-E-K-W-T-Y-N-D
15	A15	2162.5	F-V-A-L-A-C-N-E-K-W-T-Y-N-D-S-D-G-G-T-A
16	A16	2274.4	N-E-K-W-T-Y-N-D-S-D-G-G-T-A-W-V-S-Q-E-S
17	A17	2141.2	N-D-S-D-G-G-T-A-W-V-S-Q-E-S-F-E-A-D-E-P
18	A18	2181.3	T-A-W-V-S-Q-E-S-F-E-A-D-E-P-D-S-R-A-G-V
19	A19	2235.5	E-S-F-E-A-D-E-P-D-S-R-A-G-V-K-W-K-N-V-A
20	A20	2326.7	E-P-D-S-R-A-G-V-K-W-K-N-V-A-R-Q-L-K-E-D
21	A21	2298	G-V-K-W-K-N-V-A-R-Q-L-K-E-D-L-S-S-I-I-L
22	B 1	2271.9	V-A-R-Q-L-K-E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L
23	B 2	2229.9	E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L-Q-A-L-I-D-I
24	B 3	2169.8	I-L-L-S-E-E-D-L-Q-A-L-I-D-I-P-C-A-E-L-A
25	B 4	2173.6	D-L-Q-A-L-I-D-I-P-C-A-E-L-A-Q-E-L-C-Q-S
26	B 5	2079.3	D-I-P-C-A-E-L-A-Q-E-L-C-Q-S-C-A-T-V-Q-G
27	B 6	2121.4	L-A-Q-E-L-C-Q-S-C-A-T-V-Q-G-L-Q-S-T-L-Q
28	B 7	2203.4	Q-S-C-A-T-V-Q-G-L-Q-S-T-L-Q-Q-V-L-D-Q-R
29	B 8	2314.5	Q-G-L-Q-S-T-L-Q-Q-V-L-D-Q-R-E-E-A-R-Q-S
30	B 9	2424.8	L-Q-Q-V-L-D-Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L
31	B10	2445.9	Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E
32	B11	2331	Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E-K-E-G-N-I-L
33	B12	2306.8	E-L-Y-L-Q-A-L-E-K-E-G-N-I-L-S-N-Q-K-E-S
34	B13	2188.7	L-E-K-E-G-N-I-L-S-N-Q-K-E-S-K-A-A-L-S-E
35	B14	2160.6	I-L-S-N-Q-K-E-S-K-A-A-L-S-E-E-L-D-A-V-D
36	B15	2076.4	E-S-K-A-A-L-S-E-E-L-D-A-V-D-T-G-V-G-R-E
37	B16	2107.4	S-E-E-L-D-A-V-D-T-G-V-G-R-E-M-A-S-E-V-L
38	B17	2173.7	V-D-T-G-V-G-R-E-M-A-S-E-V-L-L-R-S-Q-I-L
39	B18	2346	R-E-M-A-S-E-V-L-L-R-S-Q-I-L-T-T-L-K-E-K

40	B19	2236.9	V-L-L-R-S-Q-I-L-T-T-L-K-E-K-P-A-P-E-L-S
41	B20	2183.8	I-L-T-T-L-K-E-K-P-A-P-E-L-S-L-S-S-Q-D-L
42	B21	2173.5	E-K-P-A-P-E-L-S-L-S-S-Q-D-L-E-S-V-S-K-E
43	C 1	2117.6	L-S-L-S-S-Q-D-L-E-S-V-S-K-E-D-P-K-A-L-A
44	C 2	2173.6	D-L-E-S-V-S-K-E-D-P-K-A-L-A-V-A-L-S-W-D
45	C 3	2241.8	K-E-D-P-K-A-L-A-V-A-L-S-W-D-I-R-K-A-E-T
46	C 4	2203.6	L-A-V-A-L-S-W-D-I-R-K-A-E-T-V-Q-Q-A-C-T
47	C 5	2332.7	W-D-I-R-K-A-E-T-V-Q-Q-A-C-T-T-E-L-A-L-R
48	C 6	2246.4	E-T-V-Q-Q-A-C-T-T-E-L-A-L-R-L-Q-Q-V-Q-S
49	C 7	2310.7	C-T-T-E-L-A-L-R-L-Q-Q-V-Q-S-L-H-S-L-R-N
50	C 8	2362.9	L-R-L-Q-Q-V-Q-S-L-H-S-L-R-N-L-S-A-R-R-S
51	C 9	2215.7	Q-S-L-H-S-L-R-N-L-S-A-R-R-S-P-L-P-G-E-P
52	C10	2286.8	R-N-L-S-A-R-R-S-P-L-P-G-E-P-Q-R-P-K-R-A
53	C11	2318.8	R-R-S-P-L-P-G-E-P-Q-R-P-K-R-A-K-R-D-S-S

CAD SPOT-Membran:

Spot Nr.		Masse (Da)	Sequenz
1	E 1	2227.8	M-C-A-V-L-R-Q-P-K-C-V-K-L-R-A-L-H-S-A-C
2	E 2	2127.7	Q-P-K-C-V-K-L-R-A-L-H-S-A-C-K-F-G-V-A-A
3	E 3	2160.7	L-R-A-L-H-S-A-C-K-F-G-V-A-A-R-S-C-Q-E-L
4	E 4	2139.7	A-C-K-F-G-V-A-A-R-S-C-Q-E-L-L-R-K-G-C-V
5	E 5	2306.9	A-A-R-S-C-Q-E-L-L-R-K-G-C-V-R-F-Q-L-P-M
6	E 6	2304	E-L-L-R-K-G-C-V-R-F-Q-L-P-M-P-G-S-R-L-C
7	E 7	2285.8	C-V-R-F-Q-L-P-M-P-G-S-R-L-C-L-Y-E-D-G-T
8	E 8	2201.5	P-M-P-G-S-R-L-C-L-Y-E-D-G-T-E-V-T-D-D-C
9	E 9	2201.5	L-C-L-Y-E-D-G-T-E-V-T-D-D-C-F-P-G-L-P-N
10	E10	2119.5	G-T-E-V-T-D-D-C-F-P-G-L-P-N-D-A-E-L-L-L
11	E11	2089.6	D-C-F-P-G-L-P-N-D-A-E-L-L-L-L-T-A-G-E-T
12	E12	2186.6	P-N-D-A-E-L-L-L-L-T-A-G-E-T-W-H-G-Y-V-S
13	E13	2292.9	L-L-L-T-A-G-E-T-W-H-G-Y-V-S-D-I-T-R-F-L
14	E14	2397.7	E-T-W-H-G-Y-V-S-D-I-T-R-F-L-S-V-F-N-E-P
15	E15	2229.6	V-S-D-I-T-R-F-L-S-V-F-N-E-P-H-A-G-V-I-Q
16	E16	2210.7	F-L-S-V-F-N-E-P-H-A-G-V-I-Q-A-A-R-Q-L-L
17	E17	2130.4	E-P-H-A-G-V-I-Q-A-A-R-Q-L-L-S-D-E-Q-A-P
18	E18	2291.9	I-Q-A-A-R-Q-L-L-S-D-E-Q-A-P-L-R-Q-K-L-L
19	E19	2310.9	L-L-S-D-E-Q-A-P-L-R-Q-K-L-L-A-D-L-L-H-H
20	E20	2267.8	A-P-L-R-Q-K-L-L-A-D-L-L-H-H-V-S-Q-N-I-T
21	E21	2288.6	L-L-A-D-L-L-H-H-V-S-Q-N-I-T-A-E-T-R-E-Q
22	F 1	2411.4	H-H-V-S-Q-N-I-T-A-E-T-R-E-Q-D-P-S-W-F-E
23	F 2	2398.7	I-T-A-E-T-R-E-Q-D-P-S-W-F-E-G-L-E-S-R-F
24	F 3	2432.8	E-Q-D-P-S-W-F-E-G-L-E-S-R-F-R-N-K-S-G-Y

25	F 4	2442	F-E-G-L-E-S-R-F-R-N-K-S-G-Y-L-R-Y-S-C-E
26	F 5	2512.2	R-F-R-N-K-S-G-Y-L-R-Y-S-C-E-S-R-I-R-G-Y
27	F 6	2379	G-Y-L-R-Y-S-C-E-S-R-I-R-G-Y-L-R-E-V-S-A
28	F 7	2335.8	C-E-S-R-I-R-G-Y-L-R-E-V-S-A-Y-T-S-M-V-D
29	F 8	2248.5	G-Y-L-R-E-V-S-A-Y-T-S-M-V-D-E-A-A-Q-E-E
30	F 9	2232.6	S-A-Y-T-S-M-V-D-E-A-A-Q-E-E-Y-L-R-V-L-G
31	F10	2282.7	V-D-E-A-A-Q-E-E-Y-L-R-V-L-G-S-M-C-Q-K-L
32	F11	2388.9	E-E-Y-L-R-V-L-G-S-M-C-Q-K-L-K-S-V-Q-Y-N
33	F12	2324.9	L-G-S-M-C-Q-K-L-K-S-V-Q-Y-N-G-S-Y-F-D-R
34	F13	2207.7	K-L-K-S-V-Q-Y-N-G-S-Y-F-D-R-G-A-E-A-S-S
35	F14	2223.6	Y-N-G-S-Y-F-D-R-G-A-E-A-S-S-R-L-C-T-P-E
36	F15	2200.5	D-R-G-A-E-A-S-S-R-L-C-T-P-E-G-W-F-S-C-Q
37	F16	2259.6	S-S-R-L-C-T-P-E-G-W-F-S-C-Q-G-P-F-D-L-E
38	F17	2267.6	P-E-G-W-F-S-C-Q-G-P-F-D-L-E-S-C-L-S-K-H
39	F18	2195.6	C-Q-G-P-F-D-L-E-S-C-L-S-K-H-S-I-N-P-Y-G
40	F19	2303.8	L-E-S-C-L-S-K-H-S-I-N-P-Y-G-N-R-E-S-R-I
41	F20	2419.9	K-H-S-I-N-P-Y-G-N-R-E-S-R-I-L-F-S-T-W-N
42	F21	2464	Y-G-N-R-E-S-R-I-L-F-S-T-W-N-L-D-H-I-I-E
43	G 1	2469.1	R-I-L-F-S-T-W-N-L-D-H-I-I-E-K-K-R-T-V-V
44	G 2	2333.8	W-N-L-D-H-I-I-E-K-K-R-T-V-V-P-T-L-A-E-A
45	G 3	2253.7	I-E-K-K-R-T-V-V-P-T-L-A-E-A-I-Q-D-G-R-E
46	G 4	2336.6	V-V-P-T-L-A-E-A-I-Q-D-G-R-E-V-N-W-E-Y-F
47	G 5	2480.9	E-A-I-Q-D-G-R-E-V-N-W-E-Y-F-Y-S-L-L-F-T
48	G 6	2536.1	R-E-V-N-W-E-Y-F-Y-S-L-L-F-T-A-E-N-L-K-L
49	G 7	2383	Y-F-Y-S-L-L-F-T-A-E-N-L-K-L-V-H-I-A-C-H
50	G 8	2319.8	F-T-A-E-N-L-K-L-V-H-I-A-C-H-K-K-T-T-H-K
51	G 9	2347.8	K-L-V-H-I-A-C-H-K-K-T-T-H-K-L-E-C-D-R-S
52	G10	2499.9	C-H-K-K-T-T-H-K-L-E-C-D-R-S-R-I-Y-R-P-Q
53	G11	2487	H-K-L-E-C-D-R-S-R-I-Y-R-P-Q-T-G-S-R-R-K
54	G12	2470.1	R-S-R-I-Y-R-P-Q-T-G-S-R-R-K-Q-P-A-R-K-K
55	G13	2403	P-Q-T-G-S-R-R-K-Q-P-A-R-K-K-R-P-A-R-K-R

2.3.11.4 Anwendung der SPOT-Methode zur Analyse der CAD-Topoisomerase II α Interaktionen

Zwecks näherer Untersuchung der CAD-Topoisomerase II α Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit neben der CAD bzw. ICAD SPOT-Membran auch eine Topoisomerase II α SPOT-Membran synthetisiert. Das Protokoll für die Versuche mit der Topoisomerase II α SPOT-Membran in Kombination mit GST-CAD entsprach dem der ICAD SPOT-Membran (2.3.11.2).

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen (15mer Peptide mit einer Überlappung von 10 Aminosäuren von *spot* zu *spot*) der einzelnen *spots* der Topoisomerase II α SPOT-Membran tabellarisch dargestellt:

Tabelle 2: Aminosäuresequenzen der spots der Topoisomerase II α SPOT-MembranTopoisomerase II α SPOT-Membran:

SpotNo	Masse (Da)	Sequenz	
1	J 1	1714.8	M-E-V-S-P-L-Q-P-V-N-E-N-M-Q-V
2	J 2	1783.1	L-Q-P-V-N-E-N-M-Q-V-N-K-I-K-K
3	J 3	1789.1	E-N-M-Q-V-N-K-I-K-K-N-E-D-A-K
4	J 4	1771.3	N-K-I-K-K-N-E-D-A-K-K-R-L-S-V
5	J 5	1849.2	N-E-D-A-K-K-R-L-S-V-E-R-I-Y-Q
6	J 6	1890.4	K-R-L-S-V-E-R-I-Y-Q-K-K-T-Q-L
7	J 7	1912.4	E-R-I-Y-Q-K-K-T-Q-L-E-H-I-L-L
8	J 8	1855.3	K-K-T-Q-L-E-H-I-L-L-R-P-D-T-Y
9	J 9	1742.1	E-H-I-L-L-R-P-D-T-Y-I-G-S-V-E
10	J10	1705.9	R-P-D-T-Y-I-G-S-V-E-L-V-T-Q-Q
11	J11	1768	I-G-S-V-E-L-V-T-Q-Q-M-W-V-Y-D
12	J12	1796	L-V-T-Q-Q-M-W-V-Y-D-E-D-V-G-I
13	J13	1888.1	M-W-V-Y-D-E-D-V-G-I-N-Y-R-E-V
14	J14	1694.9	E-D-V-G-I-N-Y-R-E-V-T-F-V-P-G
15	J15	1846.3	N-Y-R-E-V-T-F-V-P-G-L-Y-K-I-F
16	J16	1754.3	T-F-V-P-G-L-Y-K-I-F-D-E-I-L-V
17	J17	1738.2	L-Y-K-I-F-D-E-I-L-V-N-A-A-D-N
18	J18	1697.9	D-E-I-L-V-N-A-A-D-N-K-Q-R-D-P
19	J19	1691	N-A-A-D-N-K-Q-R-D-P-K-M-S-C-I
20	J20	1790.2	K-Q-R-D-P-K-M-S-C-I-R-V-T-I-D
21	J21	1733.1	K-M-S-C-I-R-V-T-I-D-P-E-N-N-L
22	K 1	1784.1	R-V-T-I-D-P-E-N-N-L-I-S-I-W-N
23	K 2	1669.1	P-E-N-N-L-I-S-I-W-N-N-G-K-G-I
24	K 3	1663	I-S-I-W-N-N-G-K-G-I-P-V-V-E-H
25	K 4	1665	N-G-K-G-I-P-V-V-E-H-K-V-E-K-M
26	K 5	1739	P-V-V-E-H-K-V-E-K-M-Y-V-P-A-L
27	K 6	1736.3	K-V-E-K-M-Y-V-P-A-L-I-F-G-Q-L
28	K 7	1623.1	Y-V-P-A-L-I-F-G-Q-L-L-T-S-S-N
29	K 8	1717	I-F-G-Q-L-L-T-S-S-N-Y-D-D-D-E
30	K 9	1671.9	L-T-S-S-N-Y-D-D-D-E-K-K-V-T-G
31	K10	1717	Y-D-D-D-E-K-K-V-T-G-G-R-N-G-Y
32	K11	1552.1	K-K-V-T-G-G-R-N-G-Y-G-A-K-L-C
33	K12	1601.1	G-R-N-G-Y-G-A-K-L-C-N-I-F-S-T
34	K13	1658.1	G-A-K-L-C-N-I-F-S-T-K-F-T-V-E
35	K14	1730	N-I-F-S-T-K-F-T-V-E-T-A-S-R-E
36	K15	1865.3	K-F-T-V-E-T-A-S-R-E-Y-K-K-M-F
37	K16	1935.4	T-A-S-R-E-Y-K-K-M-F-K-Q-T-W-M
38	K17	1964.5	Y-K-K-M-F-K-Q-T-W-M-D-N-M-G-R

39	K18	1784.1	K-Q-T-W-M-D-N-M-G-R-A-G-E-M-E
40	K19	1709.1	D-N-M-G-R-A-G-E-M-E-L-K-P-F-N
41	K20	1701	A-G-E-M-E-L-K-P-F-N-G-E-D-Y-T
42	K21	1776.1	L-K-P-F-N-G-E-D-Y-T-C-I-T-F-Q
43	L 1	1717	G-E-D-Y-T-C-I-T-F-Q-P-D-L-S-K
44	L 2	1773.2	C-I-T-F-Q-P-D-L-S-K-F-K-M-Q-S
45	L 3	1765.3	P-D-L-S-K-F-K-M-Q-S-L-D-K-D-I
46	L 4	1738.3	F-K-M-Q-S-L-D-K-D-I-V-A-L-M-V
47	L 5	1778.3	L-D-K-D-I-V-A-L-M-V-R-R-A-Y-D
48	L 6	1623.1	V-A-L-M-V-R-R-A-Y-D-I-A-G-S-T
49	L 7	1679.1	R-R-A-Y-D-I-A-G-S-T-K-D-V-K-V
50	L 8	1563	I-A-G-S-T-K-D-V-K-V-F-L-N-G-N
51	L 9	1699.2	K-D-V-K-V-F-L-N-G-N-K-L-P-V-K
52	L10	1740.3	F-L-N-G-N-K-L-P-V-K-G-F-R-S-Y
53	L11	1816.4	K-L-P-V-K-G-F-R-S-Y-V-D-M-Y-L
54	L12	1850.4	G-F-R-S-Y-V-D-M-Y-L-K-D-K-L-D
55	L13	1728.1	V-D-M-Y-L-K-D-K-L-D-E-T-G-N-S
56	L14	1697.1	K-D-K-L-D-E-T-G-N-S-L-K-V-I-H
57	L15	1704.8	E-T-G-N-S-L-K-V-I-H-E-Q-V-N-H
58	L16	1890	L-K-V-I-H-E-Q-V-N-H-R-W-E-V-C
59	L17	1860.9	E-Q-V-N-H-R-W-E-V-C-L-T-M-S-E
60	L18	1842.1	R-W-E-V-C-L-T-M-S-E-K-G-F-Q-Q
61	L19	1729.1	L-T-M-S-E-K-G-F-Q-Q-I-S-F-V-N
62	L20	1627	K-G-F-Q-Q-I-S-F-V-N-S-I-A-T-S
63	L21	1574	I-S-F-V-N-S-I-A-T-S-K-G-G-R-H
64	M 1	1560.9	S-I-A-T-S-K-G-G-R-H-V-D-Y-V-A
65	M 2	1657.9	K-G-G-R-H-V-D-Y-V-A-D-Q-I-V-T
66	M 3	1676.9	V-D-Y-V-A-D-Q-I-V-T-K-L-V-D-V
67	M 4	1727.1	D-Q-I-V-T-K-L-V-D-V-V-K-K-K-N
68	M 5	1583.1	K-L-V-D-V-V-K-K-K-N-K-G-G-V-A
69	M 6	1592	V-K-K-K-N-K-G-G-V-A-V-K-A-H-Q
70	M 7	1603.9	K-G-G-V-A-V-K-A-H-Q-V-K-N-H-M
71	M 8	1851.1	V-K-A-H-Q-V-K-N-H-M-W-I-F-V-N
72	M 9	1828.2	V-K-N-H-M-W-I-F-V-N-A-L-I-E-N
73	M10	1766.1	W-I-F-V-N-A-L-I-E-N-P-T-F-D-S
74	M11	1706.9	A-L-I-E-N-P-T-F-D-S-Q-T-K-E-N
75	M12	1736.9	P-T-F-D-S-Q-T-K-E-N-M-T-L-Q-P
76	M13	1696	Q-T-K-E-N-M-T-L-Q-P-K-S-F-G-S
77	M14	1628	M-T-L-Q-P-K-S-F-G-S-T-C-Q-L-S
78	M15	1703.2	K-S-F-G-S-T-C-Q-L-S-E-K-F-I-K
79	M16	1612.1	T-C-Q-L-S-E-K-F-I-K-A-A-I-G-C
80	M17	1565.1	E-K-F-I-K-A-A-I-G-C-G-I-V-E-S
81	M18	1545	A-A-I-G-C-G-I-V-E-S-I-L-N-W-V
82	M19	1732.2	G-I-V-E-S-I-L-N-W-V-K-F-K-A-Q
83	M20	1829.3	I-L-N-W-V-K-F-K-A-Q-V-Q-L-N-K

84	M21	1692.1	K-F-K-A-Q-V-Q-L-N-K-K-C-S-A-V
85	N 1	1738.1	V-Q-L-N-K-K-C-S-A-V-K-H-N-R-I
86	N 2	1679.2	K-C-S-A-V-K-H-N-R-I-K-G-I-P-K
87	N 3	1719.2	K-H-N-R-I-K-G-I-P-K-L-D-D-A-N
88	N 4	1527	K-G-I-P-K-L-D-D-A-N-D-A-G-G-R
89	N 5	1537.7	L-D-D-A-N-D-A-G-G-R-N-S-T-E-C
90	N 6	1550.9	D-A-G-G-R-N-S-T-E-C-T-L-I-L-T
91	N 7	1553.8	N-S-T-E-C-T-L-I-L-T-E-G-D-S-A
92	N 8	1532	T-L-I-L-T-E-G-D-S-A-K-T-L-A-V
93	N 9	1403.8	E-G-D-S-A-K-T-L-A-V-S-G-L-G-V
94	N10	1500	K-T-L-A-V-S-G-L-G-V-V-G-R-D-K
95	N11	1551	S-G-L-G-V-V-G-R-D-K-Y-G-V-F-P
96	N12	1705.3	V-G-R-D-K-Y-G-V-F-P-L-R-G-K-I
97	N13	1761.3	Y-G-V-F-P-L-R-G-K-I-L-N-V-R-E
98	N14	1749.2	L-R-G-K-I-L-N-V-R-E-A-S-H-K-Q
99	N15	1740	L-N-V-R-E-A-S-H-K-Q-I-M-E-N-A
100	N16	1712	A-S-H-K-Q-I-M-E-N-A-E-I-N-N-I
101	N17	1671.2	I-M-E-N-A-E-I-N-N-I-I-K-I-V-G
102	N18	1773.4	E-I-N-N-I-I-K-I-V-G-L-Q-Y-K-K
103	N19	1840.3	I-K-I-V-G-L-Q-Y-K-K-N-Y-E-D-E
104	N20	1874.2	L-Q-Y-K-K-N-Y-E-D-E-D-S-L-K-T
105	N21	1831.2	N-Y-E-D-E-D-S-L-K-T-L-R-Y-G-K
106	O 1	1770.5	D-S-L-K-T-L-R-Y-G-K-I-M-I-M-T
107	O 2	1827.3	L-R-Y-G-K-I-M-I-M-T-D-Q-D-Q-D
108	O 3	1732.1	I-M-I-M-T-D-Q-D-Q-D-G-S-H-I-K
109	O 4	1653	D-Q-D-Q-D-G-S-H-I-K-G-L-L-I-N
110	O 5	1700.2	G-S-H-I-K-G-L-L-I-N-F-I-H-H-N
111	O 6	1774.3	G-L-L-I-N-F-I-H-H-N-W-P-S-L-L
112	O 7	1973.4	F-I-H-H-N-W-P-S-L-L-R-H-R-F-L
113	O 8	1944.4	W-P-S-L-L-R-H-R-F-L-E-E-F-I-T
114	O 9	1884.3	R-H-R-F-L-E-E-F-I-T-P-I-V-K-V
115	O10	1760.1	E-E-F-I-T-P-I-V-K-V-S-K-N-K-Q
116	O11	1782.2	P-I-V-K-V-S-K-N-K-Q-E-M-A-F-Y
117	O12	1819.2	S-K-N-K-Q-E-M-A-F-Y-S-L-P-E-F
118	O13	1893.2	E-M-A-F-Y-S-L-P-E-F-E-E-W-K-S
119	O14	1787.9	S-L-P-E-F-E-E-W-K-S-S-T-P-N-H
120	O15	1884.1	E-E-W-K-S-S-T-P-N-H-K-K-W-K-V
121	O16	1864.3	S-T-P-N-H-K-K-W-K-V-K-Y-Y-K-G
122	O17	1787.4	K-K-W-K-V-K-Y-Y-K-G-L-G-T-S-T
123	O18	1661.2	K-Y-Y-K-G-L-G-T-S-T-S-K-E-A-K
124	O19	1647	L-G-T-S-T-S-K-E-A-K-E-Y-F-A-D
125	O20	1896.3	S-K-E-A-K-E-Y-F-A-D-M-K-R-H-R
126	O21	2032.5	E-Y-F-A-D-M-K-R-H-R-I-Q-F-K-Y
127	P 1	1892.3	M-K-R-H-R-I-Q-F-K-Y-S-G-P-E-D
128	P 2	1641	I-Q-F-K-Y-S-G-P-E-D-D-A-A-I-S

129	P 3	1507.9	S-G-P-E-D-D-A-A-I-S-L-A-F-S-K
130	P 4	1622.1	D-A-A-I-S-L-A-F-S-K-K-Q-I-D-D
131	P 5	1877.4	L-A-F-S-K-K-Q-I-D-D-R-K-E-W-L
132	P 6	1953.3	K-Q-I-D-D-R-K-E-W-L-T-N-F-M-E
133	P 7	2065.4	R-K-E-W-L-T-N-F-M-E-D-R-R-Q-R
134	P 8	1877.4	T-N-F-M-E-D-R-R-Q-R-K-L-L-G-L
135	P 9	1872.4	D-R-R-Q-R-K-L-L-G-L-P-E-D-Y-L
136	P10	1711.2	K-L-L-G-L-P-E-D-Y-L-Y-G-Q-T-T
137	P11	1828.1	P-E-D-Y-L-Y-G-Q-T-T-Y-L-T-Y
138	P12	1814.1	Y-G-Q-T-T-T-Y-L-T-Y-N-D-F-I-N
139	P13	1860.4	T-Y-L-T-Y-N-D-F-I-N-K-E-L-I-L
140	P14	1769.2	N-D-F-I-N-K-E-L-I-L-F-S-N-S-D
141	P15	1765.2	K-E-L-I-L-F-S-N-S-D-N-E-R-S-I
142	P16	1697.9	F-S-N-S-D-N-E-R-S-I-P-S-M-V-D
143	P17	1600	N-E-R-S-I-P-S-M-V-D-G-L-K-P-G
144	P18	1625.1	P-S-M-V-D-G-L-K-P-G-Q-R-K-V-L
145	P19	1722.3	G-L-K-P-G-Q-R-K-V-L-F-T-C-F-K
146	P20	1939.4	Q-R-K-V-L-F-T-C-F-K-R-N-D-K-R
147	P21	1841.2	F-T-C-F-K-R-N-D-K-R-E-V-K-V-A
148	Q 1	1671	R-N-D-K-R-E-V-K-V-A-Q-L-A-G-S
149	Q 2	1518.8	E-V-K-V-A-Q-L-A-G-S-V-A-E-M-S
150	Q 3	1573.8	Q-L-A-G-S-V-A-E-M-S-S-Y-H-H-G
151	Q 4	1709	V-A-E-M-S-S-Y-H-H-G-E-M-S-L-M
152	Q 5	1764.2	S-Y-H-H-G-E-M-S-L-M-M-T-I-I-N
153	Q 6	1756.3	E-M-S-L-M-M-T-I-I-N-L-A-Q-N-F
154	Q 7	1636	M-T-I-I-N-L-A-Q-N-F-V-G-S-N-N
155	Q 8	1645	L-A-Q-N-F-V-G-S-N-N-L-N-L-L-Q
156	Q 9	1614	V-G-S-N-N-L-N-L-L-Q-P-I-G-Q-F
157	Q10	1707.2	L-N-L-L-Q-P-I-G-Q-F-G-T-R-L-H
158	Q11	1570	P-I-G-Q-F-G-T-R-L-H-G-G-K-D-S
159	Q12	1602	G-T-R-L-H-G-G-K-D-S-A-S-P-R-Y
160	Q13	1643.2	G-G-K-D-S-A-S-P-R-Y-I-F-T-M-L
161	Q14	1713.3	A-S-P-R-Y-I-F-T-M-L-S-S-L-A-R
162	Q15	1706.4	I-F-T-M-L-S-S-L-A-R-L-L-F-P-P
163	Q16	1697.1	S-S-L-A-R-L-L-F-P-P-K-D-D-H-T
164	Q17	1847.4	L-L-F-P-P-K-D-D-H-T-L-K-F-L-Y
165	Q18	1908.2	K-D-D-H-T-L-K-F-L-Y-D-D-N-Q-R
166	Q19	1952.2	L-K-F-L-Y-D-D-N-Q-R-V-E-P-E-W
167	Q20	1887.1	D-D-N-Q-R-V-E-P-E-W-Y-I-P-I-I
168	Q21	1812.3	V-E-P-E-W-Y-I-P-I-I-P-M-V-L-I
169	R 1	1600.2	Y-I-P-I-I-P-M-V-L-I-N-G-A-E-G
170	R 2	1515	P-M-V-L-I-N-G-A-E-G-I-G-T-G-W
171	R 3	1489.9	N-G-A-E-G-I-G-T-G-W-S-C-K-I-P
172	R 4	1693.1	I-G-T-G-W-S-C-K-I-P-N-F-D-V-R
173	R 5	1748	S-C-K-I-P-N-F-D-V-R-E-I-V-N-N

174	R 6	1889.3	N-F-D-V-R-E-I-V-N-N-I-R-R-L-M
175	R 7	1785.1	E-I-V-N-N-I-R-R-L-M-D-G-E-E-P
176	R 8	1767.3	I-R-R-L-M-D-G-E-E-P-L-P-M-L-P
177	R 9	1737.1	D-G-E-E-P-L-P-M-L-P-S-Y-K-N-F
178	R10	1738.3	L-P-M-L-P-S-Y-K-N-F-K-G-T-I-E
179	R11	1711.1	S-Y-K-N-F-K-G-T-I-E-E-L-A-P-N
180	R12	1662	K-G-T-I-E-E-L-A-P-N-Q-Y-V-I-S
181	R13	1602.9	E-L-A-P-N-Q-Y-V-I-S-G-E-V-A-I
182	R14	1594.9	Q-Y-V-I-S-G-E-V-A-I-L-N-S-T-T
183	R15	1575.9	G-E-V-A-I-L-N-S-T-T-I-E-I-S-E
184	R16	1673	L-N-S-T-T-I-E-I-S-E-L-P-V-R-T
185	R17	1836.1	I-E-I-S-E-L-P-V-R-T-W-T-Q-T-Y
186	R18	1862.1	L-P-V-R-T-W-T-Q-T-Y-K-E-Q-V-L
187	R19	1880.1	W-T-Q-T-Y-K-E-Q-V-L-E-P-M-L-N
188	R20	1717	K-E-Q-V-L-E-P-M-L-N-G-T-E-K-T
189	R21	1641	E-P-M-L-N-G-T-E-K-T-P-P-L-I-T
190	S 1	1783.1	G-T-E-K-T-P-P-L-I-T-D-Y-R-E-Y
191	S 2	1822	P-P-L-I-T-D-Y-R-E-Y-H-T-D-T-T
192	S 3	1873	D-Y-R-E-Y-H-T-D-T-T-V-K-F-V-V
193	S 4	1764.9	H-T-D-T-T-V-K-F-V-V-K-M-T-E-E
194	S 5	1722.1	V-K-F-V-V-K-M-T-E-E-K-L-A-E-A
195	S 6	1704.1	K-M-T-E-E-K-L-A-E-A-E-R-V-G-L
196	S 7	1725.2	K-L-A-E-A-E-R-V-G-L-H-K-V-F-K
197	S 8	1755.2	E-R-V-G-L-H-K-V-F-K-L-Q-T-S-L
198	S 9	1737.1	H-K-V-F-K-L-Q-T-S-L-T-C-N-S-M
199	S10	1709	L-Q-T-S-L-T-C-N-S-M-V-L-F-D-H
200	S11	1667	T-C-N-S-M-V-L-F-D-H-V-G-C-L-K
201	S12	1737.1	V-L-F-D-H-V-G-C-L-K-K-Y-D-T-V
202	S13	1736.3	V-G-C-L-K-K-Y-D-T-V-L-D-I-L-R
203	S14	1887.4	K-Y-D-T-V-L-D-I-L-R-D-F-F-E-L
204	S15	2004.7	L-D-I-L-R-D-F-F-E-L-R-L-K-Y-Y
205	S16	1977.6	D-F-F-E-L-R-L-K-Y-Y-G-L-R-K-E
206	S17	1926.7	R-L-K-Y-Y-G-L-R-K-E-W-L-L-G-M
207	S18	1660.3	G-L-R-K-E-W-L-L-G-M-L-G-A-E-S
208	S19	1617.2	W-L-L-G-M-L-G-A-E-S-A-K-L-N-N
209	S20	1632.1	L-G-A-E-S-A-K-L-N-N-Q-A-R-F-I
210	S21	1773.3	A-K-L-N-N-Q-A-R-F-I-L-E-K-I-D
211	T 1	1757.5	Q-A-R-F-I-L-E-K-I-D-G-K-I-I-I
212	T 2	1738.4	L-E-K-I-D-G-K-I-I-I-E-N-K-P-K
213	T 3	1751.5	G-K-I-I-I-E-N-K-P-K-K-E-L-I-K
214	T 4	1836.4	E-N-K-P-K-K-E-L-I-K-V-L-I-Q-R
215	T 5	1777.3	K-E-L-I-K-V-L-I-Q-R-G-Y-D-S-D
216	T 6	1747.1	V-L-I-Q-R-G-Y-D-S-D-P-V-K-A-W
217	T 7	1721.9	G-Y-D-S-D-P-V-K-A-W-K-E-A-Q-Q
218	T 8	1752.9	P-V-K-A-W-K-E-A-Q-Q-K-V-P-D-E

219	T 9	1801.7	K-E-A-Q-Q-K-V-P-D-E-E-E-N-E-E
220	T10	1790.7	K-V-P-D-E-E-E-N-E-E-S-D-N-E-K
221	T11	1796.7	E-E-N-E-E-S-D-N-E-K-E-T-E-K-S
222	T12	1683.7	S-D-N-E-K-E-T-E-K-S-D-S-V-T-D
223	T13	1599.7	E-T-E-K-S-D-S-V-T-D-S-G-P-T-F
224	T14	1643.9	D-S-V-T-D-S-G-P-T-F-N-Y-L-L-D
225	T15	1817.3	S-G-P-T-F-N-Y-L-L-D-M-P-L-W-Y
226	T16	1927.5	N-Y-L-L-D-M-P-L-W-Y-L-T-K-E-K
227	T17	1897.4	M-P-L-W-Y-L-T-K-E-K-K-D-E-L-C
228	T18	1875.3	L-T-K-E-K-K-D-E-L-C-R-L-R-N-E
229	T19	1903.2	K-D-E-L-C-R-L-R-N-E-K-E-Q-E-L
230	T20	1928.3	R-L-R-N-E-K-E-Q-E-L-D-T-L-K-R
231	T21	1774.1	K-E-Q-E-L-D-T-L-K-R-K-S-P-S-D
232	U 1	1818.2	D-T-L-K-R-K-S-P-S-D-L-W-K-E-D
233	U 2	1750.2	K-S-P-S-D-L-W-K-E-D-L-A-T-F-I
234	U 3	1807.2	L-W-K-E-D-L-A-T-F-I-E-E-L-E-A
235	U 4	1692	L-A-T-F-I-E-E-L-E-A-V-E-A-K-E
236	U 5	1774.8	E-E-L-E-A-V-E-A-K-E-K-Q-D-E-Q
237	U 6	1626.8	V-E-A-K-E-K-Q-D-E-Q-V-G-L-P-G
238	U 7	1511.9	K-Q-D-E-Q-V-G-L-P-G-K-G-G-K-A
239	U 8	1426.1	V-G-L-P-G-K-G-G-K-A-K-G-K-K-T
240	U 9	1561.1	K-G-G-K-A-K-G-K-K-T-Q-M-A-E-V
241	U10	1670.1	K-G-K-K-T-Q-M-A-E-V-L-P-S-P-R
242	U11	1681	Q-M-A-E-V-L-P-S-P-R-G-Q-R-V-I
243	U12	1703.2	L-P-S-P-R-G-Q-R-V-I-P-R-I-T-I
244	U13	1741.2	G-Q-R-V-I-P-R-I-T-I-E-M-K-A-E
245	U14	1758.2	P-R-I-T-I-E-M-K-A-E-A-E-K-K-N
246	U15	1803.4	E-M-K-A-E-A-E-K-K-N-K-K-K-I-K
247	U16	1802.2	A-E-K-K-N-K-K-K-I-K-N-E-N-T-E
248	U17	1730	K-K-K-I-K-N-E-N-T-E-G-S-P-Q-E
249	U18	1617.6	N-E-N-T-E-G-S-P-Q-E-D-G-V-E-L
250	U19	1585.8	G-S-P-Q-E-D-G-V-E-L-E-G-L-K-Q
251	U20	1742.2	D-G-V-E-L-E-G-L-K-Q-R-L-E-K-K
252	U21	1867.3	E-G-L-K-Q-R-L-E-K-K-Q-K-R-E-P
253	V 1	1827.3	R-L-E-K-K-Q-K-R-E-P-G-T-K-T-K
254	V 2	1744.1	Q-K-R-E-P-G-T-K-T-K-K-Q-T-T-L
255	V 3	1662.2	G-T-K-T-K-K-Q-T-T-L-A-F-K-P-I
256	V 4	1716.4	K-Q-T-T-L-A-F-K-P-I-K-K-G-K-K
257	V 5	1785.4	A-F-K-P-I-K-K-G-K-K-R-N-P-W-S
258	V 6	1762.1	K-K-G-K-K-R-N-P-W-S-D-S-E-S-D
259	V 7	1766.8	R-N-P-W-S-D-S-E-S-D-R-S-S-D-E
260	V 8	1688.7	D-S-E-S-D-R-S-S-D-E-S-N-F-D-V
261	V 9	1735.8	R-S-S-D-E-S-N-F-D-V-P-P-R-E-T
262	V10	1770.9	S-N-F-D-V-P-P-R-E-T-E-P-R-R-A
263	V11	1738	P-P-R-E-T-E-P-R-R-A-A-T-K-T-K

264	V12	1765.2	E-P-R-R-A-A-T-K-T-K-F-T-M-D-L
265	V13	1717	A-T-K-T-K-F-T-M-D-L-D-S-D-E-D
266	V14	1799	F-T-M-D-L-D-S-D-E-D-F-S-D-F-D
267	V15	1779.8	D-S-D-E-D-F-S-D-F-D-E-K-T-D-D
268	V16	1805.9	F-S-D-F-D-E-K-T-D-D-E-D-F-V-P
269	V17	1651.7	E-K-T-D-D-E-D-F-V-P-S-D-A-S-P
270	V18	1618.8	E-D-F-V-P-S-D-A-S-P-P-K-T-K-T
271	V19	1543.9	S-D-A-S-P-P-K-T-K-T-S-P-K-L-S
272	V20	1699.2	P-K-T-K-T-S-P-K-L-S-N-K-E-L-K
273	V21	1683.1	S-P-K-L-S-N-K-E-L-K-P-Q-K-S-V
274	W 1	1714	N-K-E-L-K-P-Q-K-S-V-V-S-D-L-E
275	W 2	1629.8	P-Q-K-S-V-V-S-D-L-E-A-D-D-V-K
276	W 3	1543.8	V-S-D-L-E-A-D-D-V-K-G-S-V-P-L
277	W 4	1455.7	A-D-D-V-K-G-S-V-P-L-S-S-P-P
278	W 5	1480.7	G-S-V-P-L-S-S-S-P-P-A-T-H-F-P
279	W 6	1614.7	S-S-S-P-P-A-T-H-F-P-D-E-T-E-I
280	W 7	1667.7	A-T-H-F-P-D-E-T-E-I-T-N-P-V-P
281	W 8	1684.8	D-E-T-E-I-T-N-P-V-P-K-K-N-V-T
282	W 9	1624.9	T-N-P-V-P-K-K-N-V-T-V-K-K-T-A
283	W10	1618	K-K-N-V-T-V-K-K-T-A-A-K-S-Q-S
284	W11	1524.8	V-K-K-T-A-A-K-S-Q-S-S-T-S-T-T
285	W12	1537.9	A-K-S-Q-S-S-T-S-T-T-G-A-K-K-R
286	W13	1460.9	S-T-S-T-T-G-A-K-K-R-A-A-P-K-G
287	W14	1581.1	G-A-K-K-R-A-A-P-K-G-T-K-R-D-P
288	W15	1482.9	A-A-P-K-G-T-K-R-D-P-A-L-N-S-G
289	W16	1597.9	T-K-R-D-P-A-L-N-S-G-V-S-Q-K-P
290	W17	1512.8	A-L-N-S-G-V-S-Q-K-P-D-P-A-K-T
291	W18	1753.1	V-S-Q-K-P-D-P-A-K-T-K-N-R-R-K
292	W19	1783.2	D-P-A-K-T-K-N-R-R-K-R-K-P-S-T
293	W20	1790.1	K-N-R-R-K-R-K-P-S-T-S-D-D-S-D
294	W21	1712.9	R-K-P-S-T-S-D-D-S-D-S-N-F-E-K
295	X 1	1641.9	S-D-D-S-D-S-N-F-E-K-I-V-S-K-A
296	X 2	1666.1	S-N-F-E-K-I-V-S-K-A-V-T-S-K-K
297	X 3	1549	I-V-S-K-A-V-T-S-K-K-S-K-G-E-S
298	X 4	1696	V-T-S-K-K-S-K-G-E-S-D-D-F-H-M
299	X 5	1687.9	S-K-G-E-S-D-D-F-H-M-D-F-D-S-A
300	X 6	1693.9	D-D-F-H-M-D-F-D-S-A-V-A-P-R-A
301	X 7	1589.9	D-F-D-S-A-V-A-P-R-A-K-S-V-R-A
302	X 8	1649.2	V-A-P-R-A-K-S-V-R-A-K-K-P-I-K
303	X 9	1776.3	K-S-V-R-A-K-K-P-I-K-Y-L-E-E-S
304	X10	1822.2	K-K-P-I-K-Y-L-E-E-S-D-E-D-D-L
305	X11	1841.2	K-P-I-K-Y-L-E-E-S-D-E-D-D-L-F

2.3.12 Charakterisierung von Peptiden

Die Peptide, die in den CAD SPOT-Membran Versuchen ein starkes Interaktionssignal zeigten, wurden re-synthetisiert und in weiteren Experimenten genauer analysiert und charakterisiert.

2.3.12.1 CAD Inhibitionsassays (Peptide)

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten synthetischen Peptide wurden entweder von der Firma GenScript Corporation (www.genscript.com) oder von der Firma Eurogentec Deutschland GmbH (www.eurogentec.com) bezogen. Peptid A10 bestand aus den ICAD Aminosäureresten 55-74 (Sequenz: S L T P I T L V L A E D G T I V D D D D; Mr: 2102.29). Peptid A18 aus den ICAD Aminosäureresten 103-122 (Sequenz: T A W V S Q E S F E A D E P D S R A G V; Mr: 2181.24). Peptid B1 aus den ICAD Aminosäureresten 127-146 (Sequenz: V A R Q L K E D L S S I I L L S E E D L; Mr: 2271.57). Peptid B2 aus den ICAD Aminosäureresten 133 – 152 (Sequenz: E D L S S I I L L S E E D L Q A L I D I; Mr: 2229.53). Peptid B10 aus den ICAD Aminosäureresten 181-200 (Sequenz: Q R E E A R Q S K Q L L E L Y L Q A L E; Mr: 2445.74). Die *scrambled* Version von Peptid B1 hatte die folgende Sequenz; L E L A D I Q L D E V I R S S S L L E K, Mr: 2271.57 und die *scrambled* Version von Peptid B2 hatte die folgende Sequenz; L S Q L S D I E L I E E L D S L D A; Mr: 2229.53. Alle Peptide wurden in 50 % (v/v) DMSO gelöst.

Kinetiken:

Für die Kinetikversuche wurden die Peptide zusammen mit aktivierter Nuklease (typischerweise 100 nM) über Nacht bei 4°C in Spaltpuffer (siehe 2.3.10.5) inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug üblicherweise 100 µl. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von Plasmid-DNA (pBluescript SK+) als Substrat (typischerweise 2.5 nM) gestartet. Im Folgenden wurden Aliquots nach 1 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min bei 37°C abgenommen. Die Spaltreaktion wurde hierbei durch Zugabe von jeweils 4 µl 5× AAP direkt gestoppt. Anschließend wurde die Spaltreaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Titrationen:

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeiten wurde aktivierte Nuklease (typischerweise 100 nM) mit verschiedenen Peptidkonzentrationen titriert und über Nacht bei 4°C in Spaltpuffer (siehe 2.3.10.5) inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug hier 20 µl. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von Plasmid-DNA (pBluescript SK+) als Substrat (typischerweise 2.5 nM) gestartet und nach 10 Minuten bei 37°C durch Zugabe von jeweils 4 µl 5× AAP gestoppt. Anschließend wurde die Spaltreaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Zum Auswerten der Daten wurden mit Hilfe eines *BioDocAnalyze* Gel-Analyse Systems (Biometra) die Intensitäten der DNA-Banden gemessen. Anschließend wurde die Abnahme der *supercoiled* Plasmid-DNA (sc Plasmid-DNA) quantifiziert, um so die noch vorhandene Spaltaktivität zu ermitteln.

2.3.12.2 NucA Inhibitionsassays

Für die NucA Inhibitionsassays wurde 1 nM NucA über Nacht mit einem 100-1000 fachen Überschuss an Peptid B1 bzw. B2 in Puffer (10 mM Tris-HCL pH 7.0, 50 mM NaCl, 5 mM MnCl₂, 0.1 % Triton) inkubiert. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe von Plasmid-DNA (pBluescript SK+) als Substrat (typischerweise 2.5 nM) gestartet. Im Folgenden wurden Aliquots nach 10 sec, 30 sec, 1 min, 3 min, 5 min und 10 min bei 37°C abgenommen. Die Spaltreaktion wurde hierbei durch Zugabe von jeweils 4 µl 5x AAP direkt gestoppt. Anschließend wurde die Spaltreaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.3.12.3 Ultrafiltration

Für einige Anwendungen z.B. die Kristallisationsstudien oder die CD-Spektroskopie mussten die jeweiligen Proteine teilweise konzentriert werden. Hierfür wurden Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Devices* der Firma Millipore mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa verwendet. Die Anwendung entsprach dabei den Herstellerangaben.

2.3.12.4 CD-Spektroskopie von Peptiden

Die CD-Spektroskopie wurde im Hinblick auf die Peptide zur Analyse deren Sekundärstruktur verwendet. Die CD-Spektren wurden in einem Bereich von 280 nm bis 180 nm (*far UV*) mit einem J-710 Spektropolarimeter von Jasco aufgenommen. Für die Messungen wurde der fertige Ansatz (170 µl) in eine Hellma 121.000 Küvette (Schichtdicke 0.2 mm) überführt. Als problematisch erwies sich in diesen Versuchen der Anteil an DMSO im Puffer der Peptide, da DMSO in diesem Bereich absorbiert (270 nm = 0.40 A). Da DMSO jedoch für die Löslichkeit der Peptide unerlässlich war, führte der Versuch einer Dialyse gegen den bereits beschriebenen CD-Puffer zu einer starken Verringerung des Anteils an gelösten Peptiden. Dies hatte einen besonders starken Effekt auf die CD-spektroskopischen Untersuchungen von Peptid B2, welches bereits vor der Dialyse eine geringere Konzentration als Peptid B1 aufwies. Hier konnte kein auswertbares Signal erlangt werden.

2.3.13 Generation einer hochspezifischen CAD

Ein kleineres Teilprojekt, das im Laufe der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurde, war das Erstellen einer hochspezifischen CAD. Dazu wurde CAD, die normalerweise eine unspezifische Nuklease ist, mit I-SceI fusioniert. I-SceI ist eine Homingendonuklease, die eine 18 bp asymmetrische DNA-Sequenz erkennt¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Da I-SceI in der vorliegenden Arbeit nur als DNA-Bindemodul eingesetzt werden sollte, wurde eine katalytische inaktive Variante dieses Enzyms gewählt (I-SceI D44S). Das Fusionsprotein CAD-I-SceI wurde hierbei jeweils auch, wie CAD üblicherweise, mit ICAD bzw. DFF45 ko-exprimiert.

2.3.13.1 EMSA Versuche

Um zu Überprüfen, ob das Fusionsprotein CAD-I-SceI in der Lage ist DNA spezifisch zu binden, wurden EMSA Versuche durchgeführt. Dazu wurden typischerweise 2.5 nM radioaktiv markierte DNA (siehe 2.3.7.1) mit unterschiedlichen Konzentrationen von CAD-I-SceI für mindestens 1 h in EMSA-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA) und Poly [d(I-C)] (Endkonzentration 0,01 mg/ml) inkubiert. Dabei wurde zum einen DNA (160 bp) verwendet, die die spezifische I-SceI Erkennungssequenz (spezifisches Substrat) beinhaltet, und DNA, die keine solche Erkennungssequenz beinhaltet (unspezifisches Substrat). Nach der Inkubation wurden die Proben Polyacrylamid-gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.3.7.2).

2.3.13.2 Spaltassays

Zur Analyse des spezifischen DNA Verbaus von CAD-I-SceI wurde ein ca. 800 bp langes DNA Fragment, welches über zwei I-SceI Erkennungssequenzen in räumlicher Nähe (17-23 bp Abstand) verfügte, mittels inverser-PCR erstellt. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt (typischerweise 10-50 nM) mit äquimolaren Konzentrationen des Fusionsproteins über Nacht in Spaltpuffer (siehe 2.3.10.5) inkubiert. Außerdem wurden zur Aktivierung der Nuklease katalytische Caspase-3 Δ 1-28 Mengen zu dem Ansatz hinzugefügt. Am Folgetag wurde die Spaltreaktion durch die Zugabe von 7,5 mM MgCl₂ (Endkonzentration) gestartet. Im Folgenden wurden in der Regel Aliquots nach 1 min, 5 min, 10 min und 15 min bei 37°C abgenommen. Die Spaltreaktion wurde hierbei durch Zugabe von jeweils 4 µl 5x AAP direkt gestoppt. Anschließend wurde die Spaltreaktion mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (8 % PAA) auf eine spezifische Spaltung hin analysiert. Als Kontrolle wurden die Versuche jeweils auch mit einem DNA Substrat ohne I-SceI Erkennungssequenzen durchgeführt.

2.3.14 Kristallisationsstudien

Die Kristallisationsstudien mit ICAD-S und dem Komplex aus DFF40 und DFF45 wurden in Kooperation mit dem *Netherlands Cancer Institute* (NKI) durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Proteine zunächst in den für die Kristallisationsstudien notwendigen Konzentrationen (5-10 mg/ml) präpariert und anschließend nach dem *vapour diffusion (sitting drop)* Prinzip der Nanokristallisation im 96-*well* Format unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die *sitting drops* bestehen dabei aus 100 nl Proteinlösung, die mit 100 nl Kristallisationsreagenz vermischt wurden. Somit braucht man nur ca. 30 µl der konzentrierten Proteinlösung für jeden 96 *well screen*.

2.3.14.1 Kristallisationsreagenzien

Zum *screen* der Protein Kristallisationsbedingungen wurden Kits der Firma Qiagen (JCSG Suite, PACT Suite, Classics Suite) im 96-*well* Format verwendet (www.qiagen.com). Somit wurden 3 x 96 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen untersucht.

2.3.14.2 Inkubationsbedingungen

Die fertig präparierten 96-*wells* wurden im Anschluss in der so genannten *Crystal Farm*, einem Platten Lagerungs- und automatischem Abbildungssystem, entweder bei Raumtemperatur oder bei 4°C inkubiert.

2.3.15 Interaktions-*modelling*

Die Ergebnisse der CAD SPOT-Membran wurden unter Verwendung des Programms Pymol auf bereits verfügbare Strukturinformationen der Nuklease CAD übertragen, um so ein Interaktionsmodell von ICAD und CAD anhand der SPOT Primärdaten zu erstellen.

2.4 Verwendung von Online-Datenbanken

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Online-Datenbanken zum Ermitteln von Proteinsequenzen, zur Vorhersage von Protein und Peptidsekundärstrukturen sowie zur *in-silico* Charakterisierung von Proteinen verwendet.

2.4.1 Proteinsequenzen

Proteinsequenzen wurden in der Regel im *World Wide Web* über die Online- Protein *Knowledgebase* UniProt (www.uniprot.org) ermittelt. Basieren auf den Informationen dieser Datenbank wurden auch Sequenzalignments (zum Beispiel zwischen ICAD-L und DFF45) durchgeführt.

2.4.2 Sekundärstrukturvorhersagen von Proteinen und Peptiden

Sekundärstrukturvorhersagen für Bereiche von ICAD bzw. DFF35/45 wurden zumeist mit Hilfe des Servers PSI-PRED getätigt, während mögliche Sekundärstrukturen von einzelnen Peptiden mittels des Servers PEP-Fold vorausberechnet wurden.

2.4.3 *In-Silico* Charakterisierung von Proteinen

Vorhersagen zur Hydrophobizität und Zugänglichkeit bestimmter Aminosäurereste Regionen von ICAD bzw. DFF35/45 wurden mit Hilfe des Servers Prot-scale durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 SPOT-Membran Versuche

3.1.1 CAD - ICAD Interaktionsstudien

Da es nach bisherigem Stand nur partiell strukturelle Informationen über den DFF-Komplex gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit die SPOT (*peptide array*) Methode verwendet, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen CAD und ICAD zu identifizieren.

3.1.1.1 CAD SPOT-Membran

Die CAD SPOT-Membran bestand aus 55 *spots*, die über drei Reihen (E, F und G) verteilt waren (siehe Abbildung 14). Der erste *spot* (E1) spiegelte dabei das erste N-terminale CAD-Peptid (AS 1-20) wider und der letzte *spot* (G13) das letzte C-terminale Peptid (AS 325-344).

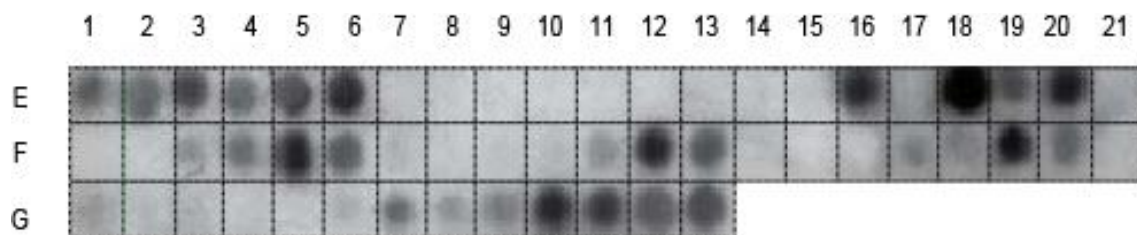


Abbildung 14: Komplettdarstellung der CAD SPOT-Membran

Gezeigt ist die CAD SPOT-Membran nach Inkubation mit 50 nM HisFlag-ICAD-L. Die Interaktion von ICAD-L mit CAD Peptiden wurde via ECL (*enhanced chemiluminescence*) - Reaktion mittels eines Anti-FLAG® (*horseradish peroxidase conjugated*) Antikörpers analysiert.

Nach der Inkubation mit ICAD-L zeigte die CAD SPOT-Membran Interaktionssignale, die über alle drei Domänen von CAD verteilt waren. Dabei gliederten sich die Interaktionssignale im Wesentlichen in sieben Interaktionsgruppen (*spots*: E1-E6, E16-E20, F3-F6, F11-F13, F17-F20, G1 und G3 sowie G7-G13). Das stärkste Interaktionssignal war dabei bei *spot* E18 zu detektieren, andere starke Interaktionssignale wurden bei *spots* E3, E6, E16, E20, F5, F12, F19 und G10 beobachtet.

3.1.1.2 Interaktion mit der CAD C1-Domäne

Die Peptide E1 bis E6 stellen Aminosäurereste der N-terminalen Domäne (C1) von CAD dar, die zum einen die β -Stränge β 1, β 2 und β 3, sowie zum anderen die N-terminale α -Helix bilden. Zu bemerken ist, dass, auch wenn die *spots* E3 und E6 etwas intensiver erscheinen, alle *spots* in dieser Region ein relativ ähnlich starkes Interaktionssignal aufwiesen.

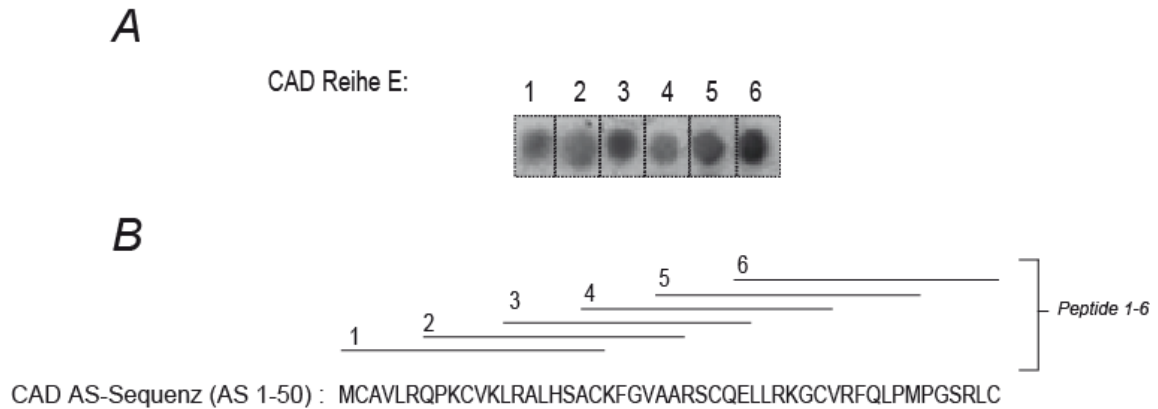


Abbildung 15: Spots E1 bis E6 der CAD SPOT-Membran

Teil A der Abbildung zeigt die *spots* E1 bis E6 der CAD SPOT-Membran. Im unteren Bereich des Teils B ist die, die *spots* E1-E6 abdeckende, CAD AS-Sequenz (AS 1-50) angegeben. Um den überlappenden Charakter der jeweiligen Peptide der *spots* exemplarisch darzustellen, wurden diese in Form von Strichen passgenau über die entsprechende AS-Sequenz von CAD eingezeichnet.

3.1.1.2.1 Interaktion mit der CAD Dimerisierungsdomäne

Neben einer Interaktion von ICAD mit CAD-Peptiden der N-terminalen Domäne, wurden auch Interaktionen mit der C2-Domäne von CAD, der so genannten CAD Dimerisierungsdomäne, beobachtet.

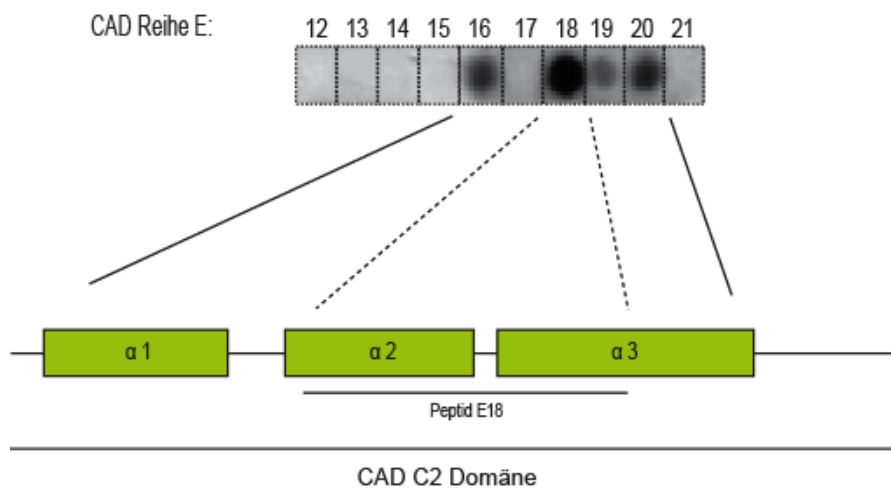


Abbildung 16: Spots E12 bis E21 der CAD SPOT-Membran

Die Abbildung zeigt die *spots* E12 bis E21 der CAD SPOT-Membran. Im unteren Bereich der Abbildung sind die drei α -Helices (α_{1-3}), die die C2-Domäne von CAD formen, schematisch dargestellt.

Diese relativ starken Interaktionssignale bezogen sich dabei auf die *spots* E16, E18 und E20, deren Peptide im nativen CAD Protein die α -Helices α_1 , α_2 und α_3 der C2-Domäne formen (siehe Abbildung 16). Das Peptid mit dem stärksten Interaktionssignal der CAD SPOT-Membran, Peptid

E18, umfasst dabei fast die komplette α_2 -Helix, sowie einen relativ großen Teil der α_3 -Helix der C2-Domäne. Auffallend bei dieser Gruppe von Interaktionssignalen ist auch, dass trotz des überlappenden Charakters der Peptide der SPOT-Membran, nur ein schwaches Interaktionssignal bei *spot* E19 und kein Interaktionssignal bei *spot* E17 erkennbar ist. Schaut man sich die AS-Sequenz von Peptid E17 an, so ist besonders interessant, dass dieses Peptid im nativen CAD Protein verglichen mit z.B. Peptid B18 prozentual aus wesentlich mehr AS besteht, die zu unstrukturierten *linker*-Regionen gehören¹²⁶.

3.1.1.2.2 Interaktion im Bereich der Zn^{2+} -Bindestelle von CAD

Ein weiteres relativ starkes Interaktionssignal wurde für Peptid F19 beobachtet. Dieses Peptid bildet in der nativen Nuklease den N-terminalen β_2 -Strang der C3-Domäne und beinhaltet die Aminosäurereste Cys238 und His242, die bei der Bindung des für die Struktur von CAD wichtigen Zn^{2+} -Ions beteiligt sind. Der Verlust dieses Zn^{2+} -Ions führt zum strukturellen Zusammenbruch von CAD und damit verbunden zum Verlust der Nukleaseaktivität¹²⁶.

3.1.1.2.3 Interaktion mit dem katalytischen Zentrum

Ein schwaches, aber dennoch positives Signal auf der CAD SPOT-Membran konnte nach der Inkubation mit ICAD bei *spot* G1 detektiert werden. Peptid G1 spiegelt Teile des aktiven Zentrums von CAD wider. Dieses befindet sich in enger Nähe zur Zn^{2+} Bindestelle (Cys229, Cys238, His242, und Cys307) und beinhaltet die Aminosäurereste Asp262 und His263. Asp262 ist hierbei der wichtigste Mg^{2+} -Ligand und His263 stellt die allgemeine Base dar, die für den katalytischen Mechanismus der Spaltung von Phosphodiesterbindungen durch CAD essentiell ist^{97, 126}.

3.1.1.2.4 Interaktion mit der NLS-Region

Teile der langen C-terminalen Gruppe von positiven Interaktionssignalen umfassen die NLS-Sequenz von CAD, die das Binden an Importin α vermittelt¹⁷⁸.

3.1.1.2.5 Weitere Interaktionen

Weitere Interaktionssignale von ICAD mit CAD Peptiden, die in den SPOT-Membran Versuchen beobachtet werden konnten, waren die positiven Interaktionssignale von Peptid F5 und F12. Peptid F5 besteht dabei aus den Aminosäureresten, die im nativen CAD Protein den N-terminalen Teil der α_4 -Helix bilden. Diese Helix ist vermutlich an der DNA-Bindung von CAD beteiligt¹²⁷. Die Aminosäurereste, die Peptid F12 beinhaltet, formen im nativen Protein die α_5 -Helix, die sich parallel zur α_4 -Helix befindet¹²⁶.

3.1.1.3 Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen CAD SPOT-Membran Daten

Tabelle 3: Zusammenfassung der CAD SPOT-Membran Daten

Die *spots* der CAD SPOT-Membran, bei denen ein positives Signal beobachtet werden konnte, sind in dieser Tabelle samt entsprechender AS-Sequenz zusammengefasst. Die Signalstärke der *spots* wurde hierbei in drei Klassen unterteilt: niedrig (+), mittel (++) und stark (+++).

spot Nr.	Sequenz	Signalstärke
E 1	⁰¹ M-C-A-V-L-R-Q-P-K-C-V-K-L-R-A-L-H-S-A-C ²⁰	+
E 2	⁰⁷ Q-P-K-C-V-K-L-R-A-L-H-S-A-C-K-F-G-V-A-A ²⁶	+
E 3	¹³ L-R-A-L-H-S-A-C-K-F-G-V-A-A-R-S-C-Q-E-L ³²	++
E 4	¹⁹ A-C-K-F-G-V-A-A-R-S-C-Q-E-L-L-R-K-G-C-V ³⁸	+
E 5	²⁵ A-A-R-S-C-Q-E-L-L-R-K-G-C-V-R-F-Q-L-P-M ⁴⁴	+
E 6	³¹ E-L-L-R-K-G-C-V-R-F-Q-L-P-M-P-G-S-R-L-C ⁵⁰	++
E16	⁹¹ F-L-S-V-F-N-E-P-H-A-G-V-I-Q-A-A-R-Q-L-L ¹¹⁰	++
E18	¹⁰³ I-Q-A-A-R-Q-L-L-S-D-E-Q-A-P-L-R-Q-K-L-L ¹²²	+++
E19	¹⁰⁹ L-L-S-D-E-Q-A-P-L-R-Q-K-L-L-A-D-L-L-H-H ¹²⁸	+
E20	¹¹⁵ A-P-L-R-Q-K-L-L-A-D-L-L-H-H-V-S-Q-N-I-T ¹³⁴	++
F 3	¹³⁹ E-Q-D-P-S-W-F-E-G-L-E-S-R-F-R-N-K-S-G-Y ¹⁵⁸	+
F 4	¹⁴⁵ F-E-G-L-E-S-R-F-R-N-K-S-G-Y-L-R-Y-S-C-E ¹⁶⁴	+
F 5	¹⁵¹ R-F-R-N-K-S-G-Y-L-R-Y-S-C-E-S-R-I-R-G-Y ¹⁷⁰	++
F 6	¹⁵⁷ G-Y-L-R-Y-S-C-E-S-R-I-R-G-Y-L-R-E-V-S-A ¹⁷⁶	+
F11	¹⁸⁷ E-E-Y-L-R-V-L-G-S-M-C-Q-K-L-K-S-V-Q-Y-N ²⁰⁶	+
F12	¹⁹³ L-G-S-M-C-Q-K-L-K-S-V-Q-Y-N-G-S-Y-F-D-R ²¹²	++
F13	¹⁹⁹ K-L-K-S-V-Q-Y-N-G-S-Y-F-D-R-G-A-E-A-S-S ²¹⁸	+
F17	²²³ P-E-G-W-F-S-C-Q-G-P-F-D-L-E-S-C-L-S-K-H ²⁴²	+
F18	²²⁹ C-Q-G-P-F-D-L-E-S-C-L-S-K-H-S-I-N-P-Y-G ²⁴⁸	+
F19	²³⁵ L-E-S-C-L-S-K-H-S-I-N-P-Y-G-N-R-E-S-R-I ²⁵⁴	++
F20	²⁴¹ K-H-S-I-N-P-Y-G-N-R-E-S-R-I-L-F-S-T-W-N ²⁶⁰	+
G 1	²⁵³ R-I-L-F-S-T-W-N-L-D-H-I-I-E-K-K-R-T-V-V ²⁷²	+
G 3	²⁶⁵ I-E-K-K-R-T-V-V-P-T-L-A-E-A-I-Q-D-G-R-E ²⁸⁴	+
G 7	²⁸⁹ Y-F-Y-S-L-L-F-T-A-E-N-L-K-L-V-H-I-A-C-H ³⁰⁸	+
G 8	²⁹⁵ F-T-A-E-N-L-K-L-V-H-I-A-C-H-K-K-T-T-H-K ³¹⁴	+
G 9	³⁰¹ K-L-V-H-I-A-C-H-K-K-T-T-H-K-L-E-C-D-R-S ³²⁰	+
G10	³⁰⁷ C-H-K-K-T-T-H-K-L-E-C-D-R-S-R-I-Y-R-P-Q ³²⁶	++
G11	³¹³ H-K-L-E-C-D-R-S-R-I-Y-R-P-Q-T-G-S-R-R-K ³³²	++
G12	³¹⁹ R-S-R-I-Y-R-P-Q-T-G-S-R-R-K-Q-P-A-R-K-K ³³⁸	+
G13	³²⁵ P-Q-T-G-S-R-R-K-Q-P-A-R-K-K-R-P-A-R-K-R ³⁴⁴	+

3.1.1.4 ICAD SPOT-Membran

Die ICAD SPOT-Membran bestand aus 53 *spots* die über drei Reihen (A, B und C) verteilt waren (siehe Abbildung 17). Der erste *spot* (A1) spiegelte dabei das erste N-terminale ICAD-Peptid (AS 1-20) wider, der letzte *spot* (C11) das letzte C-terminale Peptid (AS 312-331).

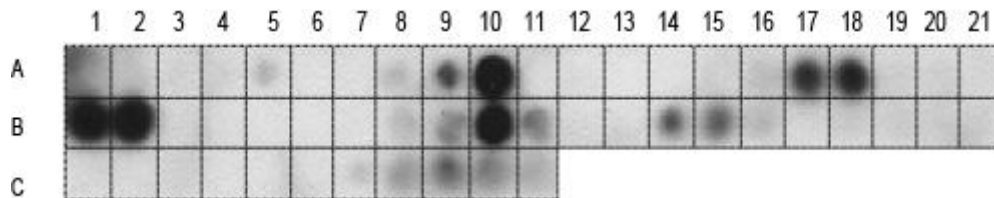


Abbildung 17: Komplettdarstellung der ICAD SPOT-Membran nach Inkubation mit CAD

Dargestellt ist die ICAD SPOT-Membran nach Inkubation mit 50 nM GST-CAD. Die Interaktion von GST-CAD mit ICAD Peptiden wurde via ECL (*enhanced chemiluminescence*) - Reaktion über einen Anti-GST bzw. Anti-goat (*horseradish peroxidase conjugated*) Antikörper analysiert.

Nach der Inkubation mit CAD zeigte die ICAD SPOT-Membran, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der CAD SPOT-Membran, Interaktionssignale, die über alle drei Domänen von ICAD verteilt waren. Die positiven Interaktionssignale konnten hierbei in sechs Interaktionsgruppen unterteilt werden (*spots*: A8-A10, A17-A18, B1-B2, B8-B11, B14-B16 und C7-C11). Die stärksten Interaktionssignale wurden bei *spots* A10, A18, B1, B2 und B10 beobachtet.

3.1.1.4.1 Interaktion mit der ICAD D1-Domäne

Die Region, die von den Peptiden der *spots* A9 und A10 repräsentiert wird, befindet sich in der D1-Domäne von ICAD, für die es bereits strukturelle Informationen gibt. Dabei formen die Aminosäurereste, aus denen diese Peptide bestehen, im nativen ICAD Protein die beiden β -Stränge, β_3 und β_4 sowie eine *loop*-Struktur in der D1-Domäne. Vergleicht man die SPOT Ergebnisse für die N-terminalen Domänen von ICAD und CAD, so fällt direkt auf, dass im Gegensatz zur CAD SPOT-Membran, auf der ein recht breites und gleichmäßiges Interaktionsfeld detektiert wurde (siehe *spots* E1-E6; 3.1.1.2), das Interaktionssignal der ICAD SPOT-Membran in diesem Bereich fast nur auf einen *spot* (A10), der jedoch ein sehr starkes Signal ausstrahlt, reduziert ist.

3.1.1.4.2 Interaktion mit den Caspase-3 Spaltstellen

Weitere positive Interaktionssignale wurden für die Peptide A17/A18 und B14-B16 beobachtet. Interessanterweise beinhalten diese beiden Interaktionsgruppen die zwei Caspase-3 Spaltstellen von ICAD ($^{114}\text{DEPD}^{117}$ und $^{221}\text{DAVD}^{224}$). Diese sind für die regulatorische Wirkung von ICAD essentiell und ermöglichen das Aktivieren der Nuklease CAD.

3.1.1.4.3 Interaktion mit der inhibitorischen Domäne (D2)

Die D2-Domäne von ICAD steht im Verdacht eine entscheidende Rolle bei der CAD Inhibition durch ICAD zu spielen und wird daher in der Literatur auch inhibitorische Domäne genannt. Da der genaue Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von ICAD bisher noch nicht bekannt ist, war es äußerst interessant zu identifizieren, dass besonders zwei Regionen in der D2-Domäne ein sehr starkes Interaktionssignal aufweisen. Diese beiden Regionen, denen bisher noch keine Funktion zugesprochen wird, werden von den Peptiden B1/B2 und B10 gebildet.

3.1.1.4.4 Interaktion mit der C-terminalen D3-Domäne

Die *spots* C7 bis C11 repräsentieren das C-terminale Ende von ICAD. Wie die für diese Region vorhandene strukturelle Information (NMR) zeigt, befinden sich die Aminosäurereste, die diese Peptide beinhalten, auf der α_4 -Helix der D3-Domäne von ICAD¹²⁸. Die C-terminale D3-Domäne spielt eine Rolle bei der Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD^{140, 142, 147}. Außerdem ist anzumerken, dass die C-terminalen Peptide dieser Interaktionsgruppe die NLS-Sequenz von ICAD formen. Diese Sequenz vermittelt das Binden an Importin α ¹⁷⁸.

3.1.1.5 Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen ICAD SPOT-Membran Daten

Tabelle 4: Zusammenfassung der ICAD SPOT-Membran Daten

Die *spots* der ICAD SPOT-Membran, bei denen ein positives Signal beobachtet werden konnte, sind in dieser Tabelle samt entsprechender AS-Sequenz zusammengefasst. Die Signalstärke der *spots* wurde hierbei in drei Klassen unterteilt: niedrig (+), mittel (++) und stark (+++).

spot Nr.	Sequenz	Signalstärke
A 8	⁴³ R-S-K-A-C-E-L-L-A-I-D-K-S-L-T-P-I-T-L-V ⁶²	+
A 9	⁴⁹ L-L-A-I-D-K-S-L-T-P-I-T-L-V-L-A-E-D-G-T ⁶⁸	++
A10	⁵⁵ S-L-T-P-I-T-L-V-L-A-E-D-G-T-I-V-D-D-D ⁷⁴	+++
A17	⁹⁷ N-D-S-D-G-G-T-A-W-V-S-Q-E-S-F-E-A-D-E-P ¹¹⁶	++
A18	¹⁰³ T-A-W-V-S-Q-E-S-F-E-A-D-E-P-D-S-R-A-G-V ¹²²	+++
B 1	¹²⁷ V-A-R-Q-L-K-E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L ¹⁴⁶	+++
B 2	¹³³ E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L-Q-A-L-I-D-I ¹⁵²	+++
B 8	¹⁶⁹ Q-G-L-Q-S-T-L-Q-Q-V-L-D-Q-R-E-E-A-R-Q-S ¹⁸⁸	+
B 9	¹⁷⁵ L-Q-Q-V-L-D-Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L ¹⁹⁴	++
B10	¹⁸¹ Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E ²⁰⁰	+++
B11	¹⁸⁷ Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E-K-E-G-N-I-L ²⁰⁶	++
B14	²⁰⁵ I-L-S-N-Q-K-E-S-K-A-A-L-S-E-E-L-D-A-V-D ²²⁴	++
B15	²¹¹ E-S-K-A-A-L-S-E-E-L-D-A-V-D-T-G-V-G-R-E ²³⁰	++
B16	²¹⁷ S-E-E-L-D-A-V-D-T-G-V-G-R-E-M-A-S-E-V-L ²³⁶	+
C 7	²⁸⁹ C-T-T-E-L-A-L-R-L-Q-Q-V-Q-S-L-H-S-L-R-N ³⁰⁸	+
C 8	²⁹⁵ L-R-L-Q-Q-V-Q-S-L-H-S-L-R-N-L-S-A-R-R-S ³¹²	+
C 9	³⁰¹ Q-S-L-H-S-L-R-N-L-S-A-R-R-S-P-L-P-G-E-P ³¹⁸	++
C10	³⁰⁷ R-N-L-S-A-R-R-S-P-L-P-G-E-P-Q-R-P-K-R-A ³²⁴	++
C11	³¹³ R-R-S-P-L-P-G-E-P-Q-R-P-K-R-A-K-R-D-S-S ³³⁰	+

3.1.2 Interaktionsmodell

Die Daten der CAD und ICAD SPOT-Membran-Versuche wurden im Folgenden auf bereits vorhandene strukturelle CAD und ICAD Informationen übertragen, um so ein virtuelles, SPOT-basiertes, Modell der CAD-ICAD Interaktion zu erstellen.

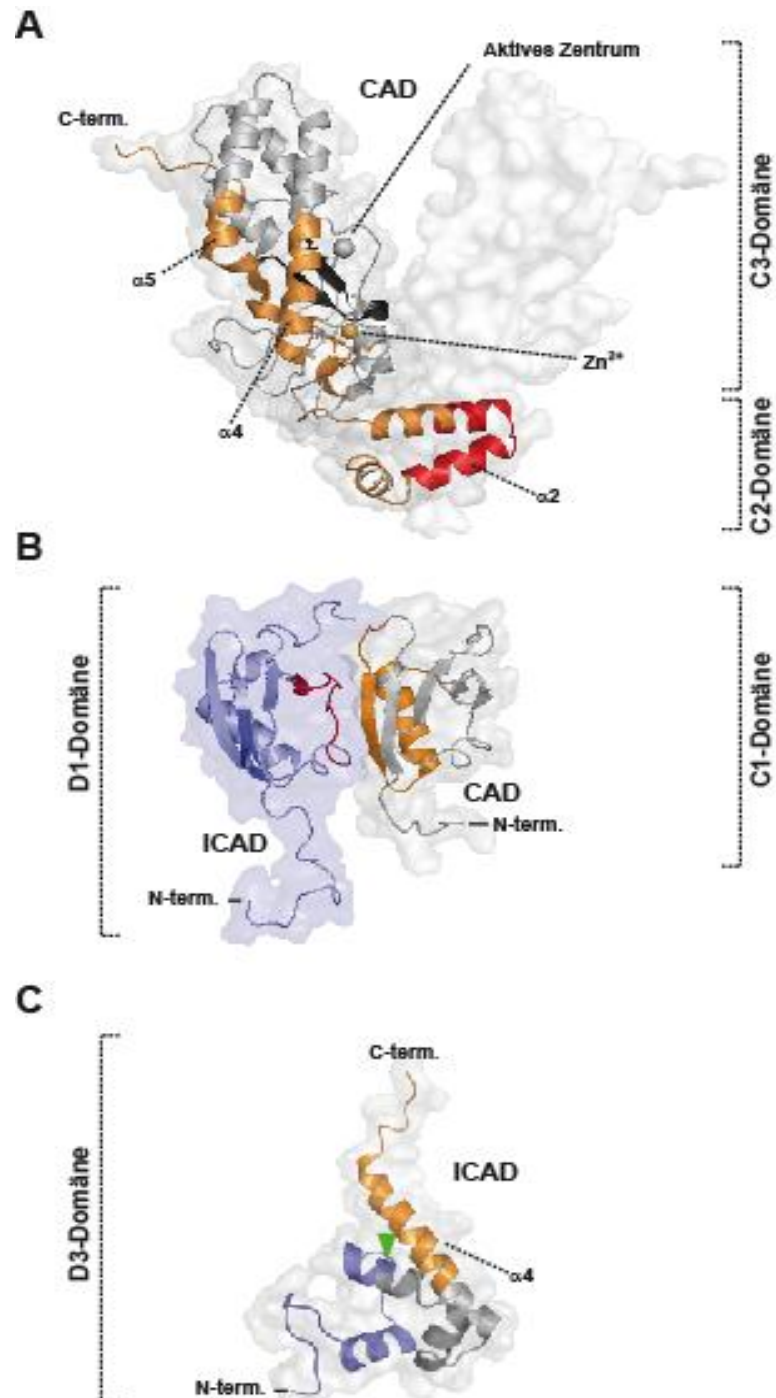


Abbildung 18: Interaktionsmodell basierend auf den Daten der SPOT Versuche

A: Das Homodimer von CAD (pdb code 1v0d) nach Woo *et al.* (2004), bestehend aus der C2 und C3 Domäne, ist dargestellt. Die strukturellen Elemente, die in der SPOT-Methode mit ICAD interagieren, wurden dabei nur in einer Untereinheit angedeutet. Der orangene Kreis zeigt das für die Struktur wichtige Zn^{2+} -Ion (Zn^{2+}) und der graue Kreis stellt das für die Katalyse wichtige Mg^{2+} dar, das sich im aktiven Zentrum von CAD befindet. B: Der Komplex der N-terminalen Domäne von CAD (C1-Domäne, grau) und ICAD (D1-Domäne, blau) ist gezeigt (pdb code 1f2r und 1c9f). C: Die Struktur der C-terminalen Domäne von humanem ICAD (D3-Domäne) wird bildlich dargestellt (pdb code 1iyr). Die Aminosäurereste, die bei beiden Spleißvarianten vorkommen, sind blau gefärbt. Der grüne Pfeil markiert dabei die Position des letzten gemeinsamen Aminosäurerests von ICAD-S und ICAD-L (Glu261). Abbildungübergreifend sind Regionen mit einem starken Interaktionssignal dunkelrot und Regionen mit einem mittleren Interaktionssignal orange hervorgehoben.

Anhand des Interaktionsmodells kann man feststellen, dass sich das ICAD-CAD Interface scheinbar über jeweils alle drei Domänen der Proteine erstreckt. Des Weiteren ist ersichtlich, dass das stärkste Interaktionssignal (dunkelrot markiert) in den Versuchen mit der CAD SPOT-Membran von Peptiden ausging, die im nativen Protein in der CAD C2-Domäne, speziell der α_2 -Helix der C2-Domäne, wiederzufinden sind. Diese Domäne vermittelt die Homodimerisierung von CAD nach der Caspase-induzierten Abspaltung von ICAD¹²⁶. Schaut man sich das Interaktionsmodell genauer an, so kann man auch ableiten, dass ICAD größtenteils mit der gegenüberliegenden Seite der CAD DNA-Bindestelle interagiert und zudem den, in räumlicher Nähe befindlichen, C-Terminus kontaktiert.

3.1.3 ICAD - ICAD Interaktionsstudien

Neben den Studien zur Interaktion von CAD und ICAD, wurde die ICAD SPOT-Membran auch verwendet, um die Interaktion zweier ICAD Moleküle näher zu untersuchen. In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben zur Stöchiometrie von ICAD, zum Teil wurden ICAD Dimere beschrieben, aber auch Monomere bzw. Oligomere wurden beobachtet^{64, 179, 180}. Für die ICAD-ICAD Interaktionsstudien wurde die ICAD SPOT-Membran, wie für die CAD SPOT-Membran beschrieben, mit HisFlag-ICAD (50 nM) inkubiert.

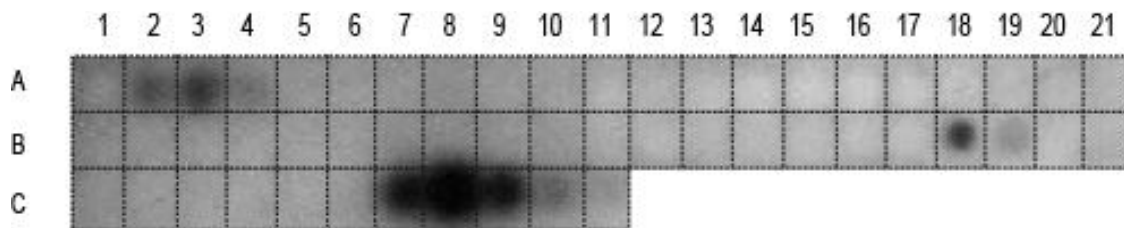


Abbildung 19: Komplettdarstellung der ICAD SPOT-Membran nach Inkubation mit ICAD

Gezeigt ist die ICAD SPOT-Membran nach Inkubation mit 50 nM HisFlag-ICAD-L. Die Interaktion von HisFlag-ICAD-L mit ICAD Peptiden wurde via ECL (*enhanced chemiluminescence*) - Reaktion über einen Anti-FLAG (*horseradish peroxidase conjugated*) Antikörper analysiert.

Erwartungsgemäß, sieht die Verteilung der Interaktionssignale auf der ICAD SPOT-Membran nach Inkubation mit ICAD, im Vergleich zur Inkubation mit CAD, unterschiedlich aus. Allgemein betrachtet ist eine geringere Anzahl an Interaktionssignalen erkennbar. Die positiven Signale erstrecken sich hierbei hauptsächlich über die D1- und D3-Domänen von ICAD. Interessanterweise nicht wie im Falle der ICAD SPOT-Membran, die mit CAD inkubiert wurde, über die inhibitorische D2 Domäne von ICAD. Man kann drei Interaktionsgruppen unterscheiden (E2-E4, E18/E19 und E7-E9). Diese Interaktionsgruppen überschneiden sich nicht mit den Interaktionsgruppen, die nach der Inkubation mit CAD sichtbar waren. Die Ausnahme hierbei sind *spots* C8 und C9 der C-terminalen Domäne. Hier wurde auch ein leichtes Interaktionssignal nach der Inkubation mit CAD beobachtet. In diesem Fall stieg die Intensität des Signals in diesem Bereich allerdings Richtung C-Terminus an, im Falle der Inkubation mit ICAD wird es wieder schwächer.

3.1.4 Topoisomerase II alpha - CAD Interaktionsstudien

Im Zuge der Studien zum Interaktionsverhalten der Nuklease CAD, wurde auch die in der Literatur bereits beobachtete Interaktion dieser Nuklease mit Topoisomerase II α im Kontext der SPOT Methode näher untersucht¹³¹.

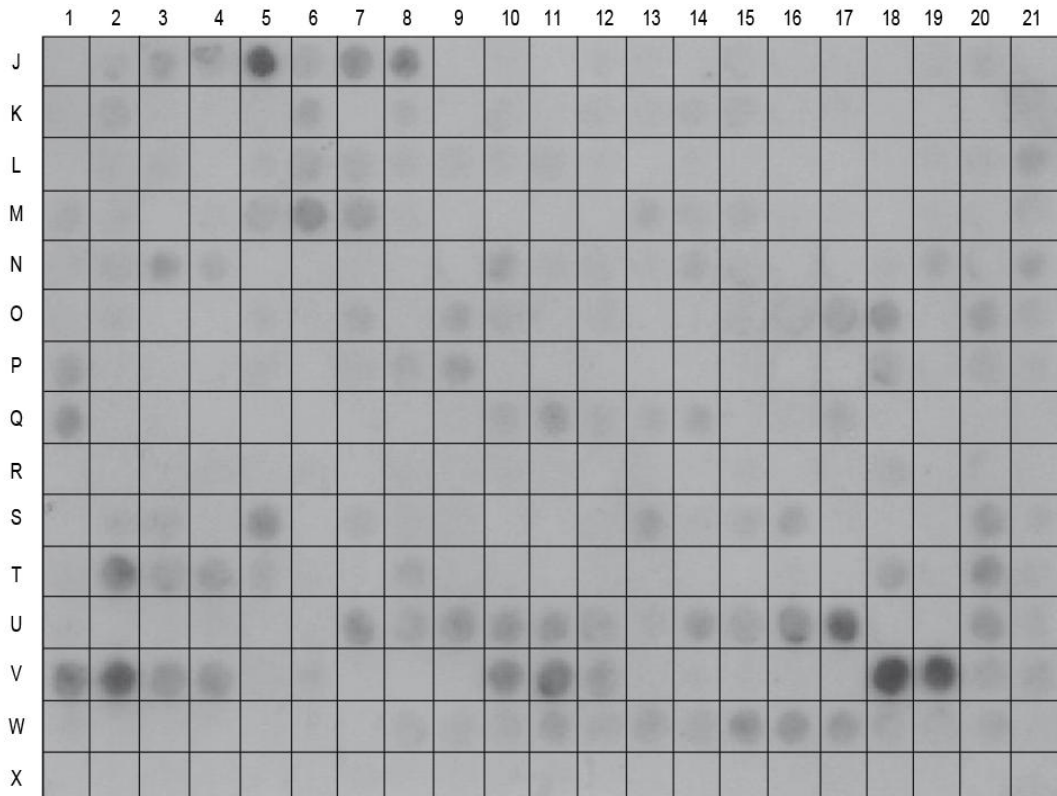


Abbildung 20: Komplettdarstellung der Topoisomerase II α SPOT-Membran nach Inkubation mit CAD

Dargestellt ist die Topoisomerase II α SPOT-Membran nach Inkubation mit 50 nM GST-CAD. Die Interaktion von GST-CAD mit Topoisomerase II α Peptiden wurde via ECL (*enhanced chemiluminescence*) -Reaktion über einen Anti-GST bzw. Anti-goat (*horseradish peroxidase conjugated*) Antikörper analysiert.

Die Intensitäten der einzelnen *spots* wurden nun densitometrisch ausgewertet und die Mittelwerte berechnet (die Versuche wurden dafür drei Mal wiederholt). Im Rahmen dieser Berechnungen wurde der *spot* mit der stärksten Interaktion als 100% Interaktion gewertet.

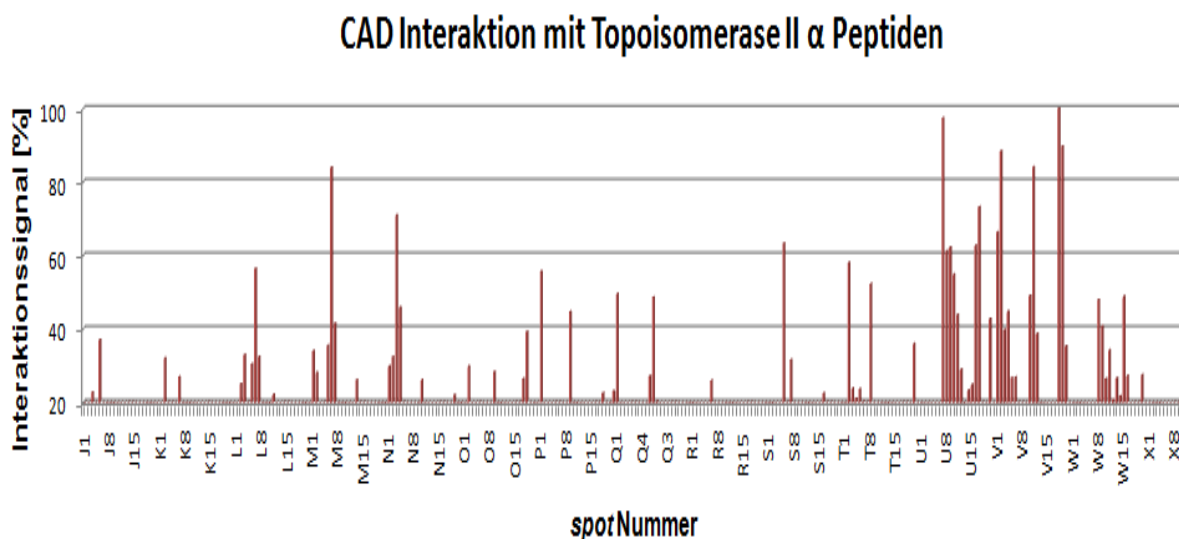


Abbildung 21: Auswertung der Topoisomerase II α SPOT-Membran Ergebnisse

Die Ergebnisse der Topoisomerase II α SPOT-Membran sind graphisch dargestellt. Für die Auswertung wurden die Intensitäten der einzelnen *spots* densitometrisch ermittelt. Die Ergebnisse von drei Topoisomerase II α SPOT-Membran Versuchen wurden so quantifiziert und anschließend Mittelwerte berechnet. Hierbei wurde jeweils der *spot* mit der stärksten Intensität auf als 100% Interaktionssignal gewertet und die anderen *spot* Signale entsprechend angepasst. *Spots*, deren Interaktionssignal kleiner als 20% war wurden in dieser Grafik nicht berücksichtigt.

Wie die Abbildung zeigt, wurden relative viele verschieden starke Interaktionssignale detektiert. Dabei waren die meisten Interaktionen im Bereich der C-terminalen Domäne der Topoisomerase II α zu finden (s. Abbildung 21). Die stärkste Interaktion wurde mit Peptiden V18 und V19 beobachtet. Frau B.sc. Pia Steigler ist derzeit gerade damit beschäftigt diese im Rahmen ihrer Masterarbeit näher zu untersuchen.

3.2 CAD Inhibition durch ICAD-abgeleitete Peptide

Die SPOT-Analyse von CAD und ICAD lieferte eine große Menge an Daten, die frühere Hypothesen zur Interaktion dieser beiden Proteine bestätigen bzw. vertiefen konnten. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD näher zu erforschen. Daher wurden im Anschluss an die ICAD SPOT-Membran Versuche solche ICAD-Peptide, die ein starkes Interaktionssignal aufwiesen, re-synthetisiert und in Lösung auf eine mögliche Inhibition von CAD untersucht. Die Peptide, die für diese Versuche gewählt wurden, waren das Peptid A10 sowie die Peptide A18, B1 und B10 der inhibitorischen D2-Domäne.

3.2.1 Inhibitionsassays mit ICAD-abgeleiteten Peptiden

Zur Identifizierung potentiell inhibitorisch wirksamer ICAD Regionen wurden die in 3.2 beschriebenen Peptide, in ersten Versuchen, zusammen mit aktivierter Nuklease und Substrat Plasmid-DNA inkubiert. Anschließend wurde das Inhibitionsvermögen indirekt, auf Basis der Rest-Nukleaseaktivität und den dadurch erfolgten DNA Verdau, zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

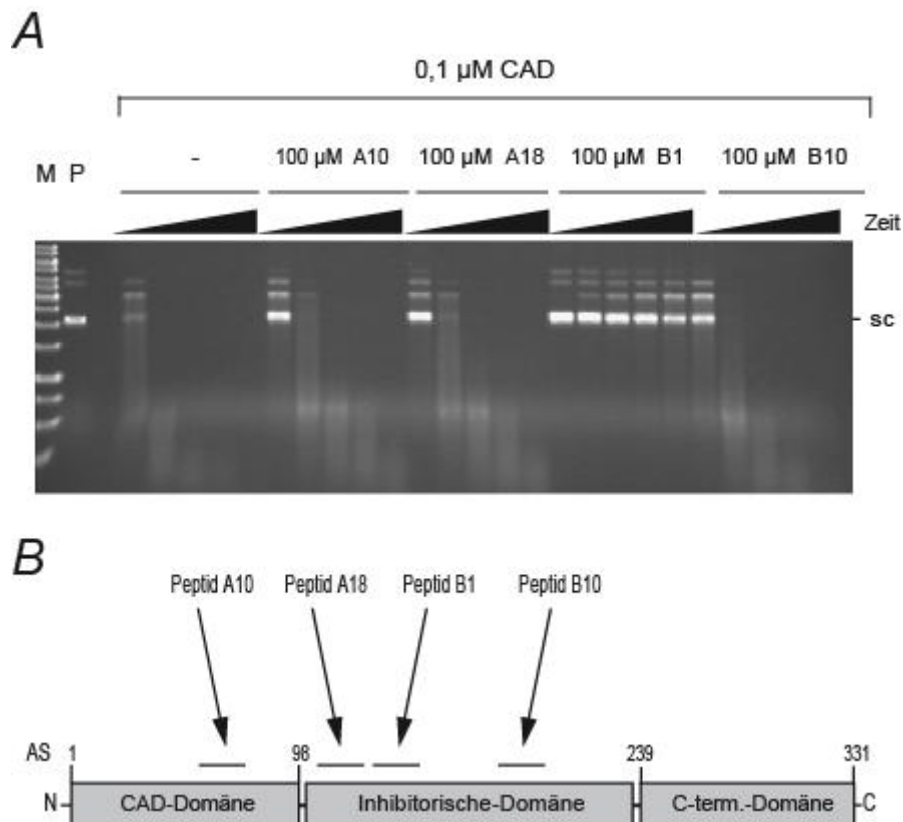


Abbildung 22: CAD Inhibition durch synthetische, ICAD-abgeleitete Peptide

A: Gezeigt sind Kinetiken ($t = 1, 5, 10, 15, 30$ min) der *supercoiled* (sc) Plasmid-DNA Spaltung durch CAD ($0,1 \mu\text{M}$) in Abwesenheit und Anwesenheit der Peptide A10, A18, B1 bzw. B10 ($100 \mu\text{M}$). Die Anwesenheit von Peptid B1 führte zu einer fast kompletten Inhibition von CAD. B: Die ICAD-L Domänenstruktur ist schematisch dargestellt. Dabei ist die jeweilige Position und angepasste Größe der verschiedenen Peptide in der ICAD Illustration angegeben. M, Größenmarker; P, Plasmid DNA Substrat.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigte sich in diesen Versuchen, dass sobald CAD mit Peptid B1 inkubiert wurde eine sehr starke Verringerung der Nukleaseaktivität detektierbar war. Hier ist selbst nach einer Inkubationszeit von 30 min noch *supercoiled* Plasmid-DNA erkennbar. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass für die Umwandlung von *supercoiled* Plasmid DNA zu *open circular* Plasmid DNA nur ein Schnitt der Nuklease notwendig ist. Daher steht die Abnahme der *supercoiled* Plasmid DNA im direkten Verhältnis zur Aktivität der Nuklease. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Inkubation von aktivierter Nuklease CAD mit Substrat Plasmid DNA bereits nach weniger als 5 min zu einem kompletten Verdau der DNA führte. Ähnliches galt auch für mit Peptiden A10, A18 und

B10 prä-inkubierte, aktivierte Nuklease. In diesen Fällen war die *supercoiled* Plasmid DNA nach ungefähr 5 min fast vollkommen verdaut.

3.2.2 Inhibitionsassays mit „*scrambled*“ B1 Peptid

Um zu überprüfen, ob die inhibitorische Wirkung von Peptid B1 spezifisch ist und nicht etwa auf der reinen Nettoladung des Peptids basiert, wurde eine „*scrambled*“ (engl.: zerwürfelt) Version dieses Peptids synthetisiert und ebenfalls in Inhibitionsassays analysiert. Dabei wies die „*scrambled*“ Version des Peptids B1 die gleiche Aminosäurezusammensetzung, jedoch eine unterschiedliche Aminosäuresequenz auf.

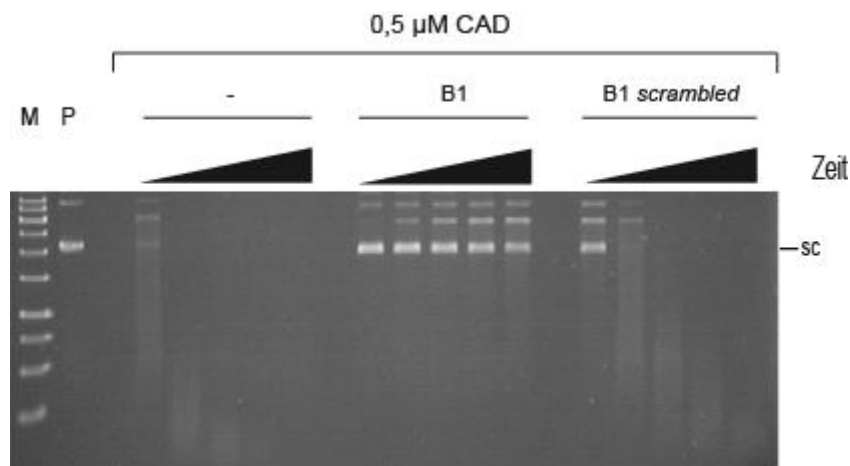


Abbildung 23: Inhibitionsassay mit B1 „*scrambled*“ Peptid

Abgebildet sind Kinetiken ($t = 1, 5, 10, 15, 30$ min) der *supercoiled* (sc) Plasmid-DNA Spaltung durch CAD ($0,5 \mu\text{M}$) in Abwesenheit und Anwesenheit von Peptid B1 und B1 „*scrambled*“ ($100 \mu\text{M}$). Die Anwesenheit von Peptid B1 führte, wie bereits detektiert, zu einer fast kompletten Inhibition von CAD. Die „*scrambled*“ Version dieses Peptids zeigt hingegen keine nennenswerte Inhibition von CAD. M, Größenmarker; P, Plasmid DNA Substrat.

Bei genauerer Betrachtung kann man, wie auch in 3.2.1, dokumentieren, dass die Inkubation von aktivierter CAD mit sc-Plasmid DNA bereits nach wenigen Minuten zum Verdau der DNA führte. Außerdem ist ebenso zu beobachten, dass Peptid B1 die Aktivität der Nuklease hemmt. Selbst nach 30 Minuten Inkubation ist immer noch ein sehr großer Anteil an sc-Plasmid DNA detektierbar. Auch kann man anhand der Versuche beobachten, dass sich eine Inkubation der Nuklease CAD mit der „zerwürfelten“ Version von Peptid B1 kaum auf die Aktivität der Nuklease auswirkt. Bereits nach weniger als 5 min ist die sc-Plasmid DNA komplett abgebaut.

3.2.3 Inhibitionsassays mit Peptid B2

Wie Abbildung 17 signalisiert, zeigte der zu *spot* B1 benachbarte *spot*, *spot* B2, ebenfalls ein äußerst starkes Interaktionssignal. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass Peptid B2, aufgrund des überlappenden Charakters der SPOT-Membran (14 AS Überlappung), aus einer teilweise ähnlichen AS-Sequenz wie Peptid B1 besteht. Zur Kontrolle der Experimente wurde daher im Folgenden auch Peptid B2 re-synthetisiert und in Lösung auf eine mögliche Inhibition von CAD untersucht.

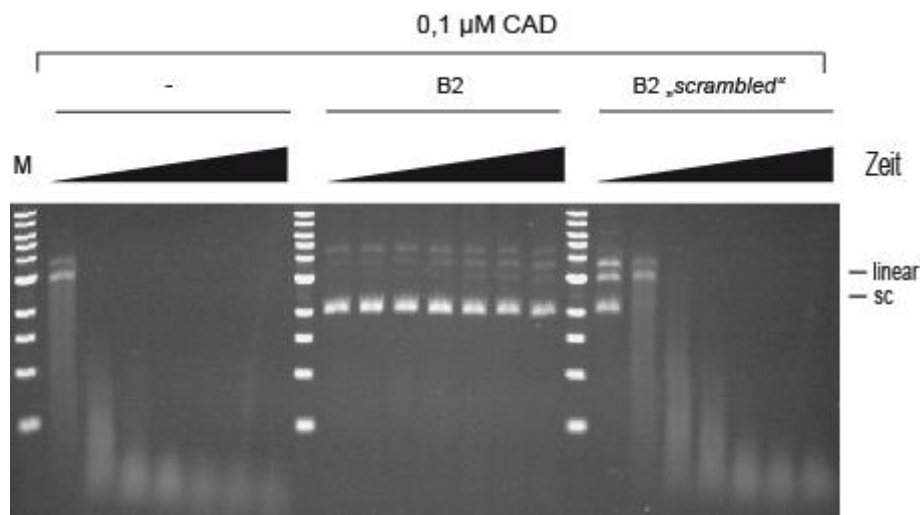


Abbildung 24: Inhibitionsassay mit Peptid B2 und Peptid B2 „scrambled“

Gezeigt sind Kinetiken ($t = 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60$ min) der *supercoiled* (sc) Plasmid-DNA Spaltung durch CAD ($0,1 \mu\text{M}$) in Abwesenheit und Anwesenheit von Peptid B2 und B2 „scrambled“ ($50 \mu\text{M}$). Die Anwesenheit von Peptid B2 führte zu einer fast kompletten Inhibition von CAD. Die „scrambled“ Version dieses Peptids zeigt hingegen keine nennenswerte Inhibition von CAD. M, Größenmarker; linear, linearisierte Plasmid DNA; sc, *supercoiled* Plasmid DNA.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, spaltet die aktivierte CAD Nuklease, ebenso wie in den vorherigen Versuchen, die sc-Plasmid DNA bereits nach einer Inkubation von wenigen Minuten vollständig. Wurde die aktivierte Nuklease nun mit Peptid B2 prä-inkubiert, so zeigten die Ergebnisse eine fast komplette Inhibition der Nukleaseaktivität. So ist bei genauer Betrachtung des Gels (Abbildung 24) lediglich eine minimale Spaltaktivität zu beobachten (Entstehung einer schwachen linearen Plasmid DNA Produktbande). In diesen Versuchen wurden $50 \mu\text{M}$ des jeweiligen Peptids eingesetzt. Setzte man $100 \mu\text{M}$ des Peptids in den Versuchen ein, konnte im gegebenen Zeitraum keinerlei Spaltaktivität dokumentiert werden.

3.2.4 Titrationsversuche mit den Peptiden B1 und B2

Um nun das Inhibitionsvermögen der Peptide B1 und B2 genauer zu untersuchen, aber auch, um die Eigenschaften dieser beiden Peptide besser vergleichen zu können, wurden Titrationsversuche unter konstanten Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde jeweils der Konzentrationsbereich gewählt, in dem das jeweilige Peptid seine minimale bis maximale Wirkung zeigte.

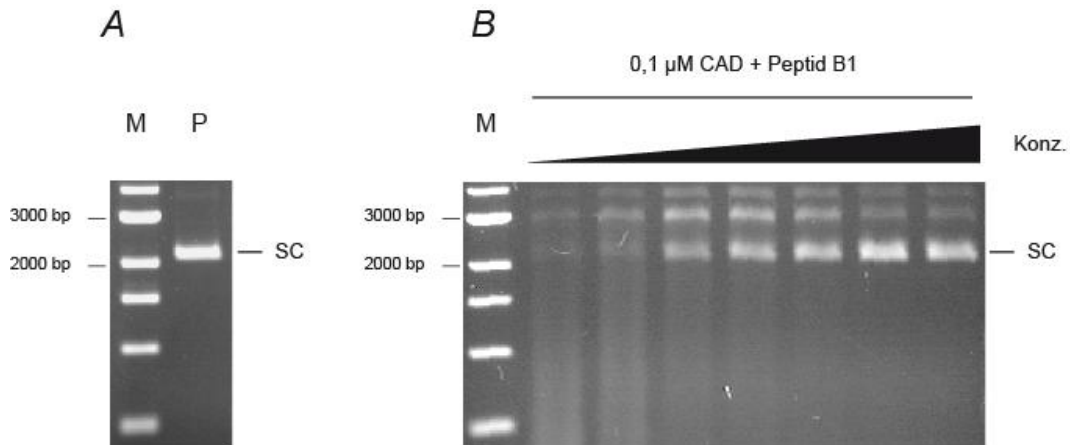


Abbildung 25: Titrationsexperimente mit Peptid B1

A: Hier ist exemplarisch das sc-Plasmid DNA Substrat, das in den Versuchen eingesetzt wurde, dargestellt. B: Titrationsversuche mit Peptid B1. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen Peptid B1 (0, 10, 50, 75, 100, 150 und 200 µM) mit aktivierter Nuklease CAD (0,1 µM) und sc-Plasmid DNA Substrat zunächst über Nacht prä-inkubiert. Die Spaltreaktion wurde mit Mg^{2+} am Folgetag gestartet und nach 10 min durch Zugabe von AAP gestoppt. Die Abbildung demonstriert, dass Peptid B1 seine Wirkung in einem Bereich von 10-200 µM entfaltet. M, Größenmarker; P, Plasmid DNA Substrat; sc, *supercoiled* Plasmid DNA.

Wie anhand der Abbildung demonstriert, zeigte das Peptid B1 in diesen Versuchen seine inhibitorische Wirkung ab einer Konzentration von ca. 10 µM. Ab einem Bereich von ca. 150 µM stellte sich eine Art maximale Inhibition ein. Zum Auswerten der Daten wurden nun mit Hilfe eines *BioDocAnalyze Gel-Analyse Systems* (Biometra) die Intensitäten der DNA-Banden gemessen und der Anteil an *supercoiled* Plasmid-DNA (sc-Plasmid-DNA) bestimmt. Die Inkubationszeit (10 min) für die Versuche wurde daher so gewählt, dass auch bei einer Inkubation der Nuklease ohne Peptid B1 noch ein kleiner Anteil an sc-Plasmid DNA zu identifizieren war.

Anschließend wurden die Daten graphisch dargestellt.

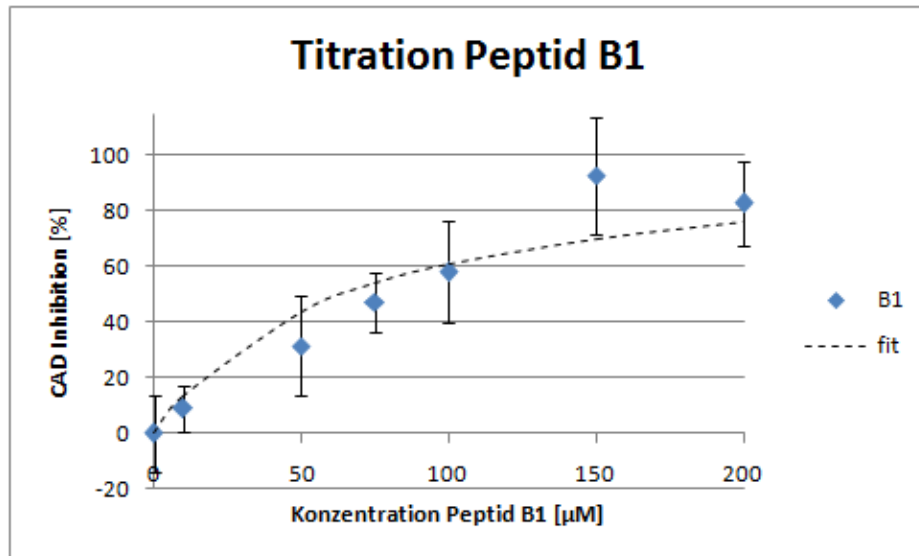


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Peptid B1 Titrationsexperimente

Die Abbildung zeigt die CAD Inhibition (%) in Abhängigkeit zur Peptid B1 Konzentration (blau). Für die Auswertung wurden mehrere Titrationsexperimente durchgeführt und anschließend ausgewertet. Nun wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung abgeleitet. Danach wurden die erhobenen Daten mit Hilfe des Excel Solvers einem *fit* unterzogen (gestrichelte Linie). Mit Hilfe dieses *fits* konnte ein IC_{50} -Wert (halbmaximale CAD Inhibition) für das Peptid B1 von ca $64 \pm 7,3 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Um den Wert für die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert; gibt den Wert an, bei dem eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird) des Peptids B1 zu ermitteln, wurden die erhobenen Daten (Abbildung 26) mit Hilfe des Excel Solvers einem *fit* unterzogen und mit Hilfe dieses *fits* der IC_{50} -Wert bestimmt. In diesen Berechnungen wurde ein IC_{50} -Wert von $64 \pm 7,3 \mu\text{M}$ für Peptid B1 ermittelt. In einem nächsten Schritt wurden Titrationsexperimente mit Peptid B2 durchgeführt.

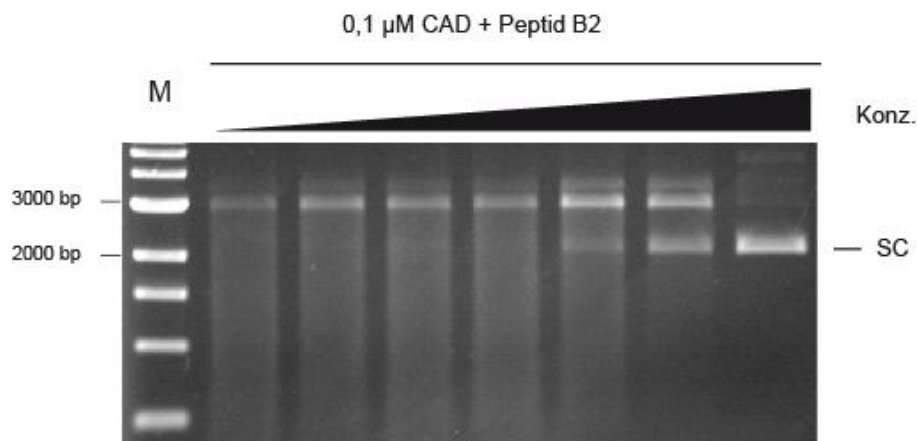


Abbildung 27: Titrationsexperimente mit Peptid B2

Gezeigt wird exemplarisch ein Titrationsversuch mit Peptid B2. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen Peptid B2 (0, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 5, 10 μM) mit aktivierter Nuklease CAD (0,1 μM) und sc-Plasmid DNA Substrat zunächst über Nacht prä-inkubiert. Die Spaltreaktion wurde am Folgetag mit Mg^{2+} gestartet und nach 10 min durch Zugabe von AAP gestoppt. Es wird deutlich, dass Peptid B2 seine Wirkung in einem Bereich von ca. 1-10 μM entfaltet. M, Größenmarker.

Die Abbildung zeigt, dass Peptid B2 in den Versuchen bereits ab einer Konzentration von ca. 1 μM eine inhibitorische Wirkung entfaltete. Die Titrationsversuche mit Peptid B2 wurden ebenfalls mehrere Male wiederholt und, wie im Falle von Peptid B1, ausgewertet (siehe oben) sowie Mittelwerte berechnet. Anschließend erfolgte wiederum eine graphische Auswertung der erhobenen Daten.

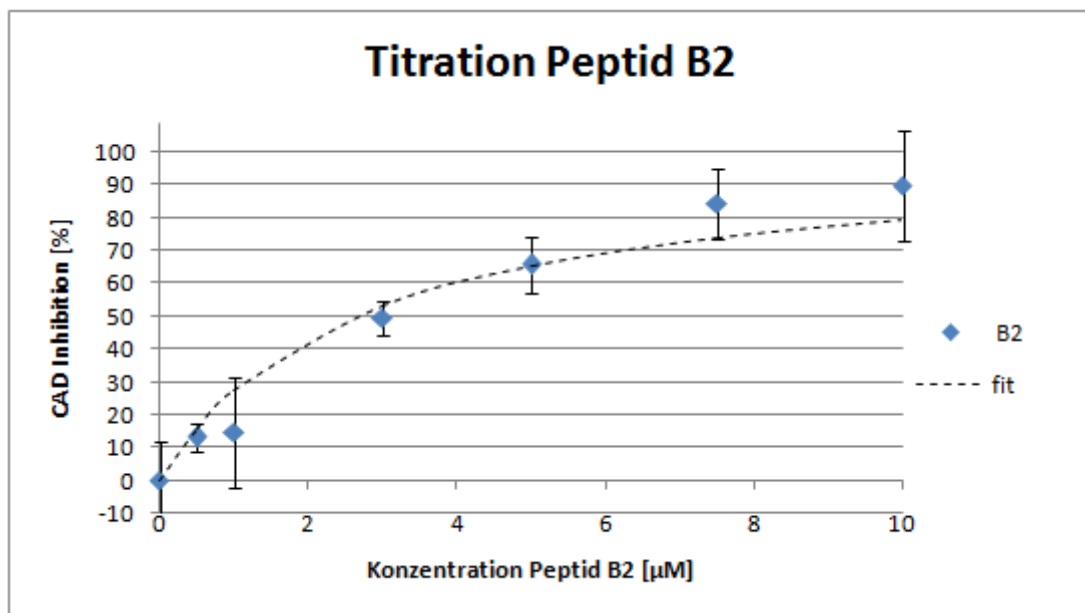


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Peptid B2 Titrationsexperimente

Die Abbildung zeigt die CAD Inhibition (%) in Abhängigkeit zur Peptid B2 Konzentration (blau). Für die Auswertung wurden mehrere Titrationsexperimente durchgeführt und anschließend ausgewertet. Nun wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung abgeleitet. Danach wurden die erhobenen Daten mit Hilfe des Excel Solvers einem *fit* unterzogen (gestrichelte Linie). Mit Hilfe dieses *fits* konnte ein IC_{50} -Wert (halbmaximale CAD Inhibition) für das Peptid B2 von $2,6 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Danach wurde, wie auch bereits für Peptid B1, der IC_{50} -Wert für Peptid B2 bestimmt. Auch hier wurden die Daten für Peptid B2 mit Hilfe des Excel Solvers einem *fit* unterzogen und über diesen *fit* der IC_{50} -Wert bestimmt. In diesen Berechnungen wurde ein IC_{50} -Wert von $2,6 \pm 0,22 \mu\text{M}$ für Peptid B2 ermittelt.

3.2.5 NucA Inhibitionsassays

Nachdem die inhibitorische Wirkung der Peptide B1 und B2 auf die Nuklease CAD erfolgreich untersucht wurde (s.o.), stellte sich die Frage, ob diese Peptide eine generelle inhibitorische Wirkung auf $\beta\beta\alpha$ -Me (Metall)-Finger Nukleasen haben. Um dies zu ermitteln, wurden Versuche mit NucA, einer unspezifischen $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger Endonuklease aus *Anabaena* sp, als Zielnuklease durchgeführt. Für diese Experimente wurden die Peptide in dem Überschuss eingesetzt, der in den Versuchen mit der Nuklease CAD bereits zu einer annähernd kompletten Inhibition der Nukleaseaktivität führte (B1 = 1000-facher Überschuss; B2 = 100-facher Überschuss; siehe 3.2.4).

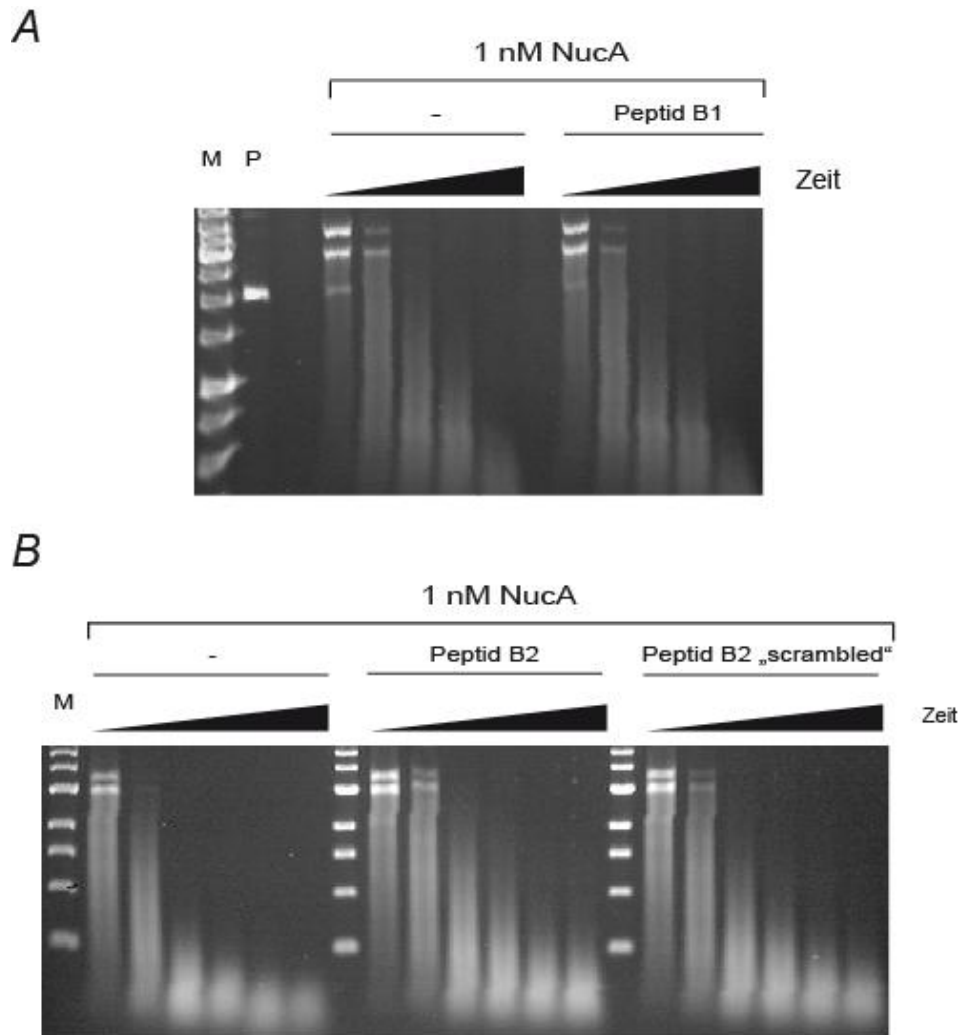


Abbildung 29: NucA Inhibitionsassays

A: Gezeigt sind Kinetiken ($t = 10 \text{ sec}, 30 \text{ sec}, 60 \text{ sec}, 3 \text{ min}, 5 \text{ min}, 10 \text{ min}$) der sc-Plasmid-DNA Spaltung durch NucA (1 nM) in Abwesenheit und Anwesenheit von Peptid B1 (1 μM). Peptid B1 weist keinen inhibitorischen Effekt gegenüber NucA auf. B: Gezeigt sind Kinetiken ($t = 10 \text{ sec}, 30 \text{ sec}, 60 \text{ sec}, 3 \text{ min}, 5 \text{ min}, 10 \text{ min}$) der sc-Plasmid-DNA Spaltung durch NucA (1 nM) in Abwesenheit und Anwesenheit von Peptid B2 sowie Peptid B2 „scrambled“ (100 nM). Während ein 100-facher Peptid B2 Überschuss CAD fast vollkommen inhibiert, ist die Aktivität von NucA kaum reduziert. Peptid B2 „scrambled“ verhält sich in den Versuchen wie Peptid B2. M, Größenmarker; linear, linearisierte Plasmid DNA; sc, *supercoiled* Plasmid DNA.

Wie die Abbildung zeigt, wird die Substrat Plasmid-DNA nach einer Inkubation von 30 - 60 sec mit NucA bereits fast vollkommen abgebaut (Abschnitt A und B). Ebenso verhält sich NucA nach einer vorherigen Inkubation mit Peptid B1, auch hier ist bereits nach 30 - 60 sec die Substrat Plasmid-DNA nahezu vollständig verdaut (Abschnitt A). Die in den Versuchen verwendete Konzentration von Peptid B1 stellte hierbei einen 1000-fachen Überschuss über NucA dar, ein Überschuss, der CAD fast vollkommen inhibierte (3.2.4). In weiteren Experimenten wurde NucA mit dem Überschuss an Peptid B2 und Peptid B2 „scrambled“ inkubiert, in dem CAD durch Peptid B2 bereits nahezu vollkommen inhibiert wurde (100-facher Überschuss; siehe 3.2.4). Im Gegensatz zur Inkubation von Peptid B1 mit NucA, scheint die Inkubation mit Peptid B2 einen minimalen Effekt auf NucA zu haben (Abschnitt B). Dieser minimale Effekt konnte jedoch auch nach einer Inkubation von NucA mit Peptid B2 „scrambled“ beobachtet werden (Abschnitt B).

3.2.6 Strukturvorhersage für die Peptide B1 und B2

Mit Hilfe von *Online* Datenbanken und Servern wurde nun eine mögliche Sekundärstruktur der Peptide sowohl im Kontext der gesamten ICAD AS-Sequenz, als auch in Form der isolierten Peptide prognostiziert:

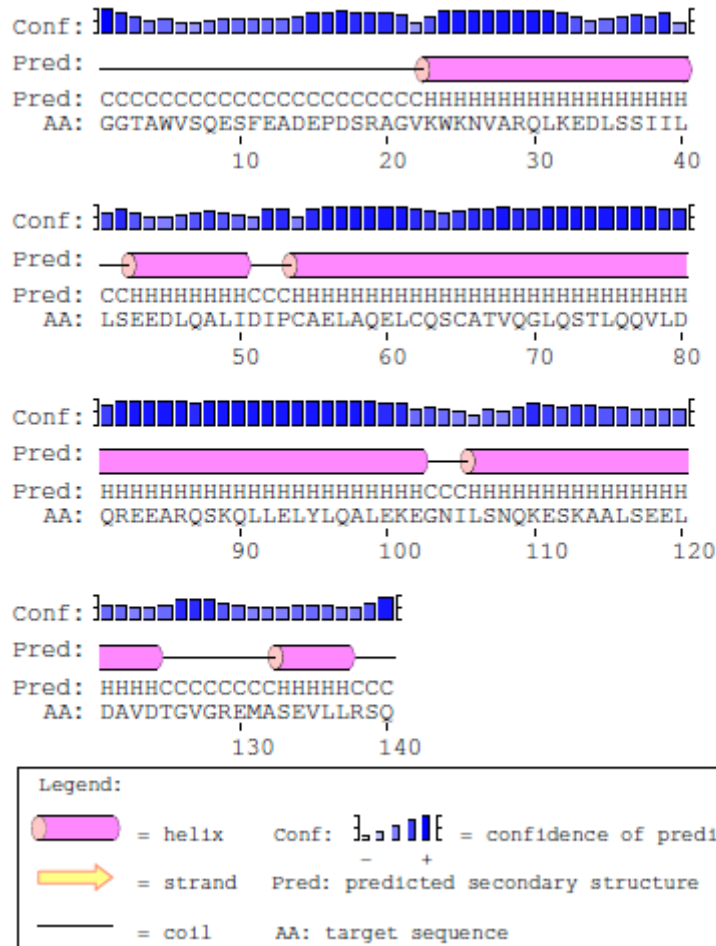


Abbildung 30: Sekundärstrukturvorhersage für ICAD AS-Bereiche 101-240

Gezeigt ist die Sekundärstrukturvorhersage für den ICAD AS-Bereich 101 bis 240 (nach dem Psipred Server). Der Bereich, der die Peptide B1 und B2 umfasst (V-A-R-Q-L-K-E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L-Q-A-L-I-D-I) umspannt hierbei zwei α -Helices. Legende: α -Helices, rosa; Aussagewahrscheinlichkeit, blaue Balken (großer Balken: sehr wahrscheinlich, kleiner Balken: geringfügig wahrscheinlich); *coil*, schwarze Linie; Aminosäuren, AA.

Wie die Abbildung darstellt, wird laut des Servers Psipred für den Bereich der Peptide B1 und B2 eine α -helikale Sekundärstruktur vorhergesagt.

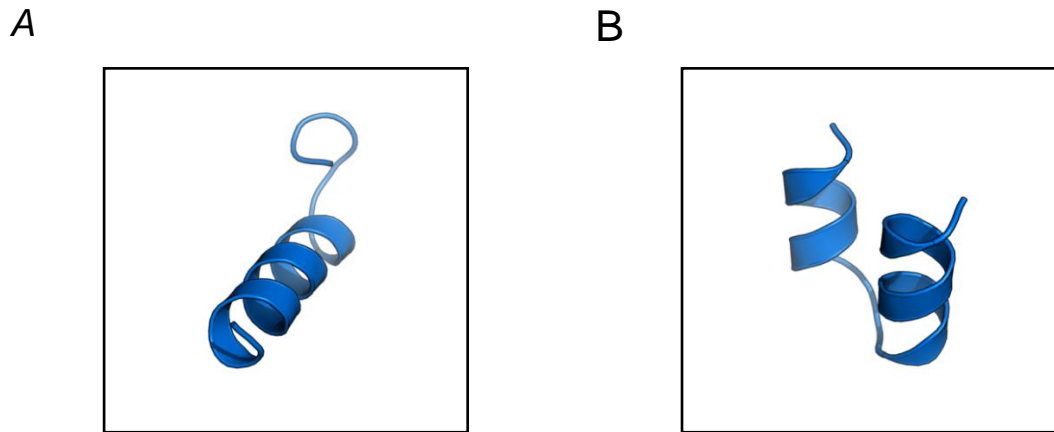


Abbildung 31: Sekundärstrukturvorhersage für die beiden Peptide B1 und B2

A: Gezeigt ist die Sekundärstrukturprognose für das isolierte Peptid B1 laut PEP-Fold. Peptid B1 formt eine lange α -Helix B: Gezeigt ist die Sekundärstrukturprognose für das isolierte Peptid B2 laut PEP-Fold. Peptid B2 besteht aus zwei α -Helices, die über einen kurzen Linker verknüpft sind.

Der Sever PEP-Fold berechnet für Peptid B1 eine längere α -helikale Struktur. Laut Prognose soll Peptid B2 ebenso eine α -helikale Struktur formen. Hier sind jedoch zwei kurze α -Helices zu erkennen, die über eine Linker-Region verknüpft sind.

3.2.7 CD-Spektrum von Peptid B1

Zur Analyse der Sekundärstruktur der Peptide wurden diese CD-spektroskopisch untersucht.

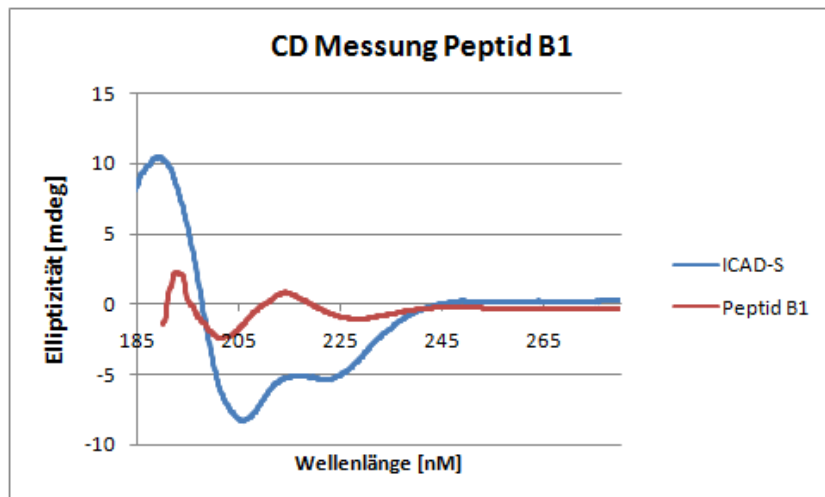


Abbildung 32: CD-Spektrum von Peptid B1

Gezeigt ist das CD-Spektrum von Peptid B1 (rot) im Vergleich zu ICAD-S (blau), einem Protein mit hohem Anteil an α -Helices. Beide Spektren zeigen zwei negative Peaks bei ca. 225 nm bzw. 205 nm, sowie einen positiven Peak bei ca. 190 nm.

Wie die Abbildung zeigt, ergaben die CD-spektroskopischen Untersuchungen für Peptid B1 ein relativ schwaches Signal. Problematisch war bei den Messungen der Anteil an DMSO, in dem die Peptide gelöst waren. Da DMSO auch in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm absorbiert und daher die Messungen entscheidend stört, wurden die Peptide gegen einen speziellen CD-Puffer dialysiert. Dies führte besonders bei Peptid B2 zu einer starken Verringerung seiner Löslichkeit. Für dieses Peptid konnte daher kein Spektrum aufgezeichnet werden. Das CD-Spektrum von Peptid B1 zeigt, trotz des schwachen Signals, Ähnlichkeiten zum CD-Spektrum von ICAD-S. ICAD-S ist ein Protein mit einem großen Anteil an α -Helices. Beide Spektren weisen zwei negative Peaks bei ca. 205 nm und 225 nm, sowie einen positiven Peak bei ca. 190 nm auf.

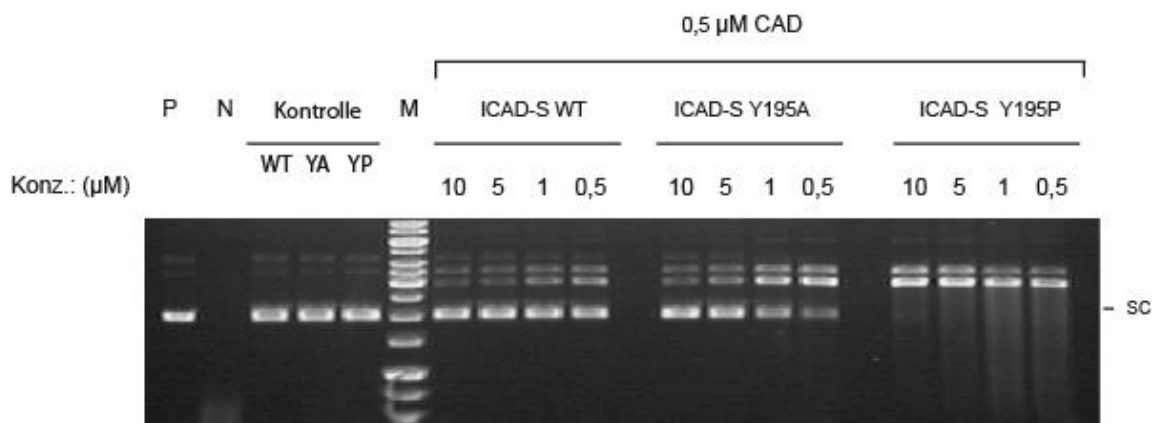
3.3 Untersuchungen zur CAD Inhibition durch ICAD

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene ICAD Varianten erstellt und im Anschluss auf ein noch vorhandenes Inhibitionsvermögen getestet. Die Regionen, in denen durch gezielte Mutagenese Aminosäurereste verändert wurden, stellten im Wesentlichen die Bereiche dar, die in der SPOT-Methode von den *spots* B1/B2, sowie *spot* B10 abgedeckt wurden. Diese Bereiche befinden sich in der D2-Domäne (auch inhibitorische Domäne genannt) von ICAD.

3.3.1 ICAD-S Y195 Varianten mit stark reduzierter Inhibition

Bereits vor den Versuchen mit der SPOT-Methode fiel auf, dass der Bereich, der im nativen ICAD Protein von Peptid B10 widergespiegelt wird, sehr sensitiv auf Triple-Alanin Mutationen reagiert (siehe Diplomarbeit Daniel Kutscher). Diese Mutanten hatten teilweise ein sehr stark reduziertes Inhibitionsvermögen von ICAD-S in den Versuchen beobachten lassen. Daher wurden nun in diesem Bereich sukzessive Punktmutationen eingeführt, in denen der native Aminosäurerest gegen einen Alaninrest ausgetauscht wurde (Q190A, L191A, L192A, E193A, L194A, Y195A). In diesen Versuchen zeigte vor allem Variante Y195A ein reduziertes CAD Inhibitionsvermögen (siehe Abbildung 33). Wurde an dieser Position nun ein Prolin eingefügt, so führte dies zu einer drastisch reduzierten inhibitorischen Wirkung dieser ICAD Variante (siehe Abbildung 33). Für die Inhibitionsversuche mit ICAD wurden die Versuchsparameter, wie auch bei den Inhibitionsversuchen mit den Peptiden (3.2.4), so gewählt, dass, zwecks Auswertung, der Anteil an sc-Plasmid-DNA quantifiziert werden konnte.

A



B

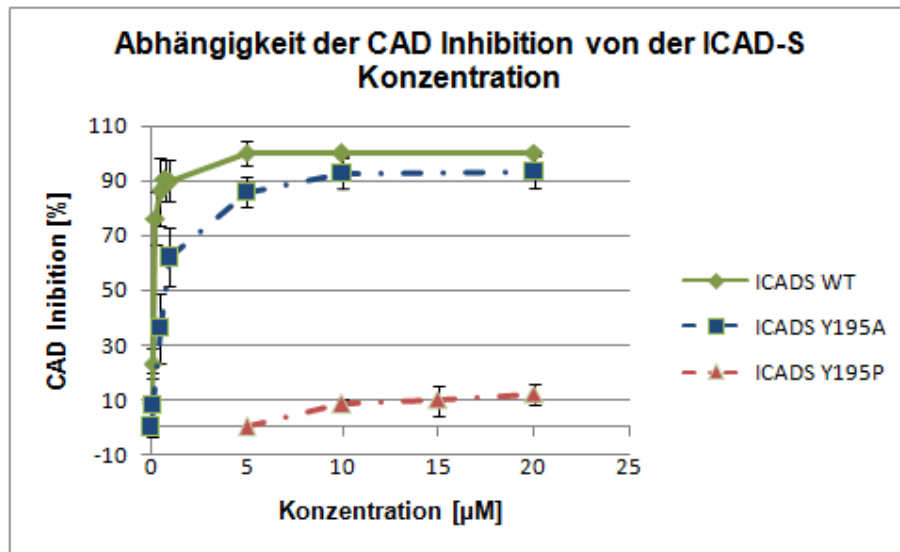


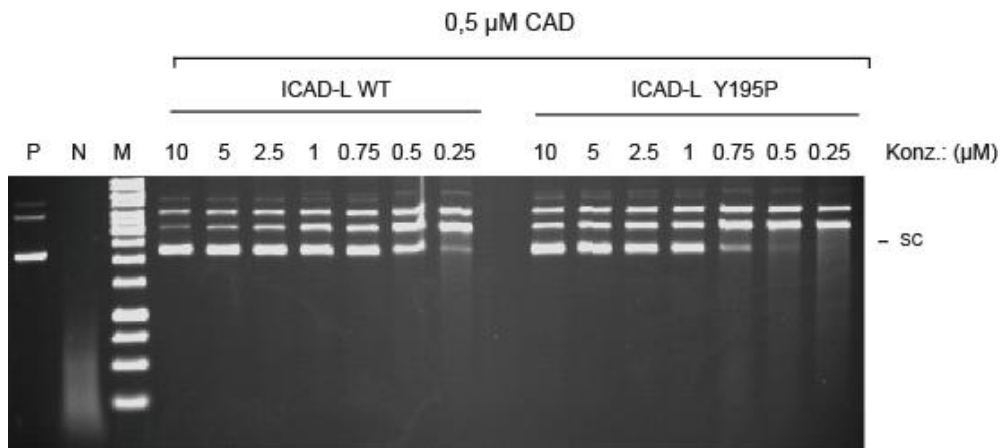
Abbildung 33: Inhibitionsassays mit ICAD-S Varianten Y195

A: Beispielhaft wird ein Inhibitionsassay mit den ICAD-S Varianten Y195 (Y195A und Y195P) gezeigt. Die Varianten wurden in verschiedenen Konzentrationen (10, 5, 1, 0,5 µM) zu bereits aktivierter Nuklease CAD (0,5 µM) titriert und das Gemisch über Nacht inkubiert. Die noch verbleibende Spaltaktivität des wiedergebildeten Komplexes wurde mittels Inkubation mit Plasmid-DNA Substrat analysiert. Die ICAD-S Varianten Y195 zeigten im Vergleich zum Wildtyp (WT) ein schlechteres Inhibitionsverhalten. Zur Kontrolle wurden die verschiedenen ICAD-S Varianten ohne Nuklease mit dem Plasmid-DNA Substrat inkubiert (Kontrolle). Hier war keine Spaltaktivität zu beobachten. N, Plasmid-DNA Substrat nur mit CAD (0,5 µM) inkubiert; P, Plasmid-DNA Substrat. B: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der CAD Inhibition von der Konzentration der ICAD-S Varianten Y195. Zwecks Datenerhebung wurden mehrere Titrationsexperimente (in verschiedenen Konzentrationsbereichen) durchgeführt und anschließend ausgewertet. Nun wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung abgeleitet. WT ICAD-S ist in grün dargestellt, die ICAD-S Variante Y195A in blau und Y195P in rot (jeweils die gestrichelte Linie). Die ICAD-S Varianten Y195P und A inhibieren die Nuklease CAD deutlich schlechter als WT ICAD-S.

Wie die Kontrollen zeigen (Abbildung 33A) wird das Plasmid-DNA Substrat nach einer Inkubation mit ICAD-S WT, Y195A und Y195P nicht gespalten. Die Inkubation mit aktivierter Nuklease CAD hingegen führte zu einem vollständigen Verdau des Substrats (N). Weiter wird ersichtlich, dass eine vorherige Inkubation aktivierter Nuklease CAD mit ICAD-S WT im Konzentrationsbereich zwischen 10-0,5 µM zu einer starken Inhibition der Spaltaktivität führte. In diesen Ansätzen war das sc-Plasmid-DNA Substrat noch fast vollkommen unverdaut. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung, dass nach einer vorherigen Inkubation der Nuklease CAD mit der ICAD-S Variante Y195A der Anteil an sc-Plasmid-DNA bereits bei relativ hohen Inhibitorkonzentrationen abnimmt. So liegt der sc-Anteil bei einer Konzentration von 10 µM ICAD-S Y195A noch etwa bei 100 %, nimmt dann aber bereits bei einer Konzentration von 5 µM leicht ab und ist bei einer Konzentration von 0,5 µM nur noch schwach erkennbar. Im Falle der Versuche mit ICAD-S Variante Y195P war der Effekt noch drastischer. Wie die Abbildung zeigt, waren in diesen Versuchen äußerst hohe Inhibitorkonzentrationen notwendig, um überhaupt noch sc-Plasmid-DNA beobachten und quantifizieren zu können. Abbildung 33B zeigt die graphische Auswertung der erhobenen Daten. Hierzu wurden mehrere Titrationsexperimente (in verschiedenen Konzentrationsbereichen) durchgeführt und anschließend ausgewertet (wiederum mit Hilfe eines *BioDocAnalyze* Gel-Analyse Systems [Biometra], basierend auf dem Anteil an *supercoiled* Plasmid-DNA; siehe 3.2.4). Darauf

folgend wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung berechnet. Um anhand der Daten IC_{50} -Werte zu berechnen, wurden die Daten mit Hilfe des Excel Solver einem *fit* unterzogen. Basierend auf diesem *fit* ergab sich für die hier durchgeführten Experimente ein IC_{50} -Wert von $0,13 \pm 0,01 \mu\text{M}$ für ICAD-S WT, sowie ein IC_{50} -Wert von $0,78 \pm 0,03 \mu\text{M}$ für Y195A und ein IC_{50} -Wert von $143 \pm 2,7 \mu\text{M}$ für Y195P. In weiteren Versuchen wurde nun die lange Isoform von ICAD (ICAD-L) einer Mutagenese unterzogen.

A



B

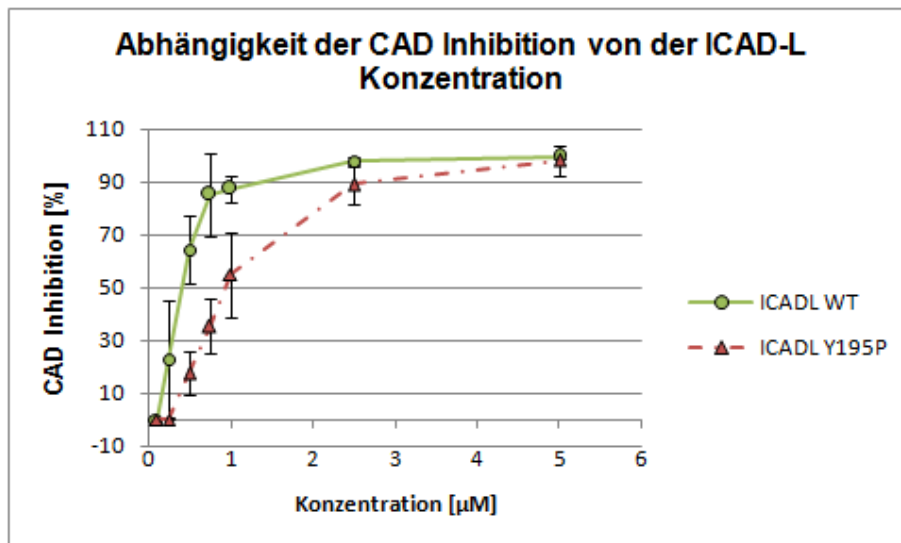


Abbildung 34: Inhibitionsassay mit ICAD-L Variante Y195P

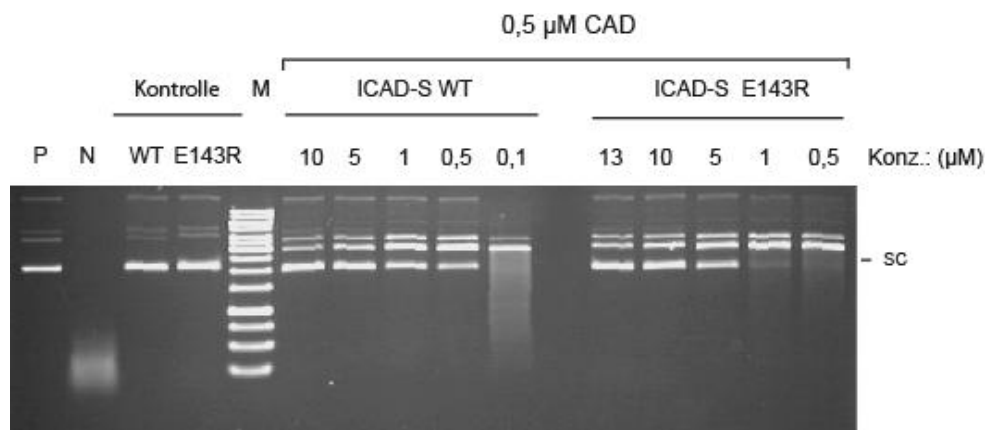
A: Beispielhaft wird ein Inhibitionsassay mit WT ICAD-L und der Variante Y195P gezeigt. Die Varianten wurden in verschiedenen Konzentrationen (10, 5, 2.5, 1, 0.75, 0.5 und 0.25 μM) zu bereits aktivierter Nuklease CAD (0.5 μM) titriert und über Nacht inkubiert. Die noch verbleibende Spaltaktivität wurde mittels Inkubation mit Plasmid-DNA Substrat analysiert. ICAD-L Y195P zeigt im Vergleich zum Wildtyp (WT) ein schlechteres Inhibitionsverhalten. N, Plasmid-DNA Substrat nur mit CAD (0.5 μM) inkubiert; P, Plasmid-DNA Substrat. B: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der CAD Inhibition von der Konzentration der ICAD-L Variante Y195P. Zwecks Datenerhebung wurden mehrere Titrationsexperimente (in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen) durchgeführt und darauf folgend ausgewertet. Anschließend wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung berechnet. WT ICAD-L ist in grün dargestellt, Variante Y195P in rot (gestrichelte Linie). ICAD-L Y195P inhibiert die Nuklease CAD schlechter als WT ICAD-L.

Die Versuche mit ICAD-L Y195A zeigten im Gegensatz zu den Versuchen mit ICAD-S keine größeren Unterschiede zum Wildtyp. Bei der Variante ICAD-L Y195P waren hingegen weiterhin Unterschiede im Inhibitionsverhalten zu detektieren. Während in den Versuchen mit Wildtyp ICAD-L bis zu einer Konzentration von 0,25 μM noch sc-Plasmid-DNA zu beobachten war, wurde diese in den Versuchen mit Y195P ICAD-L bereits bei einer Konzentration von 0,5 μM fast vollständig abgebaut. In Abschnitt B sind die erhobenen Daten dieser Versuche mit ICAD-L Y195P graphisch dargestellt. Hierzu wurden mehrere Titrationsexperimente (in verschiedenen Konzentrationsbereichen) durchgeführt und anschließend, wie bereits zuvor beschrieben, ausgewertet. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte dieser Daten, sowie die jeweiligen Fehlerwerte. Wie die Abbildung zeigt, inhibiert die ICAD-L Variante Y195P die Nuklease CAD weniger effizient als der Wildtyp. Basierend auf diesen Daten wurden, wie bereits beschrieben, IC_{50} -Werte berechnet. Die IC_{50} -Werte betragen in diesen Experimenten für ICAD-L WT $0,34 \pm 0,05 \mu\text{M}$ und für ICAD-L Y195P $1,04 \pm 0,15 \mu\text{M}$.

3.3.2 ICAD E143R Varianten mit reduzierter CAD Inhibition

Basierend auf den SPOT-Membran Versuchen wurde im Folgenden, der von Peptid B2 repräsentierte AS-Bereich, in ICAD (volle Länge) einer Mutagenese unterzogen und auf diese Weise in Inhibitionsassays analysiert. Dazu wurden zum einen Tripel-Alanin Mutationen, sowie Punktmutationen eingeführt ($^{126}\text{NVA}^{128}$ zu $^{126}\text{AAA}^{128}$, $^{129}\text{RQL}^{131}$ zu $^{129}\text{AAA}^{131}$, $^{132}\text{KED}^{134}$ zu $^{132}\text{AAA}^{134}$, $^{135}\text{LSS}^{137}$ zu $^{135}\text{AAA}^{137}$, $^{138}\text{IIL}^{140}$ zu $^{138}\text{AAA}^{140}$, $^{143}\text{EED}^{145}$ zu $^{143}\text{AAA}^{145}$, $^{146}\text{LQA}^{148}$ zu $^{146}\text{AAA}^{148}$, E143R, E143P, E144R, D145R). In diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass die ICAD Varianten $^{143}\text{AAA}^{145}$, E143P sowie E143R ein leicht verändertes Inhibitionsverhalten zeigen. Daraufhin wurden genauere Versuche mit der ICAD Variante E143R durchgeführt, diese sind im Folgenden dargestellt:

A



B

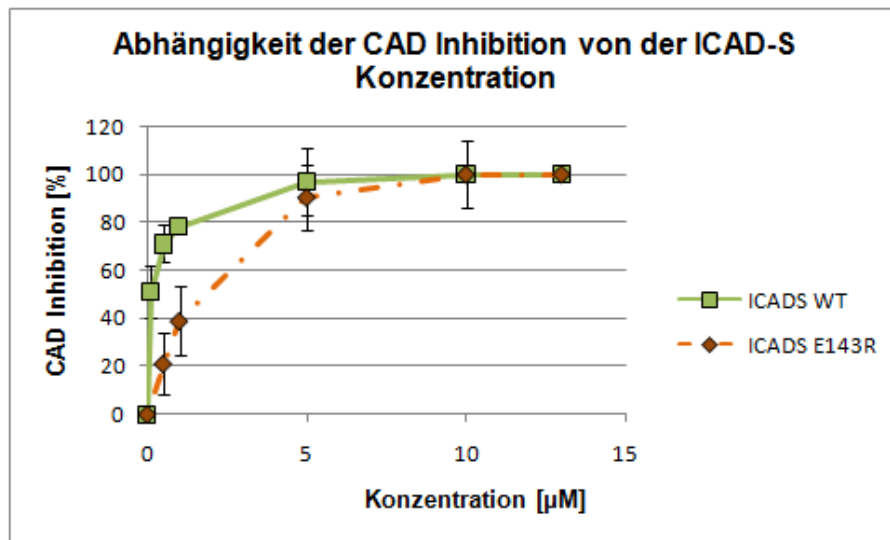


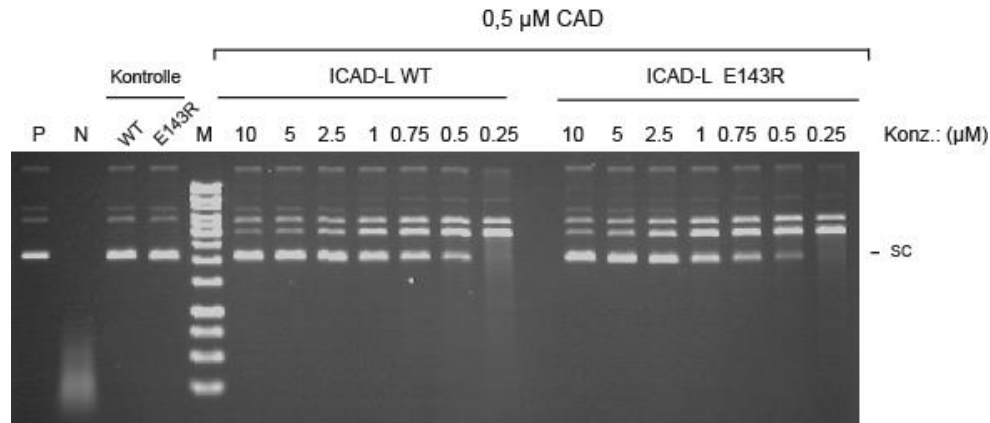
Abbildung 35: Inhibitionsassay mit ICAD-S Variante E143R

A: Beispielhaft wird ein Inhibitionsassay mit der ICAD-S Variante E143R, sowie WT ICAD-S gezeigt. Die Varianten wurden in verschiedenen Konzentrationen (WT: 10, 5, 1, 0.5, 0.1 µM; E143R: 13, 10, 5, 1, 0.5 µM) zu bereits aktivierter Nuklease CAD (0.5 µM) titriert und das Gemisch über Nacht inkubiert. Die noch verbleibende Spaltaktivität des wiedergebildeten Komplexes wurde mittels Inkubation mit Plasmid-DNA Substrat analysiert. Die ICAD-S Variante E143R zeigte im Vergleich zum Wildtyp (WT) ein schlechteres Inhibitionsverhalten. Zur Kontrolle wurden die ICAD-S Varianten auch ohne Nuklease mit dem Plasmid-DNA Substrat inkubiert (Kontrolle). N, Plasmid-DNA Substrat nur mit CAD (0.5 µM) inkubiert; P, Plasmid-DNA Substrat. B: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der CAD Inhibition von der Konzentration der ICAD-S Variante E143R. Zwecks Datenerhebung wurden mehrere Titrationsexperimente durchgeführt und darauf folgend ausgewertet. Anschließend wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung berechnet. WT ICAD-S ist in grün dargestellt, die ICAD-S Variante E143R in orange (gestrichelte Linie). Die ICAD-S Variante E143R inhibiert die Nuklease CAD schlechter als WT ICAD-S.

Wie die Kontrollen zeigen (Abbildung 35A) wird das Plasmid-DNA Substrat nach einer Inkubation mit ICAD-S WT und ICAD-S E143R nicht gespalten. Die Inkubation mit aktivierter Nuklease CAD hingegen führte zu einem vollständigen Verdau des Substrats (N). Außerdem wird ersichtlich, dass eine vorherige Inkubation aktivierter Nuklease CAD mit ICAD-S WT in einem Konzentrationsbereich zwischen 10-0,5 µM zu einer starken Inhibition der Nuklease führte. In diesen Ansätzen war das sc-Plasmid-DNA Substrat noch fast vollkommen unverdaut. Erst bei einer ICAD-S WT Konzentration von 0,1 µM wird das sc-Plasmid DNA Substrat zu einem großen Anteil verdaut. Im Gegensatz dazu demonstriert die Abbildung, dass in den Versuchen mit der ICAD-S Variante E143R höhere Konzentrationen an Inhibitor notwendig waren, um die Spaltung der sc-Plasmid-DNA zu unterdrücken. Hier konnte bereits bei einer Konzentration von 1 µM eine starke Abnahme der sc-Plasmid-DNA beobachtet werden. In Abbildung B sind die erhobenen Daten der Versuche mit ICAD-S E143R graphisch dargestellt. Hierzu wurden mehrere Titrationsexperimente (in verschiedenen Konzentrationsbereichen) durchgeführt und anschließend, wie bereits zuvor beschrieben, ausgewertet. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte dieser Daten, sowie die jeweiligen Fehlerwerte. ICAD-S Variante E143R inhibiert die Nuklease CAD weniger effizient als der Wildtyp. Basierend auf diesen Daten wurden, wie bereits beschrieben, IC_{50} -Werte berechnet. Die IC_{50} -Werte betragen in diesen Experimenten für ICAD-S WT $0,14 \pm 0,01$ µM und für ICAD-S E143R $1,21 \pm 0,11$ µM.

Die Versuche mit ICAD-S E143R wurden im Folgenden auch mit der langen Isoform ICAD-L durchgeführt.

A



B

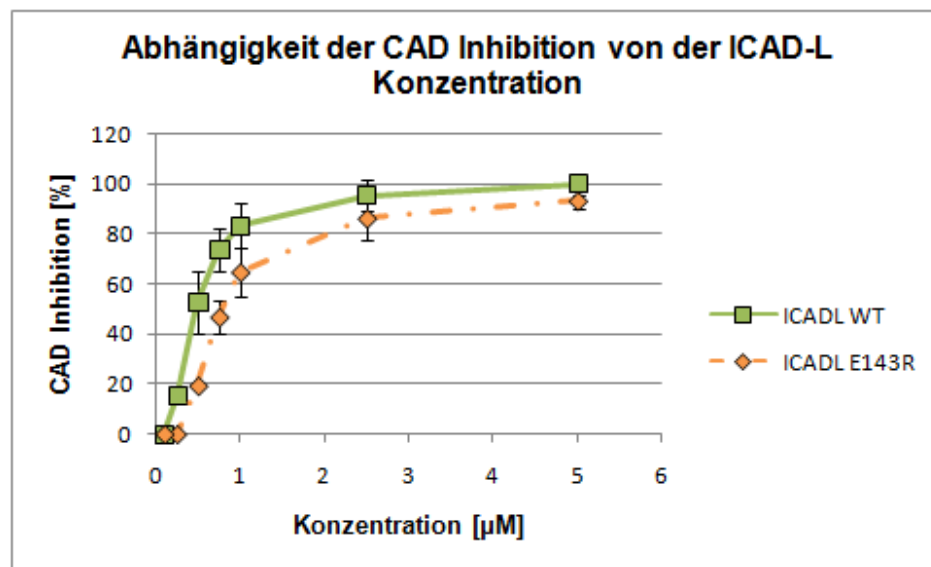


Abbildung 36: Inhibitionsassays mit ICAD-L Variante E143R

A: Beispielhaft wird ein Inhibitionsassay mit der ICAD-L Variante E143R, sowie ICAD-L WT gezeigt. Die Varianten wurden in verschiedenen Konzentrationen (10, 5, 2.5, 1, 0.75, 0.5 und 0.25 μM) zu bereits aktivierter Nuklease CAD (0.5 μM) titriert und das Gemisch über Nacht inkubiert. Die noch verbleibende Spaltaktivität wurde mittels Inkubation mit Plasmid-DNA Substrat analysiert. ICAD-L E143R zeigte im Vergleich zum Wildtyp (WT) ein schlechteres Inhibitionsverhalten. Zur Kontrolle wurden die verschiedenen ICAD-L Varianten ohne Nuklease mit dem Plasmid-DNA Substrat inkubiert (Kontrolle). N, Plasmid-DNA Substrat nur mit CAD (0.5 μM) inkubiert; P, Plasmid-DNA Substrat. B: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der CAD Inhibition von der Konzentration der ICAD-L Variante E143R. Zwecks Datenerhebung wurden mehrere Titrationsexperimente durchgeführt und darauf folgend ausgewertet. Anschließend wurden die Mittelwerte kalkuliert und die jeweilige Standardabweichung berechnet. WT ICAD-L ist in grün dargestellt, Variante E143R in orange (gestrichelte Linie). ICAD-L E143R inhibiert die Nuklease CAD schlechter als WT ICAD-L.

Wie die Kontrollen zeigen (Abbildung 36A) wird das Plasmid-DNA Substrat nach einer Inkubation mit ICAD-L WT und ICAD-L E143R nicht gespalten. Die Inkubation mit aktivierter Nuklease CAD hingegen führte zu einem vollständigen Verdau des Substrats (N). Darüber hinaus wird ersichtlich, dass eine vorherige Inkubation aktivierter Nuklease CAD mit ICAD-L WT in einem Konzentrationbereich zwischen 10-0,5 μM zu einer starken Inhibition der Spaltaktivität führte. In diesen Ansätzen war das sc-Plasmid-DNA Substrat noch fast vollkommen unverdaut. Erst bei einer ICAD-L WT Konzentration von 0,25 μM wird das sc-Plasmid-DNA Substrat zu einem großen Teil

verdaut. Im Gegensatz dazu veranschaulicht die Abbildung, dass in den Versuchen mit ICAD-L Variante E143R höhere Konzentrationen an Inhibitor notwendig waren, um die Spaltung der sc-Plasmid-DNA zu unterdrücken. Hier konnte bereits bei einer Konzentration von 0,5 μM eine starke Abnahme der sc-Plasmid-DNA beobachtet werden. In Abschnitt B sind die erhobenen Daten der Versuche mit ICAD-L E143R graphisch dargestellt. Hierzu wurden mehrere Titrationsexperimente (in verschiedenen Konzentrationsbereichen) durchgeführt und anschließend, wie bereits zuvor beschrieben, ausgewertet. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte dieser Daten, sowie die jeweiligen Fehlerwerte. Die Abbildung demonstriert, dass die ICAD-L Variante E143R die Nuklease CAD weniger effizient inhibiert als der Wildtyp. Basierend auf diesen Daten wurden, wie bereits beschrieben IC_{50} -Werte berechnet. Die IC_{50} -Werte betragen in diesen Experimenten für ICAD-L WT $0,45 \pm 0,06 \mu\text{M}$ und für ICAD-L E143R $0,94 \pm 0,13 \mu\text{M}$.

3.3.3 Graphische Darstellung der ICAD Inhibitionsassays

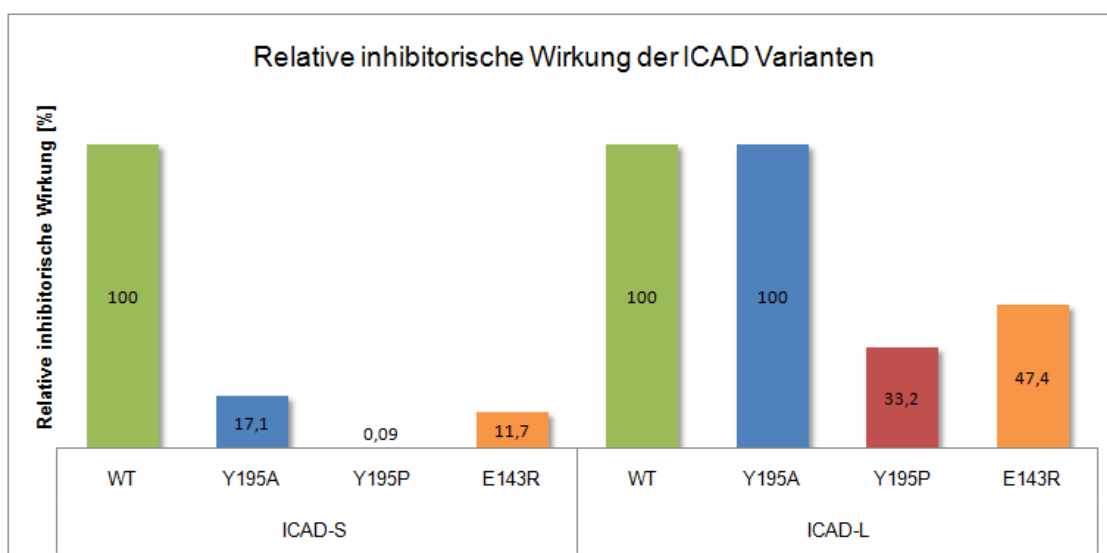


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Inhibitionsversuche mit ICAD

Gezeigt ist die graphische Darstellung der Ergebnisse der Inhibitionsversuche mit ICAD-S und ICAD-L. Im Vergleich zu WT ICAD-S (grün) verfügt die Variante Y195A (blau) nur noch über 17,1% der relativen inhibitorischen Wirkung, Y195P (rot) nur noch über 0,094 % und E143R (orange) über 11,7 %. In den Versuchen mit ICAD-L zeigte sich, dass WT ICAD-L (grün) im Vergleich zu der Variante Y195A (blau) ebenso über 100% der inhibitorischen Wirkung, Y195P (rot) jedoch nur noch über 33,2 % und E143R (orange) über 47,39 % verfügt. Die inhibitorische Wirkung von ICAD-S und ICAD-L WT auf die Nuklease CAD wurde hierbei auf 100 % gesetzt.

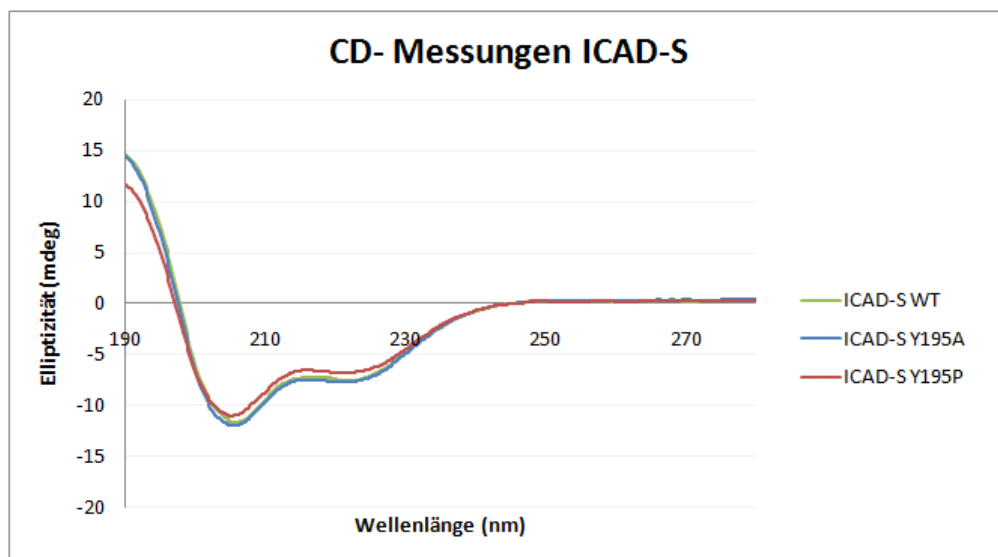
Zur graphischen Darstellung der Inhibitionsversuche wurde die relative inhibitorische Wirkung der verschiedenen ICAD Varianten berechnet. Dazu wurde in einem ersten Schritt die inhibitorische Wirkung des jeweiligen Wildtyp auf 100 % gesetzt und anschließend, basierend auf den berechneten IC_{50} -Werten, die relative inhibitorische Wirkung der ICAD Varianten ermittelt. Wie die Abbildung zeigt, verfügt die ICAD-S Variante Y195A nur noch über 17,1 % der relativen inhibitorischen Wirkung des Wildtyps, Y195P nur noch über 0,09 % und E143R über 11,7 %. Im Falle von ICAD-L zeigte die Variante Y195A eine nahezu identische relative inhibitorische Wirkung

wie der Wildtyp. Variante Y195P zeigte im Vergleich zum Wildtyp 33,2 % relative inhibitorische Wirkung und Variante E143R 47,39 % relative inhibitorische Wirkung.

3.3.4 CD-Spektroskopie

Im Zuge der Inhibitionsversuche mit ICAD, im Besonderen mit ICAD-S, zeigte die Variante Y195P ein stark reduziertes Inhibitionsvermögen. Um zu überprüfen, ob die an dieser Position (Y195) eingefügten Mutationen Auswirkungen auf die Struktur von ICAD haben, wurden CD-Spektren der verschiedenen ICAD Varianten aufgenommen.

A



B

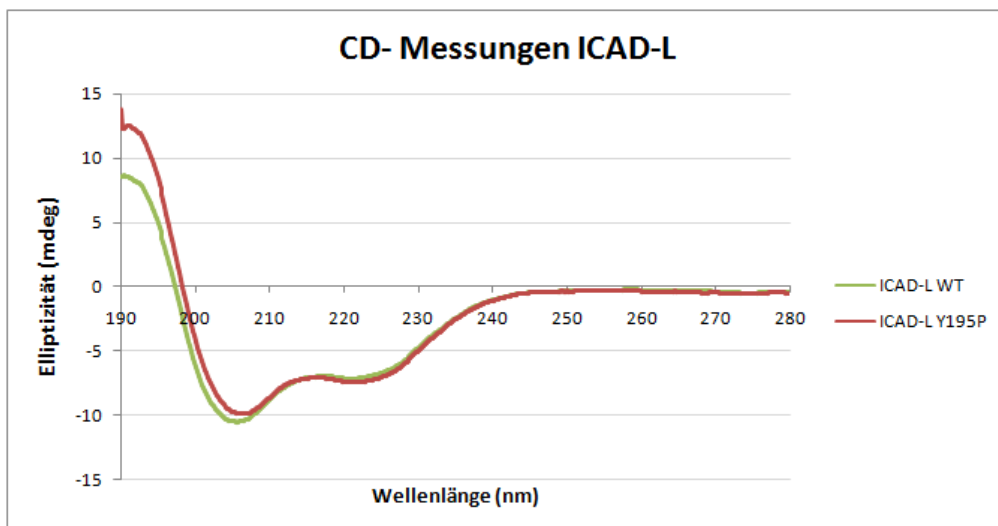


Abbildung 38: CD-Spektren der ICAD Varianten Y195

A: Gezeigt sind die CD-Spektren von ICAD-S WT (grün), sowie der ICAD-S Varianten Y195A (blau) und Y195P (rot). B: Dargestellt sind die CD-Spektren von ICAD-L WT (grün) und Y195P (rot). Die CD-Spektren weisen keine größeren Unterschiede auf.

Wie Abbildung 38 offenbart, weisen die CD-Spektren der verschiedenen ICAD Varianten im Vergleich zum Wildtyp Protein keine größeren Unterschiede auf und lassen somit vermutlich auf identische Sekundärstruktur-Zusammensetzungen schließen. Hierdurch können größere strukturelle Veränderungen durch die eingefügten Aminosäureaustausche ausgeschlossen werden.

3.3.5 Sekundärstrukturvorhersage für die Region um Position Y195

Die Sekundärstrukturvorhersage für den Bereich der D2-Domäne von ICAD wurde bereits in Abbildung 30 illustriert. Wie die Abbildung darlegt, befindet sich die Position Y195, laut Strukturprognose, in einer α -Helix.

3.4 Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD

Neben der Erforschung der Wechselwirkungen zwischen CAD und ICAD, die an der Inhibition der Nuklease beteiligt sind, wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit außerdem Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD durchgeführt. Diese Faltungshelfer Aktivität wurde bisher allein dem C-Terminus von ICAD zugeschrieben. Neue Studien lassen jedoch vermuten, dass gerade auch die Region der beiden Caspase Spaltstellen von ICAD mit CAD interagiert und dabei für die korrekte Faltung von CAD wichtige Kontakte etabliert¹⁴⁴. Interessanterweise wurde eine solche Interaktion durch die SPOT Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, bestätigt. Um daher eine mögliche Einflussnahme der Caspase-3 Spaltstellen auf die Chaperon-ähnliche Aktivität von ICAD-L untersuchen zu können, wurden jeweils TEV-Protease Spaltstellen direkt nach den Caspase-3 Spaltstellen (¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴) inseriert¹⁴⁴. Dadurch konnte ICAD-L^{TEV} (ICAD^{TEV}), trotz mutierter Caspase-3 Spaltstellen, nach Inkubation mit TEV-Protease in drei Fragmente, ähnlich dem Caspase-3 Verdau, gespalten werden.

3.4.1 Aktivitätsassay mit ICAD^{TEV}

ICAD^{TEV} wurde nun in ersten Versuchen mit der Nuklease CAD ko-exprimiert. Im Anschluss wurde der Komplex aus Nuklease und ICAD^{TEV} mit TEV-Protease inkubiert und die Aktivität der Nuklease überprüft.

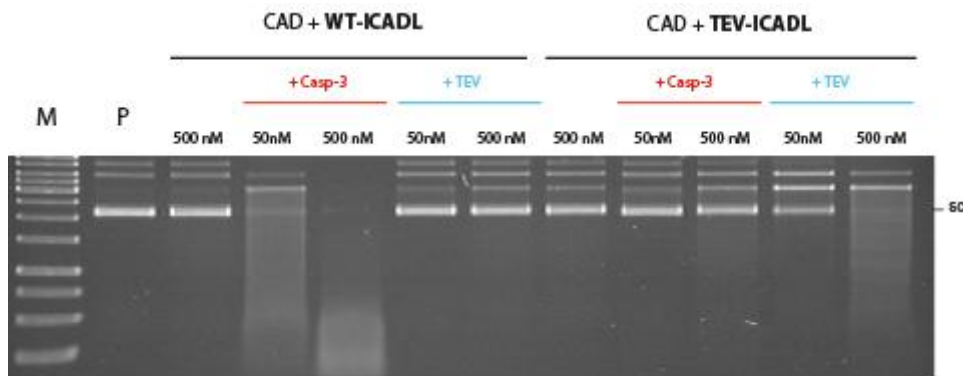


Abbildung 39: Aktivitätsvergleich von mit ICAD^{WT} und ICAD^{TEV} ko-exprimierter CAD

Abgebildet ist ein Aktivitätsassay mit CAD, die zum einen mit ICAD^{WT} ko-exprimiert wurde und mit CAD, die zum anderen mit ICAD^{TEV} ko-exprimiert wurde. Zur Aktivierung der Nuklease (50 bzw. 500 nM) wurde der DFF-Komplex entweder mit katalytischen Mengen Caspase-3 (rot) oder TEV-Protease (blau) inkubiert. Als Kontrolle wurde nur DFF-Komplex (500 nM) mit dem Plasmid-DNA Substrat inkubiert. ICAD^{TEV} ko-exprimierte Nuklease CAD zeigt eine schwächere Aktivität. P, Plasmid-DNA Substrat.

Abbildung 39 zeigt einen Aktivitätsassay mit CAD, die entweder mit ICAD^{WT} (DFF^{WT}) oder ICAD^{TEV} (DFF^{TEV}) ko-exprimiert wurde. DFF^{WT} lässt nach Inkubation mit Caspase-3 bereits bei einer Konzentration von 50 nM Spaltaktivität erkennen, bei einer Konzentration von 500 nM wird das Plasmid-DNA Substrat komplett verdaut. Eine Inkubation von DFF^{WT} mit TEV-Protease führte zu keiner Komplex Aktivierung. Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation des DFF^{TEV}-Komplexes mit Caspase-3 zu einer leichten Aktivierung der Nuklease, denn bei 500 nM ist ein sehr schwacher Plasmid-DNA Verdau zu beobachten. Wurde der DFF^{TEV}-Komplex mit TEV-Protease inkubiert, so konnte zwar bei einer Konzentration von 50 nM fast keine Aktivität vernommen werden. Bei einer Konzentration von 500 nM wurde hingegen der sc-Anteil der Plasmid DNA vollkommen verdaut. Die Aktivität von DFF^{TEV} ist folglich im Vergleich zur Aktivität von DFF^{WT} um ca. eine Größenordnung schwächer.

3.4.2 Mutation der Caspase-3 Spaltstellen in ICAD^{TEV}

Basierend auf den Beobachtungen der SPOT-Membran Ergebnisse, die eine Interaktion der Caspase-3 Spaltstellen von ICAD mit CAD erkennen ließen, und der Hypothese vorheriger Studien, die vermuten, dass die Caspase-3 Spaltstellen von ICAD eine Rolle bei dessen Chaperon-ähnlicher Aktivität spielen, wurden nun die Aminosäurereste der Caspase-3 Spaltstellen in ICAD^{TEV} (s. 3.4) sukzessive gegen einen Alaninrest ersetzt. Anschließend sollte überprüft werden, ob eine solche Mutation Auswirkungen auf die Faltungshelfer Aktivität von ICAD hat.

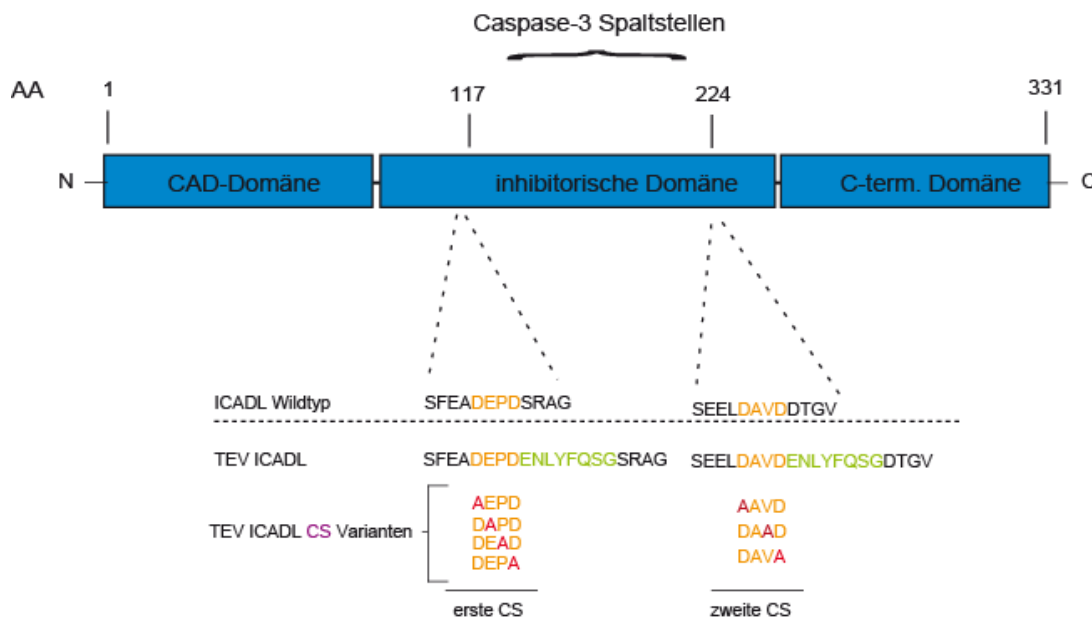


Abbildung 40: Schematische Darstellung der ICAD^{TEV}-Varianten

Die Abbildung skizziert anhand einer schematischen Darstellung der Domänen von ICAD die in diesem Versuchsteil generierten ICAD Mutanten der Caspase-3 Spaltstellen. Es wird gezeigt, dass die TEV-Protease Spaltstellen (ICAD^{TEV}) jeweils direkt am C-terminalen Ende der Caspase-3 Spaltstellen (¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴) inseriert wurden. Die TEV-Spaltstellen (grün) setzen sich aus folgender AS-Sequenz zusammen: ENLYFQS. Die Caspase-3 Spaltstellen sind orange dargestellt, die jeweilige Alanin-Punktmutation in rot. CS, Caspase-3 Spaltstelle

Die Abbildung illustriert die generierten ICAD^{TEV} Varianten mit Änderungen in den Caspase-3 Spaltstellen. In einem ersten Schritt wurden TEV-Protease Spaltstellen (grün) direkt am C-terminalen Ende der Caspase-3 Spaltstellen (orange) inseriert. In einem nächsten Schritt wurden dann die verschiedenen Aminosäurereste der Caspase-3 Spaltstellen (¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴) sukzessive durch einen Alaninrest ersetzt.

3.4.3 Fluoreszenzversuche mit ICAD^{TEV} Variante ²²¹DAVA²²⁴

Um zu überprüfen, ob einzelne Aminosäurereste der Caspase-3 Spaltstellen eine Wirkung auf die Faltungshelfer Aktivität von ICAD haben, wurde die Nuklease CAD mit den verschiedenen ICAD^{TEV} Mutanten der Caspase-3 Spaltstellen zunächst ko-exprimiert. Nach der Reinigung des Proteinkomplexes wurde dieser über Nacht mit TEV-Protease inkubiert und am nächsten Tag mit DNA inkubiert, um die Aktivität der Nuklease zu analysieren. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine, aufgrund der Mutation in der Caspase-3 Spaltstelle, nicht korrekt gefaltete Nuklease das DNA Substrat nicht oder mit einer geringeren Spaltaktivität als ICAD^{TEV} schneidet. Da die generelle Aktivität der mit ICAD^{TEV} ko-exprimierten Nuklease bereits relativ schwach war (siehe 3.4.1), wurde für die Analyse ein hochsensitiver FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-basierter assay gewählt, bei dem mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten DNA-Substraten (*molecular beacons*) die Aktivität der Nuklease ermittelt werden konnte. In diesen Versuchen konnte vor allem für die mit der ICAD^{TEV} Variante ²²¹DAVA²²⁴ ko-exprimierten Nuklease CAD ein Unterschied im Vergleich zu mit ICAD^{TEV} ko-exprimierter Nuklease CAD beobachtet werden.

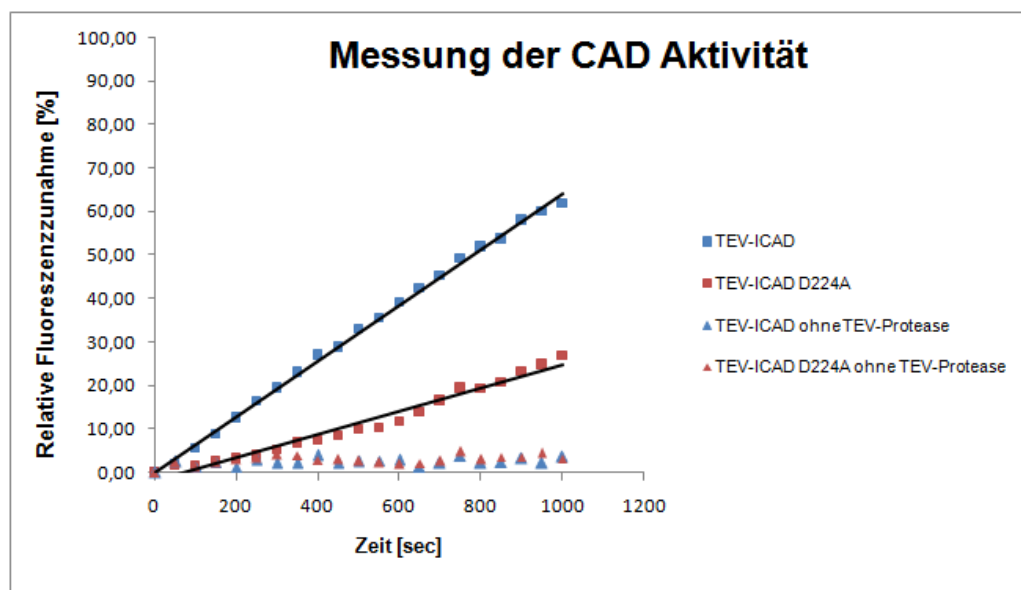


Abbildung 41: Graphische Darstellung der Messung der CAD Aktivität

Gezeigt sind die Versuche von mit ICAD^{TEV} ²²¹DAVA²²⁴ (rot) ko-exprimierter Nuklease CAD im Vergleich zu mit ICAD^{TEV} (blau) ko-exprimierter Nuklease CAD. Für die Darstellung wurde, basierend auf den Experimenten mit fluoreszenzmarkierter DNA, die relative Fluoreszenzzunahme (bei 517 nm = Donorfluoreszenz) pro Zeiteinheit berechnet. Diese nimmt zu, sobald das Substrat von der Nuklease gespalten wird und ist somit ein direktes Maß für die Nukleaseaktivität. Mit ICAD^{TEV} ²²¹DAVA²²⁴ ko-exprimierte Nuklease CAD spaltet das fluoreszenzmarkierte DNA-Substrat schlechter als CAD Nuklease, die mit ICAD^{TEV} ko-exprimiert wurde. Gezeigt sind auch die Ergebnisse für ICAD^{TEV} und ICAD^{TEV} ²²¹DAVA²²⁴ ohne vorherige Inkubation mit TEV-Protease. In diesen Versuchen wurde keine Fluoreszenzzunahme und somit keine Aktivität detektiert.

Wie es die Abbildung aufzeigt, nimmt die bei 517 nm gemessene Donorfluoreszenz nach der Inkubation des DNA Substrats (1000 sec) mit ICAD^{TEV} ko-exprimierter Nuklease CAD um ca. 60 % zu. Eine Inkubation des DNA Substrats mit ICAD^{TEV 221} DAVA²²⁴ ko-exprimierter Nuklease CAD führte jedoch nur zu einer Zunahme von ca. 25 % in dem gemessenen Zeitraum. Wurden die Varianten nicht mit TEV-Protease inkubiert, so konnte kein Anstieg der Donorfluoreszenz detektiert werden. Da die Donorfluoreszenz steigt, sobald das DNA-Substrat gespalten wird (und sich der Quencher somit in räumlicher Distanz zum Fluorophor befindet) ist die Zunahme der Donorfluoreszenz ein direktes Maß für die Aktivität der Nuklease. Anhand der Ergebnisse wurden nun, basierend auf der relativen Donorfluoreszenz-Zunahme, Werte für die relative Aktivität der Varianten ermittelt. Dabei wurde der Wert für ICAD^{TEV} ko-exprimierte Nuklease CAD auf 100 % gesetzt.

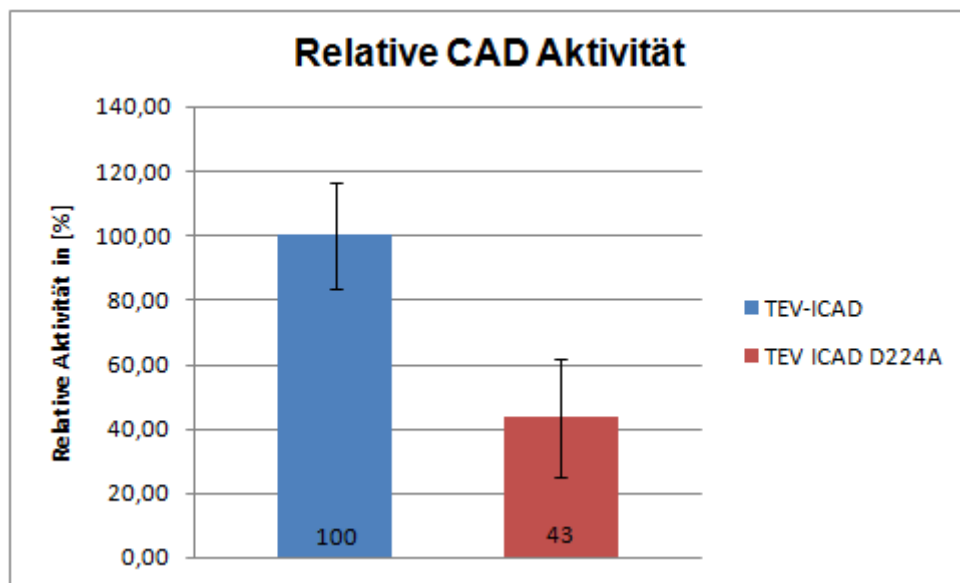


Abbildung 42: CAD Aktivität nach Ko-Expression mit verschiedenen ICAD^{TEV} Varianten

Die Abbildung zeigt die relative Aktivität der mit entweder ICAD^{TEV} oder ICAD^{TEV 221} DAVA²²⁴ ko-exprimierten Nuklease CAD. Eine Ko-Expression von CAD mit der ICAD^{TEV 221} DAVA²²⁴ Variante (rot) statt ICAD^{TEV} (blau), reduziert die Aktivität der Nuklease auf ca. 43 %.

Die Grafik zeigt, dass die relative Aktivität der Nuklease CAD auf ca. 43 % absinkt, sobald diese mit ICAD^{TEV 221} DAVA²²⁴ ko-exprimiert wurde und nicht mit ICAD^{TEV}.

3.5 ICAD Kristallisationsstudien

Eine Grundvoraussetzung zur Herstellung von Proteinkristallen sind ausreichende Mengen (ca. 5-30 mg/ml) an hochreinem Protein. Um dies auch für ICAD-S zu gewährleisten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein geeignetes Expressionssystem zur Überexpression von ICAD-S sowie eine geeignete Methode für dessen Reinigung etabliert (für den DFF-Komplex bestand bereits ein solches System).

3.5.1 Etablierung einer geeigneten Expressions- und Reinigungsmethode für ICAD-S

Im Rahmen der Kristallisationsstudien wurde zunächst ein neues ICAD-S Überexpressionssystem generiert und eigens ein geeignetes Reinigungsprotokoll etabliert. Hierfür wurde die ICAD-S cDNA aus dem Vektor pLK-HisFlag-ICAD-S in Kombination mit den Primern 5'ICAD(NcoI) und 3'ICAD-S(NotI) amplifiziert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI in den Vektor pETM-30 eingefügt. ICAD-S wird in diesem Vektor (pETM-30-ICAD-S) als Fusionsprotein mit einem His₆-GST-tag exprimiert (Größe: ca. 60 kDa). Da sich am C-terminalen Ende dieses tags eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease befindet, kann dieser durch eine Inkubation mit TEV-Protease von ICAD-S abgespalten werden. Das His₆-GST-ICAD-S Fusionsprotein wurde zunächst über eine Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie im *batch* Verfahren gereinigt. Anschließend erfolgte die Abspaltung des His₆-GST-tag, durch eine Inkubation mit TEV-Protease über Nacht. Nach dem Abspalten des His₆-GST-tag von ICAD-S wurde der tag und die TEV-Protease (verfügte ebenfalls über einen His₆-tag) entfernt, indem die Lösung auf eine Protino[®] Ni-TED (tris-carboxymethyl ethylene diamine) Säule gegeben wurde. Da der jeweilige His₆-tag an die Matrix dieser Säule bindet, befand sich im Durchfluss ausschließlich reines ICAD-S. Um in einem letzten Schritt etwaige ICAD-S Aggregate zu entfernen, wurde das reine ICAD-S mittels einer Gelfiltration weiter gereinigt.

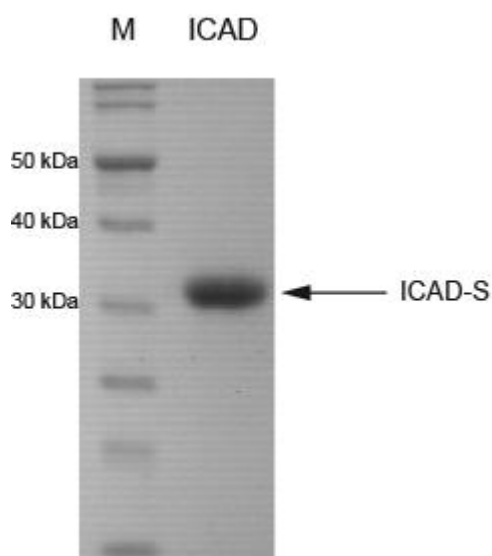


Abbildung 43: Reinigung von ICAD-S

Die Abbildung zeigt hochreines ICAD-S (Größe: ca. 35 kDa). Dieses wurde zunächst als Fusionsprotein mit einem His₆-GST-tag exprimiert. Im Zuge des eigens etablierten Reinigungsprotokolls wurde das Fusionsprotein zunächst über eine Glutathion-Sepharose Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Anschließend wurde der His₆-GST-tag durch eine Inkubation mit TEV-Protease abgespalten. Zwecks Entfernung der TEV-Protease (verfügt ebenfalls über einen His₆-tag) und des abgespaltenen His₆-GST-tags wurde das Gemisch auf eine Protino[®] Ni-TED-Säule aufgetragen. Im Durchfluss befand sich nun das hochreine ICAD-S. Um mögliche Aggregate zu entfernen wurde das hochreine ICAD-S in einem letzten Schritt mittels einer Gelfiltration weiter gereinigt.

In den bisherigen Kristallisationsstudien konnten in Kooperation mit dem *Netherlands Cancer Institute* (Amsterdam) Kristalle für ICAD-S im Kristallisationsreagenz Nr. 78 der JCSG Suite (0.24 M Natrium Malonat pH 7.0, 20 % (w/v) PEG 3350) erfolgreich gezüchtet werden (siehe Abbildung 44).

3.5.2 Kristallisation



Abbildung 44: Darstellung der Kristalle

Gezeigt sind die bisher gezüchteten Kristalle für ICAD-S. Die Kristalle wurden in 0.24 M Natrium Malonat pH 7.0 und 20 % (w/v) PEG 3350 inkubiert. Die Struktur der Kristalle scheint einem Rhomboeder ähnlich.

Laut Kooperationspartner handelte es sich um Proteinkristalle. Jedoch ergaben Untersuchungen im Synchrotron (Teilchenbeschleuniger), in denen zwei Kristalle Röntgenstrahlen exponiert wurden, bisher keine Diffraktion. In nun folgenden Untersuchungen wird, auf Basis der bisherigen Versuche, mit neuen Kristallisationsreagenzien nochmals versucht, Kristalle zu züchten.

3.6 Erstellen einer hochspezifischen CAD-Nuklease durch Fusion mit I-SceI

Ein untergeordnetes Teilprojekt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die unspezifische DNase CAD an die hochspezifische, monomere *homing*-Endonuklease I-SceI zu fusionieren, um so eine hochspezifische CAD-Nuklease zu generieren.

3.6.1 Etablierung einer geeigneten Expressions- und Reinigungsmethode

Zum Erstellen und Überexprimieren des Fusionsproteins wurden verschiedene Vektorsysteme in Kombination mit verschiedenen Klonierungsansätze (C- und N-terminale Fusion von I-SceI an CAD) ausprobiert. Letztlich erwies sich einzig das Expressionssystem pASK-CAD-I-SceI als geeignetes System zur Überexpression des rekombinanten Fusionsproteins. Dieses wurde erstellt, indem die codierende DNA-Sequenz für CAD aus pGex-2T-mCAD und die die codierende DNA-Sequenz für I-SceI aus dem Vektor pET-Duet_D44S durch mehrere Klonierungsschritte aus den Ursprungsvektoren in pASK (IBA BioTAGnology) eingefügt wurden. In diesem Konstrukt verfügt das Fusionsprotein über einen C-terminalen Strep-tag. Um eine potentiell aktive Nuklease CAD zu erlangen, wurde das Fusionsprotein weiter mit ICAD-L/DFF45, dem Chaperon von CAD, ko-exprimiert. In dem eigens etablierten Reinigungsprotokoll wurde der Komplex aus Fusionsprotein und His-DFF45 so mittels einer zweifachen Affinitätschromatographie (Strep-Tactin Sepharose und Ni^{2+} - NTA Affinitätschromatographie) gereinigt. Die einzelnen Schritte der Reinigung mittels Strep-Tactin Sepharose und Ni^{2+} - NTA Affinitätschromatographie sind im Kapitel „Material und Methoden“ näher beschrieben.

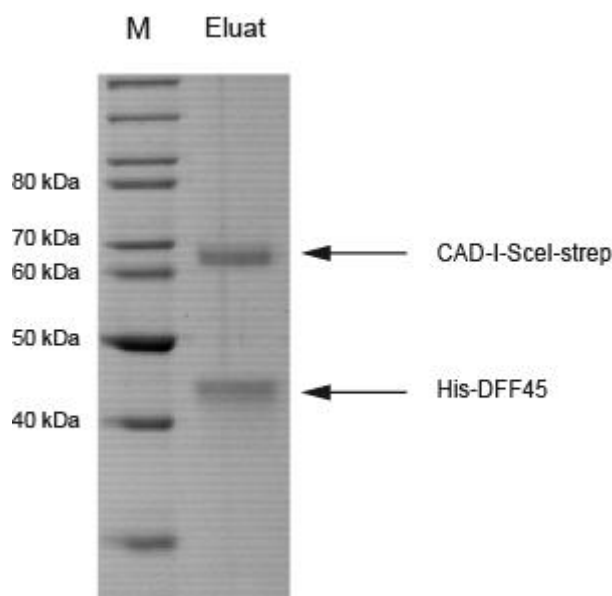


Abbildung 45: Reinigung von CAD-I-SceI

Um eine potentiell aktive Nuklease CAD zu generieren, wurde das Fusionsprotein mit His-DFF45, dem Chaperon von CAD, ko-exprimiert. Der Komplex aus His-DFF45 und Fusionsprotein wurde anschließend über eine Strep-Tactin Sepharose und eine Ni^{2+} - NTA Affinitätschromatographie gereinigt. His-DFF45 läuft im Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kDa, das Fusionsprotein aus CAD und I-SceI mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa (siehe Pfeile). Das Gel zeigt, dass der Protein-Komplex nach der Reinigung sehr sauber vorliegt.

Zur Fusion mit I-SceI wurde primär die CAD Variante R250A verwendet. Diese Variante bindet DNA mit einer geringeren Affinität als CAD Wildtyp¹²⁷. Da I-SceI zusätzlich nur als DNA-Bindemodul fungieren sollte, wurde eine inaktive Variante dieses Proteins (D44S) verwendet. Nachdem das CAD (R250A)-I-SceI Fusionskonstrukt erfolgreich kloniert, stabil exprimiert und gereinigt werden konnte, wurde das rekombinante Protein auf die Fähigkeit hin analysiert, DNA spezifisch (und nicht unspezifisch, wie es für CAD normalerweise üblich ist) zu binden. Dazu wurden in ersten Versuchen EMSA-(*electrophoretic mobility shift assay*) Experimente mit radioaktiv markierter DNA durchgeführt.

3.6.2 EMSA Versuche

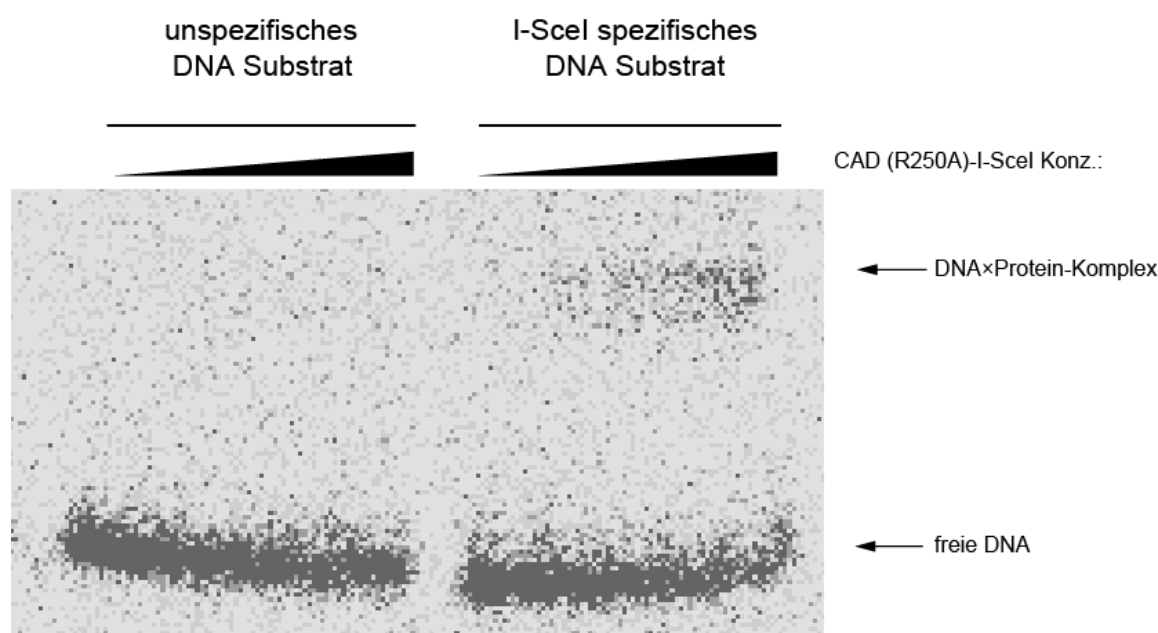


Abbildung 46: EMSA Versuch mit CAD (R250A)- I-SceI

Gezeigt ist exemplarisch ein EMSA Versuch von CAD (R250A)-I-SceI (0, 150, 300, 400, 500, 700 nM) in Anwesenheit eines DNA Substrats ohne I-SceI Erkennungssequenzen (unspezifisches DNA Substrat) und in Anwesenheit eines DNA Substrats mit I-SceI Erkennungssequenzen (spezifisches DNA Substrat). Die Inkubation von CAD (R250A)-I-SceI mit spezifischem DNA Substrat führte zu einer Retardation der DNA. Für die EMSA Versuche wurden jeweils 2.5 nM radioaktiv markierte DNA verwendet. Die Analyse erfolgte Polyacrylamid-gelelektrophoretisch (6 %) mit Hilfe des *Instant-Imagers*.

Wie die Abbildung untermauert, führte die Inkubation des Fusionsproteins (Konzentrationsbereich von 0-700 nM) mit unspezifischer DNA (2.5 nM) zu keiner Retardation der DNA. Betrachtet man nun die Ergebnisse der Versuche, in denen das Fusionsprotein mit I-SceI spezifischer DNA inkubiert wurde, so kann man ab einer Proteinkonzentration von ca. 150 nM eine leichte Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der DNA beobachten, die auf eine Protein x DNA-Komplexbildung hinweist. Mit zunehmender Proteinmenge wird immer mehr DNA retardiert. Die Ergebnisse der EMSA Versuche wurden im Folgenden ausgewertet und graphisch dargestellt.

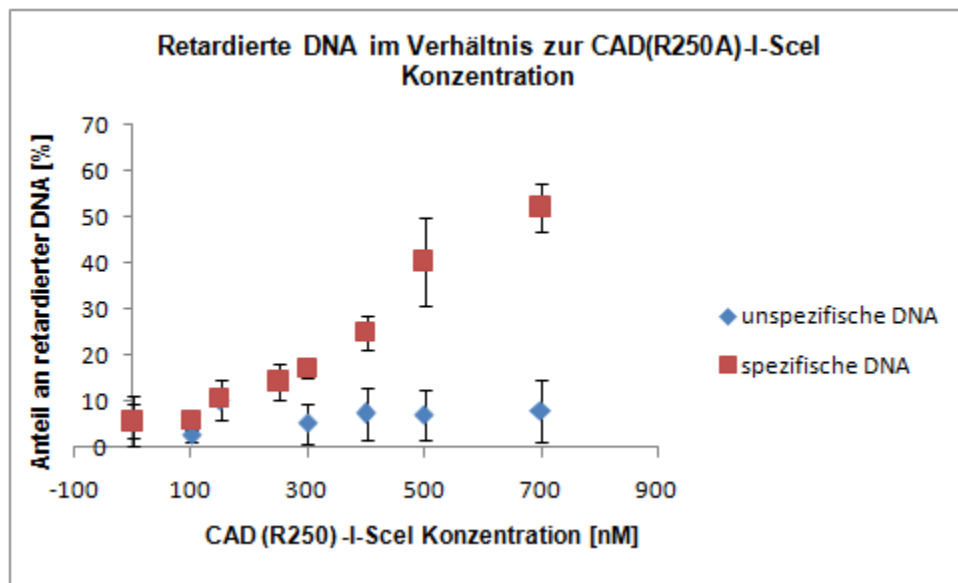


Abbildung 47: Graphische Darstellung der EMSA Versuche

Gezeigt ist die graphische Auswertung der EMSA Versuche. Es wurde der Anteil an retardierter DNA in Abhängigkeit zur CAD (R250A)-I-SceI Konzentration dargestellt. Hierfür wurden die EMSA Versuche mit Hilfe der *instant imager* Software ausgewertet und Mittelwerte sowie Fehlerwerte berechnet. Inkubation des Fusionsproteins mit I-SceI-spezifischer DNA (rot) führte ab einer Proteinkonzentration von ca. 150 nM zu einer Retardierung der DNA, I-SceI unspezifische DNA wird hingegen nicht retardiert.

Wie die Abbildung dokumentiert, führte die Inkubation von CAD (R250A)-I-SceI (mindestens 150 nM) mit I-SceI-spezifischer DNA zu einer Protein×DNA-Komplexbildung. Die Inkubation von CAD (R250A)-I-SceI mit I-SceI-unspezifischer DNA führte hingegen, in dem für die Versuche verwendeten Konzentrationsbereich, zu keiner Komplexbildung der DNA mit Protein.

3.6.3 Spaltassays

In den bisherigen Spaltversuchen konnte keine, dem DNA-Substrat entsprechende, spezifische Spaltung des CAD (R250A)-I-SceI Fusionsproteins detektiert werden. Die verwendeten DNA Substrate verfügten hierbei über zwei I-SceI Erkennungssequenzen, die von 17 bzw. 23 Basenpaaren abgegrenzt waren.

4. Diskussion

Der DNA Fragmentierungsfaktor DFF ist ein apoptotischer Protein-Komplex, der aus den beiden Untereinheiten CAD und ICAD besteht. Obwohl DFF bereits 1997 aus HeLa-Zellen isoliert und beschrieben werden konnte, ist immer noch wenig über die Interaktionen von CAD und ICAD bekannt. Lediglich für den Komplex der beiden N-terminalen Domänen von CAD und ICAD sind, aufgrund einer verfügbaren NMR-Struktur, genaue Wechselwirkungen identifiziert. Über genaue Interaktionen zwischen ICAD und CAD, die z.B. für die Faltungshelferaktivität von ICAD verantwortlich sind oder aber dessen inhibitorische Wirkung vermitteln, ist jedoch nur sehr wenig beschrieben.

4.1 SPOT-Membran Versuche

4.1.1 CAD - ICAD Interaktionsstudien

Um mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den beiden Untereinheiten des DFF-Komplexes CAD und ICAD zu identifizieren, wurden Versuche mit der so genannten SPOT Methode, einer Technik um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu detektieren, durchgeführt. Die beiden synthetisierten Membranen bestanden dabei aus überlappenden 20-mer Peptiden, die der AS-Sequenz der Nuklease CAD bzw. AS-Sequenz des Inhibitors ICAD entsprachen. Die Membranen wurden nach der Synthese mit dem jeweiligen Interaktionspartner inkubiert und anschließend analysiert. Dabei zeigten beide Membranen schwächere und stärkere Interaktionssignale, die als mögliche Regionen interpretiert wurden, die im DFF-Komplex miteinander interagieren. Dabei fiel direkt auf, dass die Interaktionen, übereinstimmend auf beiden Membranen, über alle drei Domänen der Proteine verteilt waren. Diese Ergebnisse demonstrieren zum ersten Mal experimentell, dass die beiden Proteine über ein relativ großes Interface miteinander interagieren und erklären somit die hohe Affinität von CAD und ICAD¹³⁹.

Neben den zahlreichen neuen Erkenntnissen, die durch die SPOT Versuche gewonnen werden konnten (in den folgenden Kapiteln diskutiert), stimmen die Ergebnisse der SPOT Versuche sehr gut mit bereits veröffentlichten Studien überein. So zeigen die NMR-Daten zur N-terminalen Struktur des DFF-Komplexes, dass Lys12, Lys21 und Lys35 von CAD mit den Aminosäureresten Asp66 und Asp71-74 von ICAD interagieren¹²². Hinzukommend gibt es Kontakte zwischen Phe22 von CAD mit Thr68 und Ile69 von ICAD, die eine weitere wichtige N-terminale Interaktion darstellen¹²². Die Daten der SPOT Versuche zeigen ebenfalls, dass die Aminosäurereste von ICAD, die an der Ausbildung des N-terminalen Interface mitwirken, in der Tat alle in einer zusammenhängenden Region (Aminosäurereste 55-75) zu finden sind. Im Gegensatz dazu zeigen die SPOT Versuche auch, dass die Aminosäurereste, die auf Seiten von CAD an der N-terminalen Interface Ausbildung beteiligt sind, eher gleichmäßig über die N-terminale Sequenz verteilt sind.

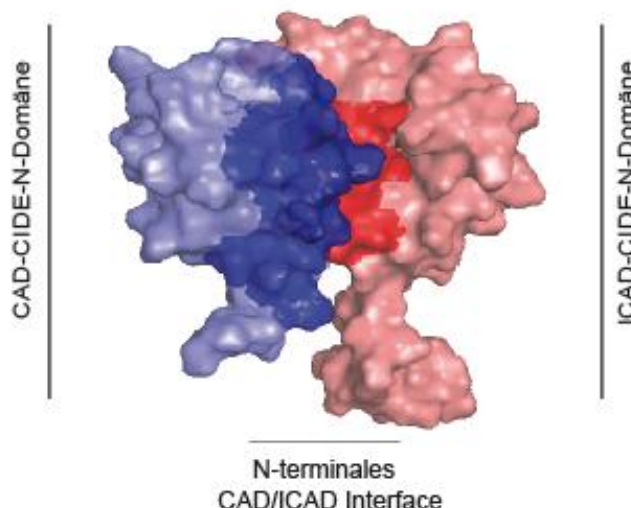


Abbildung 48: SPOT Interaktionen des N-terminalen CAD-ICAD Interface

Gezeigt ist das N-terminale CAD-ICAD Interface. Die N-terminale CAD-Domäne ist dabei hellblau, die N-terminale ICAD-Domäne hellrot darstellt. Die durch die SPOT Ergebnisse ermittelten CAD Regionen, die eine Interaktion mit ICAD erkennen ließen, sind dunkelblau skizziert. ICAD Regionen die in den SPOT Versuchen eine Interaktion mit CAD zeigten, sind dunkelrot skizziert. Die durch die SPOT Versuche identifizierten Interaktionsregionen stimmen gut mit den Daten der NMR-Struktur der N-terminalen Domäne überein. Abbildung nach¹²²

4.1.1.1 CAD SPOT-Membran

Die stärksten Interaktionen der CAD SPOT-Membran mit ICAD waren interessanterweise in einem Bereich zu detektieren, der Teil der C2-Domäne von CAD ist. Diese Domäne vermittelt die Oligomerisierung von CAD nach der Caspase-3/7 induzierten Spaltung von ICAD und ist für die Ausbildung der katalytisch aktiven Form von CAD essentiell¹²⁶. Eine Interaktion von ICAD mit der C2-Domäne könnte folglich bedeuten, dass im DFF-Komplex die Ausbildung der aktiven Form von CAD unterdrückt wird, indem ICAD mit der C2-Domäne von CAD interagiert und diese so vor weiteren Kontakten abschirmt. Es wurde zwar bereits vermutet, dass ICAD die Oligomerisierung von CAD unterdrückt, jedoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals experimentell gezeigt werden, dass ICAD dabei direkt mit der C2-Domäne von CAD interagiert¹²⁶. In den SPOT Versuchen zeigte vor allem Peptid E18 das stärkste Interaktionssignal. Da dieses Peptid Bereiche in der nativen DNase repräsentiert, die die α_2 -Helix und Teile der α_3 -Helix formen, kontaktiert ICAD sehr wahrscheinlich genau diese Bereiche der C2-Domäne. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in dieser Region von Interaktionssignalen (*spots* E16-E20) kein konstanter Anstieg bzw. Abfall des Interaktionssignals zu detektieren war. Ein solcher Anstieg bzw. Abfall des Interaktionssignals würde normalerweise auf einen singulären Interaktions-„*hot-spot*“ schließen lassen. Vielmehr zeigten die Peptide E16, E18 und E20 jedoch ein relativ starkes Signal, die benachbarten *spots* E17 und E19 hingegen ließen kein bzw. kaum Signale erkennen. Dies erklärt sich dadurch, dass die C2-Domäne nicht aus einem zusammenhängenden Sekundärstrukturelement, sondern vielmehr aus drei α -Helices besteht, die durch unstrukturierte *linker*-Regionen verbunden sind¹²⁶. Bei der genauen Analyse der Sequenzen von Peptid E16, E18 und E20 fällt zudem auf, dass diese relativ große Abschnitte von Peptiden beinhalten, die Bestandteile genau dieser α -Helices sind. Die Analyse der Sequenz von Peptid E17 hingegen lässt

erkennen, dass dieses Peptid prozentual aus einem großen Anteil an Aminosäuren besteht, die im nativen Protein unstrukturierten *linker*-Regionen zuzuordnen sind. Daher ist anzunehmen, dass dieses Peptid, im Gegensatz zu den anderen, keine markante, für ICAD erkennbare Sekundärstruktur ausbilden kann. Außerdem zeigen diese Beobachtungen wie sensibel die SPOT Methode sein kann und, dass die Interaktionen offensichtlich hochspezifisch sind.

Neben den Kontakten von ICAD mit der C2-Domäne von CAD enthüllen die SPOT Daten starke Interaktionen zwischen ICAD und der zur Substrat Bindestelle gegenüberliegenden Oberfläche von CAD (siehe Abbildung 49). Dies bestätigt, dass CAD auch im Komplex mit ICAD DNA binden kann¹¹⁶. Bemerkenswert ist zudem, dass *spot* G1 ein Interaktionssignal erkennen lässt. Die Sequenz der *spot* G1 Peptide spiegelt Teile des aktiven Zentrums von CAD wider. Es ist daher möglich, dass ICAD das aktive Zentrum von CAD direkt blockiert und so die Aktivität von CAD kontrolliert. Eine weitere sehr interessante Erkenntnis ist, dass Peptid F19 stark mit ICAD interagiert. Dieses Peptid beinhaltet die Aminosäurereste Cys238 und His242, die an der Zn²⁺-Bindung beteiligt sind. Dieses Ion befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums und ist für die Struktur und Aktivität von CAD sehr wichtig. Ein Verlust führt zu einem partiellen Zusammenbruch von CAD und damit verbunden zum Verlust der nukleolytischen Aktivität¹²⁶. Zieht man nun in Betracht, dass auch jedes CAD Monomer ein aktives Zentrum besitzt und, dass der heterodimere Komplex aus CAD und ICAD DNA binden kann, so ist erforderlich, dass ICAD auch eine monomere DNase CAD inhibiert¹¹⁶. Wäre dies nicht der Fall, könnte CAD zwar keine DNA Doppelstrangbrüche mehr katalysieren, die Nuklease wäre aber dennoch in der Lage Einzelstrangbrüche in die DNA einzufügen (*nicking-enzyme*). Basierend auf den SPOT Ergebnissen bietet sich daher das Modell eines zweistufigen Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD an. Zum einen sorgt ICAD für die Unterdrückung der CAD Oligomerisierung durch die Interaktion mit der C2-Domäne von CAD, und zum anderen garantiert ICAD, entweder indirekt, durch eine lokale strukturelle Störung oder direkt, durch eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum von CAD, für die vollständige Inhibition dieser Nuklease.

Das Interaktionsmodell, das basierend auf den SPOT Daten erstellt wurde, lässt erkennen, dass ICAD, neben der N-terminalen Interaktion mit CAD, enge Kontakte mit der C2-Domäne von CAD eingeht. Im Bereich der C3-Domäne wurden Interaktionssignale detektiert, die, bezogen auf die primäre Aminosäuresequenz, scheinbar weit auseinanderliegen. Anhand des Interaktionsmodells wird aber erkenntlich, dass diese Bereiche im nativen Protein durchaus sehr benachbart positioniert sind (s. Abbildung 49). So offenbart sich eine sehr detaillierte Blaupause der ICAD Interaktionen mit der C3-Domäne. Man erkennt deutlich, dass ICAD den Bereich gegenüberliegend der DNA Binderegion kontaktiert, und ebenso Interaktionen mit der C-terminalen Region, wahrscheinlich zwecks kooperativer Importin- α Bindung, etabliert¹¹⁹.

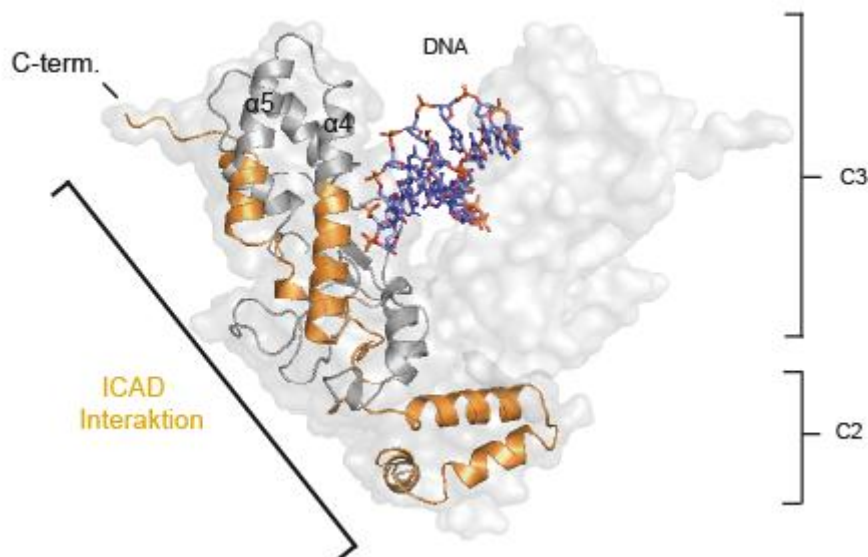


Abbildung 49: ICAD Interaktionen mit der C2- und C3-Domäne von aktivierter CAD

Die SPOT basierten, prominenten CAD-ICAD Interaktionen (orange) wurden auf die 3D-Struktur der C2- und C3-Domäne von CAD (grau) übertragen¹²⁶. Im Sinne einer besseren Übersicht wurden die Kontakte in nur einem Monomer farblich unterlegt. Da noch keine Ko-Kristallstruktur von CAD mit DNA existiert, wurde die DNA, abgeleitet von der *Vvn*-DNA Ko-Kristallstruktur, in die Struktur modelliert⁹⁶. Das Interaktionsmodell zeigt, dass ICAD sehr stark mit der C2-Domäne zu interagieren scheint. Die C3-Domäne wird hingegen nur in der Peripherie und nicht direkt im Inneren der Scherenstruktur kontaktiert. Dies erklärt, warum CAD auch im Komplex mit ICAD DNA binden kann. Abbildung nach¹²⁶

4.1.1.2 ICAD SPOT-Membran

Neben der N-terminalen Interaktion des DFF-Komplexes, die auch auf Seiten der ICAD-abgeleiteten Peptide durch die SPOT-Methode detektiert werden konnte, gab es ebenso Interaktionssignale im Bereich der Caspase-3/7 Spaltstellen. Diese bestätigen bisherige Spekulationen über eine Interaktion der Region der Caspase Spaltstellen mit CAD¹⁴⁴. Gleiches gilt für Spekulationen bezüglich der Nachahmung eines zweiteiligen Kernlokalisierungssignals durch die Interaktion der beiden NLS-Sequenzen von CAD und ICAD¹¹⁹. Darüber hinaus konnten zwei Peptidregionen identifiziert werden (B1/B2 und B10) die äußerst starke Signale in den SPOT Versuchen aufwiesen und zur so genannten inhibitorischen (D2) Domäne von CAD gehören. Wie vorherige Studien zeigen, wird diese Domäne für die Unterdrückung der CAD Homodimerisierung benötigt und steht somit im Verdacht an der CAD Inhibition beteiligt zu sein¹²⁶. Die Vermutung liegt daher nahe, dass diese Peptide im nativen ICAD Protein eine Funktion in der CAD Inhibition übernehmen. Interessanterweise zeigt die SPOT-Membran in der Region von Peptid B10 einen langsamen Anstieg bzw. Abfall des Interaktionssignals (B7<B8<B9<B10>B11>B12). Im Gegensatz dazu kann im Bereich der Peptide B1 und B2 kein Anstieg bzw. Abfall des Interaktionssignals festgestellt werden. Hier zeigen die *spots* B1 und B2 ein sehr starkes, die benachbarten *spots* A21 und B3 hingegen gar kein Interaktionssignal. Für letztere Region kann dies bedeuten, dass hier eher kleinere Teilbereiche an der Interaktion mit CAD beteiligt sind, in denen jedoch mehrere starke Kontakte zwischen den beiden Proteinen ausgebildet werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Sekundärstrukturvorhersagen für diese Region, die zwei α -Helices (davon eine relativ kurze) prognostizieren. Die Tatsache, dass die benachbarten *spots* (A21 und

B3), trotz ähnlicher Aminosäuresequenz kein Interaktionssignal zeigen, demonstriert wiederum, dass z.B. die Nettoladung eines Peptids alleine für die Interaktion im SPOT assay nicht verantwortlich sein kann. So hat z.B. Peptid B3 (Nettoladung: -5) eine ähnliche Nettoladung wie Peptide B1 und B2 (Nettoladung B1: -3, Nettoladung B2: -6). Vielmehr spricht dies dafür, dass die Peptide der *spots* B1 und B2 auf der Membran die für eine Interaktion mit CAD wichtige native Struktur ausbilden können. Der langsame Anstieg bzw. Abfall der Intensität der Interaktionssignale im Bereich der Peptide B7-B12 lässt zwei Aspekte vermuten. Zum einen scheint es in diesem Bereich einen singulären Interaktions „*hot-spot*“ zu geben (Peptid B10) und zum anderen deutet es darauf hin, dass dieser „*hot-spot*“ in einem größeren Sekundärstrukturmotiv lokalisiert ist. Diese Hypothese wird von den Sekundärstrukturvorhersagen bestätigt, die für den Bereich um Peptid B10 eine längere α -Helix prognostizieren (s. Abbildung 30). Folglich ist anzunehmen, dass die benachbarten Peptide von B10, im Gegensatz zu den benachbarten Peptiden von B1 und B2, ebenso eine α -helikale Struktur annehmen, da auch sie größtenteils aus Aminosäureresten bestehen, die im nativen Protein zu strukturierten Regionen (und nicht zu *linker*-Regionen) gehören. Das schwächere Signal dieser Peptide käme demnach nicht aufgrund eines Zusammenbruchs der Sekundärstruktur zustande, sondern wäre damit zu erklären, dass diese Peptide, aufgrund des überlappenden Charakters der SPOT-Membran, nur Fragmente des Interaktions „*hot-spot*“ beinhalten.

4.1.2 ICAD - ICAD Interaktionsstudien

Die Interaktionsstudien mit ICAD zeigten im Gegensatz zu den Interaktionsstudien mit CAD und ICAD nur wenige Interaktionssignale. Dies lässt, im Vergleich zum Komplex aus CAD und ICAD, eine schwächere Affinität zweier ICAD Moleküle zueinander vermuten und erklärt warum ICAD ein Komplexieren mit CAD bevorzugt. ICAD scheint ein weiteres ICAD-Molekül hauptsächlich über die D1- und D3-Domäne zu kontaktieren. Interessanterweise konnten in den Versuchen keine Interaktionen im Bereich der D2-Domäne festgestellt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit weiteren Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass die D2-Domäne des Inhibitors wichtige Kontakte mit der Nuklease eingeht und sehr wahrscheinlich die Inhibition von CAD vermittelt. Die Tatsache, dass die Interaktionssignale der ICAD-ICAD Interaktionsstudien und der ICAD-CAD Interaktionsstudien nicht überlappen, könnte außerdem bedeuten, dass ICAD parallel Kontakte zu CAD und ICAD ausbilden kann. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein heterotetramerer DFF-Komplex möglich wäre, indem, eventuell aus Gründen der Stabilität, die ICAD-Moleküle nicht nur mit CAD sondern auch mit sich selbst interagieren.

4.1.3 Topoisomerase II alpha - CAD Interaktionsstudien

Die bisher durchgeführten Interaktionsstudien zwischen CAD und der Topoisomerase II α deuten darauf hin, dass CAD primär den C-Terminus der Topoisomerase II α kontaktiert. Dies stimmt mit bisherigen Studien überein, die zeigen, dass der N-terminale Bereich der Topoisomerase II α eine ATPase Funktion inne hat und der mittlere Bereich wichtig für die DNA Bindung und Prozessierung ist (Tyr782)¹⁸¹⁻¹⁸⁷. Das C-terminale Ende hingegen ist wichtig für den Transport des Proteins in den Zellkern und steht außerdem im Blick bei der Interaktion mit anderen Proteinen eine Rolle zu spielen¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Wahrscheinlich entspannt die Topoisomerase II α die DNA in der Umgebung von CAD und erleichtert der DNase so die Spaltung¹⁹¹.

4.2 CAD Inhibition durch ICAD-abgeleitete Peptide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Entschlüsselung des Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD von besonderem Interesse. Daher wurde im Anschluss an die ICAD SPOT-Membran-Versuche überprüft, ob Peptide, die ein starkes Interaktionssignal erkennen ließen (A10, A18, B1/B2 und B10) eine inhibitorische Wirkung auf CAD in Lösung entfalten können. Die Peptide A10 (wichtig für die Ausbildung des N-terminalen CAD-ICAD Interface) und A18 (beinhaltet die N-terminale Caspase-3/7 Spaltstelle), deren Funktion bekanntermaßen keine direkte Rolle bei der CAD Inhibition spielen sollte, wurden in diesen Versuchen als interne Kontrollen verwendet. In der Tat konnte man für diese Peptide in den Versuchen nur kleinere Effekte auf die Aktivität von CAD beobachten. Diese minimalen Effekte kommen eventuell aufgrund der negativen Gesamtladung der Peptide (Nettoladung A10: -6, Nettoladung A18: -4) zustande. Anionische Polymere können die Aktivität von CAD unspezifisch unterdrücken¹²⁹. Ähnlich dazu zeigte Peptid B10 (Nettoladung B10: -1) auch keine größeren Effekte bezüglich der Inhibition von CAD in diesen Versuchen. Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation der Nuklease mit den Peptiden B1 und B2 (ICAD Aminosäurereste 127-152), unter den jeweiligen Versuchsbedingungen, zu einer fast kompletten Inhibition der Nuklease. Es ist daher anzunehmen, dass diese Bereiche auch im nativen ICAD Protein eine inhibitorische Funktion gegenüber CAD ausüben. Genauere Bestimmungen ergaben einen IC_{50} -Wert von ca. 64 μM für Peptid B1 und einen IC_{50} -Wert von ca. 2,6 μM für Peptid B2. Der niedrigere IC_{50} -Wert für Peptid B2, im Vergleich zu Peptid B1, lässt vermuten, dass dieses Peptid mehrere Aminosäurereste beinhaltet, die für die CAD Inhibition wichtig sind. Aufgrund der teilweise überlappenden Sequenz dieser beiden Proteine kann man sogar sagen, dass speziell die in diesem Bereich weiter C-terminal gelegenen Aminosäurereste bei der Inhibition eine Rolle spielen. Die IC_{50} -Werte der Peptide waren erwartet hoch und sind in Übereinstimmung mit bisherigen Studien, die zeigen, dass die aus dem Caspase-Verdau resultierenden drei ICAD Fragmente eine relativ niedrige Affinität zur Nuklease erkennen lassen¹³⁹. Die Versuche mit den „scrambled“ Versionen dieser Peptide deuten darauf hin, dass nicht die Nettoladung der Peptide (Nettoladung B1: -3, Nettoladung B2: -6) die inhibitorische Wirkung erklärt, sondern, dass die Peptide B1 und B2 CAD spezifisch inhibieren. Dies wird auch von den Versuchen mit der Nuklease NucA untermauert. In diesen Versuchen konnten nach der Inkubation mit Peptid B2 lediglich schwache, unspezifische Effekte auf die Aktivität von NucA beobachtet werden. Die Inkubation von NucA mit Peptid B1 zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität von NucA. Die Region von Peptiden B1 und B2 ist folglich nicht generell zur Inhibition von $\beta\beta\alpha$ -Me (Metall)-Finger Nukleasen befähigt, sondern scheint die DNase CAD spezifisch zu inhibieren.

Die Sekundärstrukturvorhersagen prognostizieren für den Bereich der Peptide B1 und B2 α -helikale Strukturen (s. Abbildung 31). Die α -helikale Struktur von Peptid B1 konnte zudem durch CD-spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Interessanterweise ergeben die Vorhersagen für Peptid B2, der stärkere Inhibitor der beiden Peptide (IC_{50} -Wert: 2,6 μM), eine Struktur die aus zwei α -Helices besteht. Diese beiden α -Helices sind über einen kurzen unstrukturierten Bereich miteinander verbunden. Eventuell kontaktiert Peptid B2 über diese zwei α -Helices die α -Helices α_2 und α_3 der C2-Domäne und unterbindet so eine Homooligomerisierung von CAD.

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der Peptide B1/B2 in der Therapie von Krankheiten könnten diese eingesetzt werden, um die Aktivität der Nuklease zu reduzieren. Das Problem hierbei wären jedoch die hohen IC_{50} -Werte der Peptide. Gerade im Hinblick auf bereits kommerziell

verfügbare Apoptose-Inhibitoren, wie zum Beispiel spezielle Caspase Inhibitoren, die IC_{50} -Werte im unteren nanomolaren Bereich ausweisen, wären die Peptide nicht konkurrenzfähig¹⁹². Eventuell könnte dieses Problem gelöst werden, indem man das inhibitorische Peptid (B1 oder B2) an ein zweites Peptid fusioniert (z.B. über einen PEG [Polyethylenglykol]-*linker*), das ebenfalls CAD kontaktiert. Hier würde sich zum Beispiel Peptid A10 anbieten. Ein solches Fusionspeptid hätte sicherlich eine höhere Gesamtaffinität zur Nuklease und könnte in geringeren Konzentrationen verabreicht werden. Dennoch bedeutet eine Unterdrückung der Nukleaseaktivität von CAD bekanntermaßen keine generelle Kontrolle der Apoptose in ihrer Gesamtheit. Daher wäre ein Einsatz der Peptide für medizinische Zwecke nur in spezifischen Fällen, oder in Verbindung mit zusätzlichen Faktoren, denkbar. Eine Verwendungsmöglichkeit der Peptide A10 und A18 läge hingegen in der kontrollierten Aktivierung der Nuklease CAD, um z.B. entartete Zellen gezielt zu töten. Hierbei würden die Peptide die Nuklease binden und dadurch den zellulären Inhibitor ICAD von CAD verdrängen. Da diese Peptide jedoch, wie gezeigt, über keine inhibitorische Wirkung verfügen, würde dies zur Aktivierung von CAD und somit zum Auslösen der Apoptose führen. Das Problem der geringen Affinität ließe sich eventuell wiederum durch eine Fusion der beiden Peptide lösen.

4.3 Untersuchungen zur CAD Inhibition durch ICAD

Bereits vor den SPOT-Membran Versuchen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Experimente mit verschiedenen ICAD-Mutanten durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es, in so genannten Inhibitionsversuchen, zu überprüfen, ob diese Mutanten noch in der Lage sind CAD zu inhibieren. Hier hatte besonders der Austausch der Aminosäure Y195, ein Tyrosinrest, Auswirkungen auf die inhibitorische Wirkung von ICAD. Wurde dieser Rest in der kurzen Isoform ICAD-S gegen einen Alaninrest ausgetauscht, so konnten bereits Effekte auf die inhibitorische Wirkung des Proteins (nur noch 17% der inhibitorischen Wirkung) registriert werden. Dies lässt vermuten, dass der Tyrosinrest im Mechanismus der CAD Inhibition eine entscheidende Rolle spielt. Denkbar wäre hierbei, dass die reaktive Hydroxyl-Gruppe des Tyrosinrests an Interaktionen zwischen ICAD und CAD beteiligt ist. Eine andere Eigenschaft von Tyrosinresten ist, dass sie durch ihre aromatische Gruppe so genannte „*stacking*“ Interaktionen mit anderen aromatischen Gruppen eingehen können¹⁹³. Eine weitere sehr interessante Entdeckung war, dass der Austausch dieses Tyrosinrestes durch einen Prolinrest zu einer drastischen Reduzierung des Inhibitionsvermögens von ICAD-S führte (nur noch 0,1% der inhibitorischen Wirkung). Die Aminosäure Prolin gilt, aufgrund ihrer sperrigen Struktur und der nicht vorhandenen freien Aminogruppe, als so genannter Helix-Brecher¹⁹⁴. Dabei bricht der Prolinrest die Helix nicht wortwörtlich auseinander, sondern fügt vielmehr einen markanten Knick in die Helix ein. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Position des Sekundärstrukturelements (laut Prognose eine α -Helix, s. Abbildung 30), in dem sich Tyrosin 195 befindet, für den Mechanismus der Inhibition äußerst entscheidend ist. Dabei kann es sein, dass neben Tyrosin 195 auch andere benachbarte Aminosäurereste in diesem Sekundärstrukturelement wichtige Kontakte zu CAD vermitteln. Eine Prolin bedingte Verschiebung der α -Helix könnte durchaus auch die Ausbildung dieser Kontakte unterbinden, wodurch der drastische Effekt der Prolin-Mutante zu erklären wäre. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass sich die eingefügten Mutationen auf ICAD-S offensichtlich stärker auswirken, als auf dessen längere Isoform. Denkbar wäre, dass sich der verlängerte C-Terminus von ICAD-L stabilisierend auf die Region von Tyrosin 195 auswirkt, und so

etwa ein mögliches Verbiegen von Sekundärstrukturelementen partiell unterbindet. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass ICAD-L, aufgrund der zusätzlichen C-terminalen Interaktionen mit CAD, über eine größere Kontaktfläche mit CAD verfügt. Diese weiteren Kontakte sorgen in Kombination mit den N-terminalen Interaktionen dafür, dass die mittlere Domäne, samt der Region von Y195, stärker in Position gehalten wird. Eine lokale Störung in Folge der Mutation hat daher einen größeren Effekt auf ICAD-S als auf ICAD-L. Die CD-Spektren, die für die verschiedenen Varianten aufgenommen wurden, verlaufen sehr ähnlich und lassen eine identische Sekundärstruktur-Zusammensetzung vermuten. Dies wiederum deutet auf eine ähnliche Gesamtstruktur der Proteine hin. Das Einfügen der Mutationen hatte somit keinen größeren Einfluss auf die korrekte Faltung der Proteine, weshalb die beobachteten Effekte nicht mit einem Strukturverlust in Verbindung stehen.

Die in diesen Versuchen detektierte Interaktion der Region von Tyrosin 195 mit der Nuklease CAD wurde durch die anschließenden Versuche mit der ICAD SPOT-Membran bestätigt. Hier zeigte sich ein sehr starkes Interaktionssignal für das Peptid B10 ($^{181}\text{Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E}^{200}$), das Tyrosin 195 beinhaltet. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse zum einen darauf schließen, dass die Region um Peptid B10, samt Tyrosin 195, mit der Nuklease CAD interagiert und zum anderen, dass diese Interaktion im Zusammenhang mit der Inhibition von CAD durch ICAD steht. Die Ergebnisse beider Versuche (SPOT-Membran und Protein Inhibitionsversuche) deuten dabei darauf hin, dass ein sehr kurzer Abschnitt dieser Region (hauptsächlich Y195) für den inhibitorischen Effekt verantwortlich ist (s. 4.1.1.2). Somit sind auch die Kontakte, die zwischen Peptid B10 und CAD ausgebildet werden, auf eine kleinere Interaktionsregion beschränkt. Man kann somit vermuten, dass die Affinität des kompletten Peptids B10 zu CAD vergleichbar schwach ist und es daher die Nuklease in den Peptid Inhibitionsversuchen nicht isoliert in Lösung hemmen konnte. Im Protein ICAD wird dieser Bereich eventuell durch andere Strukturelemente in räumlicher Nähe zu CAD orientiert und ist auf keine sehr starke eigene Affinität zu CAD angewiesen, um seine inhibitorische Wirkung zu entfalten.

Da die SPOT-Membran Versuche zeigen, dass eine weitere Region der inhibitorischen Domäne sehr stark mit CAD interagiert (Peptide B1/B2), wurden auch in diesem Bereich von ICAD verschiedene Positionen mutiert. Anschließend wurde, wie für die ICAD-Mutanten Y195, in so genannten Inhibitionsversuchen überprüft, ob diese Mutanten noch in der Lage sind CAD zu inhibieren. Hier zeigte sich, dass speziell die Mutation von Aminosäurerest E143 Auswirkungen auf das Inhibitionsvermögen von ICAD hat. Dabei ist der Effekt nicht mit einer veränderten Sekundärstruktur-Zusammensetzung zu erklären, da die CD-Spektren wiederum keine Abweichungen zu Wildtyp ICAD zeigten und folglich eine ähnliche Gesamtstruktur vermuten lassen. Wie bereits für die Mutationen im Bereich von Y195 beobachtet, hatten auch die Mutationen im Bereich von E143, wahrscheinlich aufgrund der bereits diskutierten Gegebenheiten, eine stärkere Auswirkung auf ICAD-S (E143R: 11,7% verbleibende inhibitorische Wirkung) als auf die längere Isoform ICAD-L (E143R: 47% verbleibende inhibitorische Wirkung). Die Effekte, die die Mutationen in diesem Bereich bewirkten, waren nicht so stark wie es für die Mutationen im Bereich von Y195 beobachtet werden konnte. Anscheinend ist in dieser Region kein einzelner Bereich für die Interaktion mit CAD von großer Wichtigkeit, sondern vielmehr ein Kollektiv aus mehreren Resten, die sich über einen Bereich erstrecken. Eine einzelne Mutation wird daher von benachbarten Resten kompensiert, die dafür sorgen, dass ICAD weiterhin inhibitorisch aktiv sein kann. Diese Annahme wird von den Ergebnissen der SPOT-Versuche unterstützt. Im Gegensatz zur Region von Y195 (nur ein *spot* mit sehr starker Interaktion), zeigte die Region in der sich E143 befindet eine sehr starke Interaktion in einem Bereich, der sich über zwei *spots* (B1/B2) erstreckte. Außerdem fiel in den Versuchen auf, dass das Einfügen eines Prolinrestes an Position E143,

ungleich zur Y195, keine drastische Reduktion des Inhibitionsvermögens bewirkte. Bezugnehmend auf die Sekundärstrukturvorhersagen ist dieser Befund damit zu erklären, dass sich der Bereich von *spot* B1/B2 anscheinend aus zwei α -Helices zusammensetzt. Aufgrund dieser Abgrenzung in zwei Sekundärstrukturmodule hat das Knicken bzw. Verbiegen einer α -Helix durch das Einfügen des Prolinrestes keinen stärkeren Einfluss auf andere Sekundärstruktur-Bereiche in dieser Region. Somit deckt sich dieses Ergebnis mit der Hypothese, dass in dieser Region kein singulärer, räumlich direkt benachbarter Bereich, sondern eher eine Mehrzahl von auf unterschiedlichen Sekundärstrukturabschnitten lokalisierten Resten mit CAD interagiert. Zusammenfassend konnte für diesen Bereich in drei verschiedenen experimentellen Ansätzen (SPOT-Membran, Peptid Inhibitionsversuche, Protein Inhibitionsversuche) eine direkte bzw. indirekte Interaktion mit CAD nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Peptid Inhibitionsversuche und die Inhibitionsversuche mit ICAD Mutanten lassen zudem darauf schließen, dass diese ICAD-Region (ICAD Aminosäurereste 127-152) eine inhibitorische Funktion innehat. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass diese Region am Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD beteiligt ist.

Schaut man sich die Aminosäuresequenz der CAD Dimerisierungsdomäne (C2) genauer an und vergleicht diese mit anderen Orthologen von CAD, so fällt auf, dass speziell drei Leucinreste hochkonserviert sind¹²⁶. Diese Reste sind dabei auf die drei α -Helices dieser Domäne verteilt. Wie die Kristallstruktur weiter zeigt, befinden sich speziell Leu92 und Leu121 in räumlicher Nähe (3.80 Å) und formen dabei eine Art hydrophoben Core im Bereich der C2-Domäne (siehe. Abbildung 50)¹²⁶. Es ist daher gut vorstellbar, dass hydrophobe Wechselwirkungen Teil der Wechselwirkungen der C2-Domänen von CAD sind. Betrachtet man nun die ICAD Regionen B1/B2 und B10, so kann man erkennen, dass diese ebenfalls hydrophobe Aminosäurereste, wie zum Beispiel Leucine, beinhalten. Dementsprechend könnte es sein, dass ICAD die C2-Domäne von CAD über hydrophobe Wechselwirkungen kontaktiert. Wie man anhand von Versuchen mit der hydrophoben Interaktionschromatographie erkennen kann, bindet ICAD sehr gut an eine hydrophobe Matrix. Da solche hydrophoben Bereiche meist im inneren von Proteinen zu finden sind, muss es sich dabei entweder um kleinere, exponierte Abschnitte, oder aber um Bereiche, die vom ICAD-ICAD Interface (im Falle eines ICAD-Dimers) abgeschirmt sind, handeln.

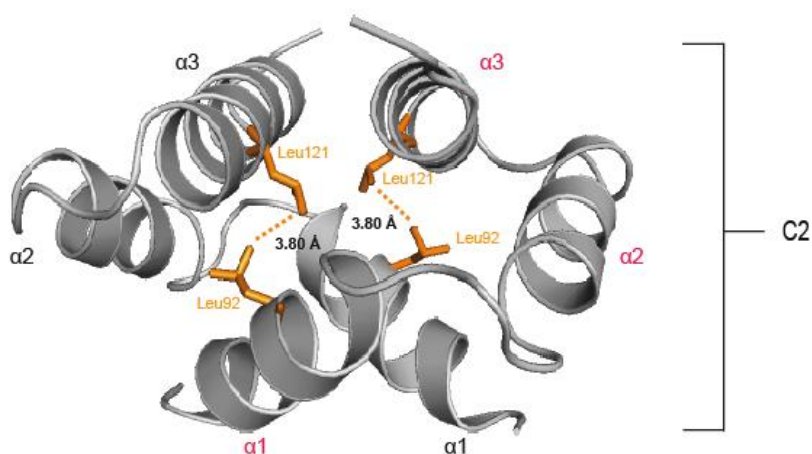


Abbildung 50: Darstellung der hydrophoben Reste Leu92 und Leu121 der C2-Domäne von CAD

Gezeigt ist die Kristallstruktur der C2-Domänen von aktivierter Nuklease CAD. Die hydrophoben Reste Leu92 und Leu121 (orange) befinden sich im Interface der C2-Domänen (grau) in räumlicher Nähe und bilden einen hydrophoben Core. Die α -Helices (α_{1-3}) der beiden Untereinheiten sind entweder in rot (Monomer 1) oder schwarz (Monomer 2) beschriftet. Abbildung nach¹²⁶

4.4 Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD

Bisher ging man von der Annahme aus, dass der C-Terminus von ICAD, im Besonderen der von ICAD-L, alleinig für die Chaperon-ähnliche Funktion von ICAD verantwortlich ist. In neueren Studien gab es jedoch Erkenntnisse, die vermuten lassen, dass gerade auch die Regionen der beiden Caspase Spaltstellen von ICAD mit CAD interagieren und dabei für die korrekte Faltung von CAD wichtige Kontakte etablieren¹⁴⁴. Interessanterweise bestätigten die SPOT Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, eine Interaktion der Caspase Spaltstellen Region mit der Nuklease CAD. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde im Folgenden eine etwaige Teilaktivität der Caspase-Spaltstellen bei der Faltungshelfer Eigenschaft von ICAD näher untersucht. Die Problematik war hierbei, dass Mutationen in den hochspezifischen Caspase Erkennungssequenzen dazu führen, dass die Caspase diese nicht mehr als Substrat erkennen kann. Folglich wären keine Untersuchungen möglich, da ICAD nicht mehr gespalten würde und die Nuklease inaktiv bliebe. Dieses Problem wurde umgangen, indem zusätzliche Protease Spaltstellen (TEV-Protease Spaltstellen; ICAD^{TEV}), direkt C-terminal der jeweiligen Sequenz der Caspase Spaltstellen (¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴), eingefügt wurden¹⁴⁴. Wie erste Untersuchungen zeigten, waren die eingefügten Spaltstellen sehr gut zugänglich. ICAD^{TEV} konnte durch eine kurze Inkubation mit katalytischen Mengen an TEV-Protease in drei Fragmente gespalten werden. Dies konnte ebenso für mit CAD komplexiertem ICAD^{TEV} beobachtet werden. Allerdings zeigten diese Untersuchungen auch, dass die Ko-Expression von CAD mit ICAD^{TEV} eine katalytisch weniger aktive Nuklease Präparation hervorbringt (um ca. eine Größenordnung schwächer aktiv als der Wildtyp). Die Insertion der TEV-Protease Spaltstellen im Bereich der Caspase Spaltstellen wirkte sich also negativ auf die Faltungshelfer Aktivität von ICAD aus. Wahrscheinlich führte die zusätzliche Aminosäuresequenz der beiden insertierten TEV-Protease Spaltstellen dazu, dass es in diesem Bereich von ICAD zu lokalen strukturellen Änderungen kommt. Für die Faltung von CAD wichtige ICAD-Bereiche werden dadurch verschoben und können fortan nur noch vermindert Interaktionen mit CAD ausbilden. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der Feststellung, dass Caspase-3 nur noch geringfügig in der Lage war ICAD^{TEV} zu spalten, auch wenn die Caspase-3 Erkennungssequenzen nicht mutiert waren. Anscheinend führt die Insertion der TEV-Protease Spaltstellen dazu, dass die Positionen der Caspase Spaltstellen in dem Maße verändert werden, dass sie fortan nicht mehr gut zugänglich sind. In weiteren Versuchen wurden nun die Caspase Spaltstellen in ICAD^{TEV} sukzessive mutiert und überprüft, ob solche Mutationen weitere Auswirkungen auf die Faltungshelfer Aktivität von ICAD^{TEV} haben. In der Tat zeigte es sich, dass besonders die Substitution des Aspartatrestes 224 gegen einen Alaninrest (D224A) einen starken Effekt auf das Zusammenspiel von ICAD^{TEV} und CAD hat. Eine mit dieser Variante ko-exprimierte Nuklease zeigte zusätzlich eine um ca. 60% reduzierte Spaltaktivität. Die Ergebnisse zeigen, dass die Caspase Spaltstellen von ICAD in der Tat für eine korrekte Faltung von CAD mitverantwortlich sind. Eine strukturelle Veränderung in diesen Bereichen von ICAD führt zur Expression einer potentiell weniger aktiven Nuklease. Dies ist insofern interessant, da man davon ausgehen kann, dass eine Veränderung in der Domäne der Caspase Spaltstellen (mittlere Domäne) keine Auswirkungen auf die Faltung der C-terminalen Domäne haben sollte. Die C-terminale Domäne wurde bisher ausschließlich in Zusammenhang mit der Chaperon-ähnlichen Funktion von ICAD gebracht. Im Bereich der Caspase Spaltstellen spielt anscheinend speziell der ICAD Rest D224 eine entscheidende Rolle, wie die Untersuchungen zeigen. Wird dieser gegen

einen Alaninrest substituiert führt dies zur Verringerung der Chaperon-ähnlichen Aktivität von ICAD^{TEV}. Interessanterweise ist dieser Rest im Motiv der Caspase Erkennungssequenz hochkonserviert. Jegliche Substitution dieser Position (P1) innerhalb der Caspase-3/7 Erkennungssequenz führt zudem zum sofortigen Verlust der Erkennung und Spaltung durch Caspase-3/7¹⁹⁵. Eventuell handelt es sich hierbei um eine Art *feedback*-Mechanismus der garantieren soll, dass ein mutierter Komplex, der im Zuge der Apoptose nicht durch Caspase-3/7 kontrolliert werden kann, keine potentiell aktive Nuklease hervorbringt. Bedenkt man, dass Mutationen in den gut zugänglichen Caspase-3/7 Spaltstellen dazu führen könnten, dass andere Proteasen ICAD spalten und CAD auch in nicht apoptotischen Zellen aktivieren könnten, so wäre diese weitere Absicherung durchaus sinnvoll. Da es sich bei der untersuchten Variante (ICAD^{TEV}) jedoch nicht um Wildtyp ICAD handelt, sollte man bei der Interpretation der Daten Vorsicht walten lassen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die Beschaffenheit der ICAD Caspase Spaltstellen Region, unabhängig vom ICAD C-Terminus, starke Auswirkungen auf die Aktivität von CAD hat. Man kann daher davon ausgehen, dass die korrekte Faltung von CAD durch verschiedene, auf die Domänen von ICAD verteilte, *check-points* kontrolliert und sichergestellt wird. Interessanterweise lassen die Ergebnisse der CAD SPOT-Membran erkennen, dass die Zn²⁺-Bindestelle von ICAD kontaktiert wird. Dieses Zink-Ion ist für die Struktur von CAD von großer Bedeutung¹²⁶. Im Zusammenhang mit dem Ergebnis, dass die Caspase Spaltstellen an der Faltungshelfer Aktivität von ICAD beteiligt sind, könnte man spekulieren, ob diese Regionen nicht vielleicht die Zink Bindung von CAD erleichtern und so gewährleisten, dass CAD eine potentiell aktive Konformation annehmen kann.

4.5 ICAD Kristallisationsstudien

Für die Kristallisationsstudien wurde, mit dem Vektor pETM-30-ICAD-S, ein neues System für die Überexpression von ICAD-S erfolgreich erstellt. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Reinigungsprotokolls konnten so hoch konzentrierte und äußerst reine Proteinproben präpariert werden (1.5 ml ICAD-S mit einer Konzentration von 8 mg/ml). Bisher konnten Kristalle im Kristallisationsreagenz Nr. 78 der JCSG Suite (0.24 M Natrium Malonat pH 7.0, 20 % (w/v) PEG 3350) erfolgreich gezüchtet werden. Diese Kristalle zeigten jedoch keine ausreichende Diffraktion, wie die Untersuchungen im Teilchenbeschleuniger erkennen ließen. Daher werden momentan, basierend auf den bisherigen Ergebnissen, weitere Untersuchungen geplant. In diesen Untersuchungen könnten einzelne Bestandteile des Kristallisationsreagenz Nr. 78, wie beispielsweise der pH-Wert, leicht verändert werden, um die Kristallisationsbedingungen zu optimieren. Außerdem könnten die bisherigen Kristalle als so genannte „Keime“ für die Zucht von weiteren Kristallen verwendet werden.

4.6 Erstellen einer hochspezifischen CAD-Nuklease durch Fusion mit I-SceI

Ein untergeordnetes Teilprojekt, das sich im Laufe der vorliegenden Arbeit ergab, war das Erstellen einer hochspezifischen CAD-Nuklease durch eine Fusion von CAD an ein spezifisches DNA-Bindemodul. Eine solche hochspezifische Nuklease CAD könnte im Genom spezifische Zielsequenzen erkennen und an diesen Stellen gezielt Doppelstrangbrüche einfügen. Solche

Eigenschaften sind speziell im Zusammenhang mit der Gentherapie erwünscht, in der eine hochspezifische CAD-Nuklease als molekulares Werkzeug eingesetzt werden könnte. Der Vorteil einer solchen, CAD basierten, hochspezifischen Nuklease ist, dass das natürliche Substrat von CAD eukaryotische chromosomale DNA ist, und somit genau das Substrat widerspiegelt, das auch bei der Gentherapie adressiert wird. Außerdem kann die Aktivität von CAD durch ICAD streng kontrolliert werden. Dies erlaubt eine gesteuerte Aktivierung der Nuklease erst nach Binden der spezifischen Erkennungssequenz. Folglich wird das „*off site cleavage*“ und damit verbunden, die Cytotoxizität stark reduziert. Um zu vermeiden, dass für die Aktivierung von CAD ein endogener Faktor (Caspase-3/7) verwendet werden muss, könnte die bereits beschriebene ICAD^{TEV} Variante verwendet werden. Ein solcher Komplex aus hochspezifischer Nuklease CAD und ICAD^{TEV} kann durch die zellfremde TEV (*tobacco etch virus*)-Protease und somit durch einen exogenen Stimulus aktiviert werden. Damit die unspezifische Nuklease CAD das DNA Substrat spezifisch erkennt, wurde diese an die hochspezifische *homing*-Endonuklease I-SceI fusioniert. Hierbei wurde eine katalytisch inaktive Variante von I-SceI (D44S) verwendet, da I-SceI in dem Fusionskonstrukt lediglich als DNA-Bindemodul fungiert. Um zu vermeiden, dass CAD im Fusionsprotein die DNA weiterhin unspezifisch bindet, wurde außerdem eine CAD Variante gewählt (CAD R250A), die eine stark verringerte Affinität zur DNA aufweist¹²⁷. In Verbindung mit einem DNA-Substrat, das zwei I-SceI Erkennungssequenzen in „*tail to tail*“ Orientierung aufweist, sollten somit zwei CAD-Monomere, vermittelt durch die hochspezifische DNA Erkennung der I-SceI Bindemodule, auf der spezifischen DNA in räumliche Nähe gelangen. Nach der Aktivierung durch die Abspaltung von ICAD könnten die beiden CAD-Monomere dann dimerisieren und ihre katalytische Aktivität entfalten. Die DNA würde somit spezifisch im Bereich der beiden I-SceI Erkennungssequenz gespalten werden (siehe Abbildung 12). Die Spezifität eines solchen Fusionsproteins wäre somit noch höher, als die von I-SceI alleine, da für eine Spaltung der DNA zwei I-SceI Erkennungssequenzen gebunden werden müssen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Fusionsprotein, als C-terminale Fusion von I-SceI an CAD, erfolgreich auf molekularer Ebene erstellt und anschließend stabil exprimiert werden. Gerade bei der Expression zeigte sich, dass verschiedene Konstruktionsansätze (z.B. die Fusion von I-SceI an das N-terminale Ende von CAD) oder aber das Verwenden mancher *tags* (z.B. GST) einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Fusionsproteins hatten. Weiter wurden verschiedene proteinogene *linker*-Sequenzen ausprobiert, die die Verbindung zwischen CAD und I-SceI sicherstellten. Auch hier zeigte sich, dass manche *linker*-Sequenzen ungeeignet waren und keine stabile Expression zuließen. Diese Ansätze mussten jeweils verworfen werden, da gerade im Hinblick auf den Einsatz in der Gentherapie die Stabilität der hochspezifischen Nuklease unabdingbar ist. Zwecks Expression einer potentiell aktiven Nuklease CAD wurde das Fusionsprotein, wie für CAD üblich, mit ICAD ko-exprimiert. Nachdem die stabile Expression des Fusionsproteins gewährleistet war, wurde ein geeignetes Reinigungsprotokoll etabliert. Hierbei wurden die besten Erfolge mit einem *strep*-tag am C-terminalen Ende des Fusionsproteins erzielt. Für das etablierte Reinigungsprotokoll wurde dieser *strep*-tag in Kombination mit dem *His-tag* von DFF45 verwendet.

Wie die EMSA Versuche zeigen, bindet das Fusionsprotein die DNA nur, wenn sich auf dieser, die für I-SceI typische, Erkennungssequenz befinden. Das DNA-Substrat ohne I-SceI Erkennungssequenzen wird hingegen nicht gebunden. Dies kann damit erklärt werden, dass die verwendete CAD Variante R250A ein DNA-Substrat nur noch mit einer sehr schwachen Affinität bindet und die DNA-Bindung des Fusionsproteins daher über die I-SceI Untereinheit vermittelt wird. Es gelang folglich erstmals der Beweis, dass die Nuklease CAD, in Fusion mit I-SceI, spezifische DNA-Sequenzen adressiert. Die EMSA Versuche zeigten jedoch auch, dass das Fusionsprotein

die spezifische DNA erst in relativ hohen Konzentrationen komplexiert, obwohl bekannt ist, dass I-SceI DNA mit einer sehr hohen Affinität ($K_d = 9 \text{ nM}$) bindet¹⁹⁶. Anscheinend führt die Fusion der beiden Proteine dazu, dass die DNA Bindung von I-SceI, eventuell aufgrund einer sterischen Kollision mit CAD, behindert wird. Ein Lösungsansatz könnte sein, dass der proteinogene *linker* (GGGS), der die beiden Proteine verbindet, verlängert wird, um so die Wahrscheinlichkeit einer etwaigen Kollision zu reduzieren. In den Spaltversuchen konnte bisher noch keine spezifische Spaltung der Substrat DNA festgestellt werden. Dies könnte in Zusammenhang mit der relativ schwachen Affinität des Fusionsproteins zur DNA gebracht werden. Eventuell ist jedoch auch die CAD-Untereinheit des Fusionsproteins, aufgrund sterischer Hindernisse, noch nicht in der Lage sich nach der I-SceI vermittelten DNA Bindung so auszurichten, dass sie mit einer weiteren CAD-Untereinheit dimerisieren kann. Zur Optimierung könnte auf Ebene des Proteins ein längerer proteinogener *linker* zwischen den beiden Fusionspartnern verwendet werden. Ein weiteres Problem könnte der Abstand der beiden I-SceI Erkennungssequenzen auf der DNA sein. Ist dieser zu lang, befinden sich die beiden CAD-Monomere in zu großer räumlicher Entfernung. Ist dieser zu kurz, kommt es zu sterischen Behinderungen. In beiden Fällen könnte CAD seine aktive, homodimere Struktur nicht ausbilden. Folglich wäre ein zweiter Lösungsansatz den Abstand der beiden I-SceI Erkennungssequenzen zueinander zu verändern, in dem man z.B. andere DNA-*linker* Sequenzen verwendet. Das CAD auch im Fusionsprotein weiterhin aktiv ist zeigen Versuche mit einer Fusion aus CAD WT und I-SceI (D44S). In diesen Versuchen war weiterhin eine starke, jedoch hauptsächlich unspezifische nukleolytische Aktivität zu erkennen. Hierfür sprechen auch die *pull-down* Versuche im Rahmen der Reinigung des Komplexes aus Fusionsprotein und Inhibitor von CAD, in denen gezeigt werden konnte, dass CAD trotz Fusion an I-SceI weiterhin an DFF45 bindet. Dies spricht ebenso dafür, dass nicht die Faltung bzw. die potentielle Aktivität von CAD das Problem zu sein scheint, sondern vielmehr das Koordinieren des Dimerisierens der beiden CAD-Untereinheiten des Fusionsproteins. Bezugnehmend auf die angestrebte Strategie des Dimerisierens zweier CAD-Untereinheiten, könnte ein generelles Problem des CAD Fusionsproteins sein, dass die Frage nach der Stöchiometrie der aktivierten Nuklease noch nicht geklärt ist. Die Kristallstruktur aktivierter Nuklease CAD zeigt jedoch deutlich, dass die minimale Einheit einer solchen Struktur der enzymatisch aktiven Nuklease von einem Dimer geformt wird. Dieses Ergebnis unterstützt somit die angestrebte Strategie der Ausbildung einer aktiven Homodimer Struktur, sobald zwei CAD Monomere, bedingt durch die spezifische DNA Bindung der I-SceI Untereinheiten, in räumliche Nähe kommen.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist CAD an eine hochspezifische DNA Bindedomäne zu fusionieren. Weiter wurde als so genannter „*proof of principle*“ bewiesen, dass ein solches, CAD-basiertes Fusionsprotein DNA hochspezifisch erkennen kann. In Verbindung mit der Gentherapie müsste die DNA-Bindedomäne natürlich so modifiziert werden, dass sie in der Region des adressierten Gens bindet. Hier wäre es denkbar so genannte TALEs (*Transcription activator-like effectors*) Proteine als DNA-Bindedomäne zu verwenden¹⁹⁷. Diese Proteine binden DNA hochspezifisch mit Hilfe mehrerer *tandem repeats*. Wie Studien kürzlich zeigten, können diese Proteine dabei so verändert werden, dass sie prognostizierte DNA-Sequenzen erkennen¹⁹⁸.

5. Zusammenfassung

Der DNA Fragmentierungsfaktor DFF ist ein apoptotischer Protein-Komplex, der aus den Untereinheiten CAD (Caspase-aktivierte DNase) und ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) besteht. In apoptotischen Zellen wird der Inhibitor ICAD durch Effektorcaspasen gespalten und dissoziiert von CAD ab. Darauf folgend oligomerisieren die Nuklease Untereinheiten und bilden ihre aktive Struktur aus. Dies führt zur Spaltung der chromosomalen DNA. In nicht-apoptotischen Zellen unterdrückt der Inhibitor ICAD die Aktivität der Nuklease. Da bis *dato* noch keine komplette Kristallstruktur des DFF-Komplex zur Verfügung steht, ist größtenteils immer noch unklar wie die beiden Untereinheiten, CAD und ICAD, auf molekularer Ebene miteinander interagieren. Der genaue Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD ist daher ebenso ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde die SPOT (*peptid array*) Methode verwendet, um Protein-Protein Wechselwirkungen von CAD und ICAD zu identifizieren. Seitens CAD wurde eine besonders starke Interaktion der C2-Domäne mit ICAD detektiert. Diese Domäne vermittelt die Dimerisierung zweier CAD Monomere und ist essentiell für die Aktivierung von CAD. Dieses Ergebnis ist der erste experimentelle Nachweis für eine direkte Interaktion von ICAD mit der Dimerisierungs- (D2) Domäne von CAD. Es lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten, dass ICAD die Aktivität von CAD reguliert, indem es durch Binden dieser Domäne die Ausbildung der aktiven, homodimeren Scherenstruktur von CAD unterdrückt. Dennoch kann dieser Mechanismus alleine nicht erklären warum CAD auch im Komplex mit ICAD inaktiv ist, da gezeigt werden konnte, dass CAD sowohl in Abwesenheit und Anwesenheit von ICAD DNA binden kann¹¹⁶. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit zeigen daher wichtige Kontakte zwischen ICAD und der Zn²⁺-Bindestelle sowie dem aktiven Zentrum von CAD. Diese legen einen zweistufigen Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD nahe, in dem die apoptotische Nuklease CAD zum einen durch das Unterdrücken der Homodimerisierung und zum anderen, auf Ebene des CAD-Monomers, durch eine strukturelle Veränderungen oder das direkte Blockieren des aktiven Zentrums inhibiert wird. Das Prinzip des dualen Mechanismus der CAD Inhibition wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenso seitens ICAD bestätigt. Hier konnten, durch biochemische Untersuchungen und Mutationsstudien, zwei ICAD Bereiche identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich am Mechanismus der Inhibition von CAD durch ICAD beteiligt sind. Die Bereiche umfassen dabei die AS-Sequenz 127-152 (Peptide B1/B2) und 181-200 (Peptid B10 inklusive Tyr195) der mittleren Domäne von ICAD. Diese Domäne wurde bereits in vorherigen Studien mit der CAD Inhibition in Verbindung gebracht¹²⁶. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich keine Rolle bei der Interaktion zweier ICAD-Moleküle spielt, sondern vielmehr exklusiv an der Wechselwirkung mit CAD beteiligt ist. Der Mechanismus der CAD Inhibition durch ICAD ist also komplexer, als zum Beispiel der Inhibitionsmechanismus der Nuklease A oder der des ColE7. Zwar befürworten die Ergebnisse einen dualen Mechanismus ähnlich wie im Falle von EndoGI und EndoG, aber zeigen jedoch auch zugleich, dass sich die inhibitorische Wirkweise von ICAD nicht mit der von EndoGI vergleichen lässt.

Ebenso zeigten die Untersuchungen, dass die Regionen der Caspase Spaltstellen von ICAD (¹¹⁴DEPD¹¹⁷ und ²²¹DAVD²²⁴) wichtige Kontakte zur Nuklease eingehen. Veränderungen in diesen Regionen vermindern die Faltungshelfer Aktivität von ICAD und führen zu einer weniger aktiven Nuklease Präparation. Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur der C-Terminus von ICAD für die korrekte Faltung von CAD verantwortlich ist, sondern dass andere ICAD Bereiche auch für CAD strukturell wichtige Interaktionen vermitteln. Diese Entdeckung erklärt auch, warum

ICAD-S, trotz eines verkürzten C-Terminus, über eine residuelle Chaperon-ähnliche Aktivität verfügt.

Neben dem detaillierten Einblick in den Mechanismus der Inhibition von ICAD, den die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen, geben diese auch Aufschluss über die Gesamtheit der Wechselwirkungen der beiden DFF-Untereinheiten. Diese können in einem stark schematischen Modell zusammengefasst werden (s. Abbildung 51).

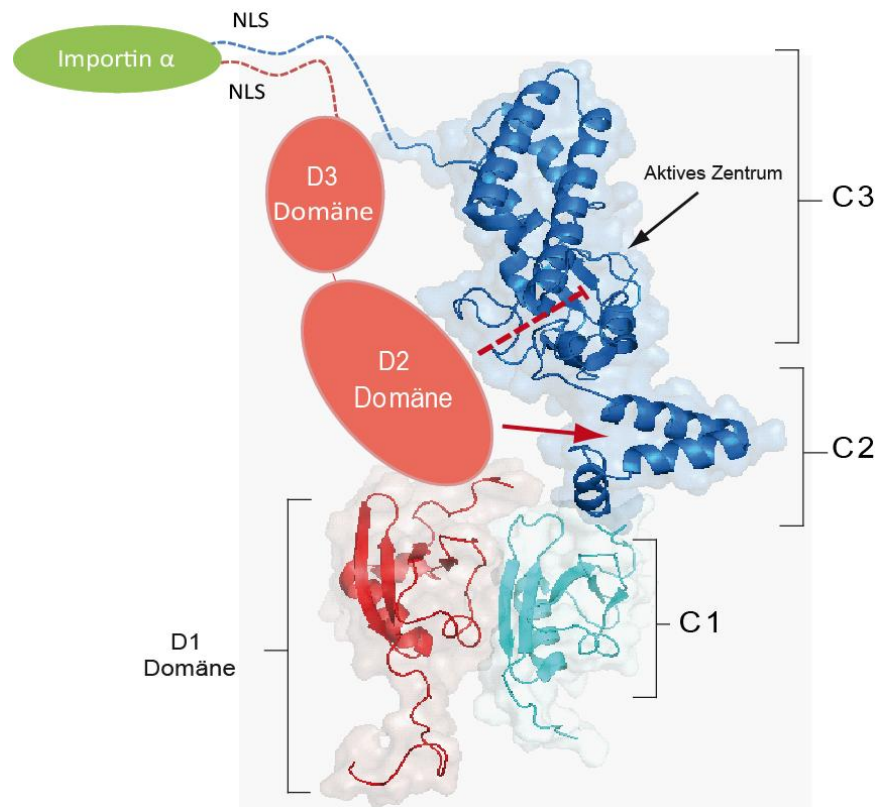


Abbildung 51: Modell des DFF-Komplexes

Gezeigt ist ein Modell des heterodimeren DFF-Komplexes. Dieses basiert auf bereits bekannten strukturellen Informationen in Verbindung mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die ICAD-Domänen sind rot, CAD-Domänen blau hervorgehoben. Neben den bereits beschriebenen N-terminalen Interaktionen zwischen der D1-Domäne von ICAD und der C1-Domäne von CAD, interagiert wahrscheinlich auch die D2-Domäne von ICAD mit CAD. Wie die Ergebnisse vermuten lassen, kontaktiert die D2-Domäne des Inhibitors die C2-Domäne sowie Teile der C3-Domäne von CAD und inhibiert CAD dabei zum einen durch das Unterdrücken der Homodimerisierung (roter Pfeil) und zum anderen durch eine strukturelle Veränderungen oder das direkte Blockieren des aktiven Zentrums (rote gestrichelte Linie). Außerdem treten die beiden C-terminalen Domänen (C3 und D3) der beiden Proteine in Kontakt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird vermutet, dass die NLS-Sequenzen von CAD und ICAD bereits vor dem Binden an Importin- α (grün) miteinander interagieren und eine zweiteilige NLS-Sequenz nachahmen¹¹⁹. Die gestrichelten Linien am C-Terminus von CAD und ICAD sollen diese Interaktion illustrieren. Abbildungen nach ^{122, 126}

In weiteren Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass Topoisomerase II α -abgeleitete Peptide mit CAD interagieren. Topoisomerase II α ist ein Enzym, das für die Superspiralisierung von DNA verantwortlich ist. Diese Untersuchungen bestätigen vorherigen Studien, die beschreiben, dass die Interaktion mit Topoisomerase II α die Aktivität von CAD steigert¹³¹. Außerdem liefern sie einen ersten experimentellen Beweis dafür, dass CAD primär den C-Terminus der Topoisomerase II α kontaktiert. Die für die Aktivität der Topoisomerase II α wichtige N-terminale

(ATPase) und mittlere Domäne (DNA Bindung und Prozessierung) werden daher vermutlich nicht durch CAD beeinflusst. Wahrscheinlich entspannt Topoisomerase II α die DNA in der Umgebung von CAD und erleichtert der DNase so die Spaltung¹⁹¹. In einem untergeordneten Teilprojekt konnte zudem bisher gezeigt werden, dass die Nuklease CAD in Fusion mit einer hochspezifischen DNA-Bindedomäne (eine katalytisch inaktive I-SceI Variante) spezifische DNA-Sequenzen adressiert. Hochspezifische Nukleasen werden in der Gentherapie als molekulares Werkzeug eingesetzt, um gezielt Doppelstrangbrüche in die chromosomale DNA einzufügen. Diese stimulieren die homologe Rekombination um mehrere Größenordnungen.

6. Anhang

6.1.1.1 Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen CAD SPOT-Membran Daten

Tabelle 5: Übersicht der ICAD SPOT-Membran Daten

Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der *spots* der CAD SPOT-Membran mit positivem Signal. Die AS-Sequenz ist in Verbindung mit der Signalstärke der *spots* (niedrig: +, mittel ++, stark +++) und der mutmaßlichen Funktion dargestellt.

spot Nr.	Sequenz	Signalstärke	Mutmaßliche Funktion	
E 1	⁰¹ M-C-A-V-L-R-Q-P-K-C-V-K-L-R-A-L-H-S-A-C ²⁰	+		
E 2	⁰⁷ Q-P-K-C-V-K-L-R-A-L-H-S-A-C-K-F-G-V-A-A ²⁶	+		
E 3	¹³ L-R-A-L-H-S-A-C-K-F-G-V-A-A-R-S-C-Q-E-L ³²	++	Wichtig für die Ausbildung des N-terminalen Interface ¹²²	
E 4	¹⁹ A-C-K-F-G-V-A-A-R-S-C-Q-E-L-L-R-K-G-C-V ³⁸	+		
E 5	²⁵ A-A-R-S-C-Q-E-L-L-R-K-G-C-V-R-F-Q-L-P-M ⁴⁴	+		
E 6	³¹ E-L-L-R-K-G-C-V-R-F-Q-L-P-M-P-G-S-R-L-C ⁵⁰	++		
E16	⁹¹ F-L-S-V-F-N-E-P-H-A-G-V-I-Q-A-A-R-Q-L-L ¹¹⁰	++		Wichtig für die Homodimerisierung von CAD ¹²⁶
E18	¹⁰³ I-Q-A-A-R-Q-L-L-S-D-E-Q-A-P-L-R-Q-K-L-L ¹²²	+++		
E19	¹⁰⁹ L-L-S-D-E-Q-A-P-L-R-Q-K-L-L-A-D-L-L-H-H ¹²⁸	+		
E20	¹¹⁵ A-P-L-R-Q-K-L-L-A-D-L-L-H-H-V-S-Q-N-I-T ¹³⁴	++		
F 3	¹³⁹ E-Q-D-P-S-W-F-E-G-L-E-S-R-F-R-N-K-S-G-Y ¹⁵⁸	+	Der N-terminale Bereich der α_4 -Helix; die α_4 -Helix ist an der DNA Bindung beteiligt ¹²⁷	
F 4	¹⁴⁵ F-E-G-L-E-S-R-F-R-N-K-S-G-Y-L-R-Y-S-C-E ¹⁶⁴	+		
F 5	¹⁵¹ R-F-R-N-K-S-G-Y-L-R-Y-S-C-E-S-R-I-R-G-Y ¹⁷⁰	++		
F 6	¹⁵⁷ G-Y-L-R-Y-S-C-E-S-R-I-R-G-Y-L-R-E-V-S-A ¹⁷⁶	+		
F11	¹⁸⁷ E-E-Y-L-R-V-L-G-S-M-C-Q-K-L-K-S-V-Q-Y-N ²⁰⁶	+	C-terminaler Bereich der α_5 -Helix; bisher keine spezifische Funktion bekannt	
F12	¹⁹³ L-G-S-M-C-Q-K-L-K-S-V-Q-Y-N-G-S-Y-F-D-R ²¹²	++		
F13	¹⁹⁹ K-L-K-S-V-Q-Y-N-G-S-Y-F-D-R-G-A-E-A-S-S ²¹⁸	+		
F17	²²³ P-E-G-W-F-S-C-Q-G-P-F-D-L-E-S-C-L-S-K-H ²⁴²	+	An der Zinkbindung beteiligt; Cys229, Cys238 und His242 koordinieren das für die Struktur wichtige Zn ²⁺¹²⁶	
F18	²²⁹ C-Q-G-P-F-D-L-E-S-C-L-S-K-H-S-I-N-P-Y-G ²⁴⁸	+		
F19	²³⁵ L-E-S-C-L-S-K-H-S-I-N-P-Y-G-N-R-E-S-R-I ²⁵⁴	++		
F20	²⁴¹ K-H-S-I-N-P-Y-G-N-R-E-S-R-I-L-F-S-T-W-N ²⁶⁰	+		
G 1	²⁵³ R-I-L-F-S-T-W-N-L-D-H-I-I-E-K-K-R-T-V-V ²⁷²	+	Teil des katalytischen Zentrums; G1 mit His263 ⁹⁷	
G 3	²⁶⁵ I-E-K-K-R-T-V-V-P-T-L-A-E-A-I-Q-D-G-R-E ²⁸⁴	+		
G 7	²⁸⁹ Y-F-Y-S-L-L-F-T-A-E-N-L-K-L-V-H-I-A-C-H ³⁰⁸	+	Dieser Bereich beinhaltet die NLS-Sequenz von CAD. Wahrscheinlich wird ein zweiteiliges NLS mittels Interaktion mit der NLS-Sequenz von ICAD-L nachgeahmt ¹¹⁹	
G 8	²⁹⁵ F-T-A-E-N-L-K-L-V-H-I-A-C-H-K-K-T-T-H-K ³¹⁴	+		
G 9	³⁰¹ K-L-V-H-I-A-C-H-K-K-T-T-H-K-L-E-C-D-R-S ³²⁰	+		
G10	³⁰⁷ C-H-K-K-T-T-H-K-L-E-C-D-R-S-R-I-Y-R-P-Q ³²⁶	++		
G11	³¹³ H-K-L-E-C-D-R-S-R-I-Y-R-P-Q-T-G-S-R-R-K ³³²	++		
G12	³¹⁹ R-S-R-I-Y-R-P-Q-T-G-S-R-R-K-Q-P-A-R-K-K ³³⁸	+		
G13	³²⁵ P-Q-T-G-S-R-R-K-Q-P-A-R-K-K-R-P-A-R-K-R ³⁴⁴	+		

6.1.1.2 Tabellarische Zusammenfassung der gewonnenen ICAD SPOT-Membran Daten

Tabelle 6: Übersicht der CAD SPOT-Membran Daten

Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der *spots* der ICAD SPOT-Membran mit positivem Signal. Die AS-Sequenz ist in Verbindung mit der Signalstärke der *spots* (niedrig: +, mittel ++, stark +++) und der mutmaßlichen Funktion dargestellt.

spot Nr.	Sequenz	Signalstärke	Mutmaßliche Funktion
A 8	⁴³ R-S-K-A-C-E-L-L-A-I-D-K-S-L-T-P-I-T-L-V ⁶²	+	
A 9	⁴⁹ L-L-A-I-D-K-S-L-T-P-I-T-L-V-L-A-E-D-G-T ⁶⁸	++	Wichtig für die Ausbildung des N-terminalen Interface ¹²²
A10	⁵⁵ S-L-T-P-I-T-L-V-L-A-E-D-G-T-I-V-D-D-D ⁷⁴	+++	
A17	⁹⁷ N-D-S-D-G-G-T-A-W-V-S-Q-E-S-F-E-A-D-E-P ¹¹⁶	++	Beinhaltet die N-terminale Caspase Spaltstelle (DEPD) ¹¹⁴
A18	¹⁰³ T-A-W-V-S-Q-E-S-F-E-A-D-E-P-D-S-R-A-G-V ¹²²	+++	
B 1	¹²⁷ V-A-R-Q-L-K-E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L ¹⁴⁶	+++	CAD Inhibition
B 2	¹³³ E-D-L-S-S-I-I-L-L-S-E-E-D-L-Q-A-L-I-D-I ¹⁵²	+++	
B 8	¹⁶⁹ Q-G-L-Q-S-T-L-Q-Q-V-L-D-Q-R-E-E-A-R-Q-S ¹⁸⁸	+	CAD Inhibition
B 9	¹⁷⁵ L-Q-Q-V-L-D-Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L ¹⁹⁴	++	
B10	¹⁸¹ Q-R-E-E-A-R-Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E ²⁰⁰	+++	
B11	¹⁸⁷ Q-S-K-Q-L-L-E-L-Y-L-Q-A-L-E-K-E-G-N-I-L ²⁰⁶	++	
B14	²⁰⁵ I-L-S-N-Q-K-E-S-K-A-A-L-S-E-E-L-D-A-V-D ²²⁴	++	Beinhaltet die C-terminale Caspase Spaltstelle
B15	²¹¹ E-S-K-A-A-L-S-E-E-L-D-A-V-D-T-G-V-G-R-E ²³⁰	++	
B16	²¹⁷ S-E-E-L-D-A-V-D-T-G-V-G-R-E-M-A-S-E-V-L ²³⁶	+	
C 7	²⁸⁹ C-T-T-E-L-A-L-R-L-Q-Q-V-Q-S-L-H-S-L-R-N ³⁰⁸	+	In diesem Bereich befindet sich die NLS-Sequenz von ICAD-L; Wahrscheinlich wird ein zweiteiliges NLS mittels Interaktion mit der NLS-Sequenz von ICAD-L nachgeahmt ¹¹⁹
C 8	²⁹⁵ L-R-L-Q-Q-V-Q-S-L-H-S-L-R-N-L-S-A-R-R-S ³¹²	+	
C 9	³⁰¹ Q-S-L-H-S-L-R-N-L-S-A-R-R-S-P-L-P-G-E-P ³¹⁸	++	
C10	³⁰⁷ R-N-L-S-A-R-R-S-P-L-P-G-E-P-Q-R-P-K-R-A ³²⁴	++	
C11	³¹³ R-R-S-P-L-P-G-E-P-Q-R-P-K-R-A-K-R-D-S-S ³³⁰	+	

7. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)
Å	Angström
β	Beta
Δ	Delta
λ	lambda
Ω	Ohm
A	
A	Alanin
AAP	Agaroseauftragspuffer
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat
ad	auffüllen auf
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
Amp	Ampicillin
APAF-1	<i>Apoptosis-activating factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
B	
Bax	<i>Bcl2-associated protein X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CAD	Caspase-activated DNase
cDNA	<i>copy DNA</i>
CIDE	Cell death-inducing DFF45-like effector
cm	Zentimeter
D	
D	Aspartat
d	desoxy-
d.h.	das heißt

Da	Dalton
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor
DFF40	40 kDa Untereinheit von DFF (Nuklease)
DFF45	45 kDa Untereinheit von DFF (Inhibitor)
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
DTT	1, 4-Dithiothreitol
E	
E	Glutamat
E. coli	Escherichia coli
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EndoG	Endonuklease G
EndoGI	Inhibitor der Endonuklease G
et al.	und andere
etc.	et cetera
F	
F	Farad
FasL	Fas Ligand
FasR	Fas Rezeptor
G	
g	Gramm
G	Glycin
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
h	Stunde
H/His	Histidin
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
I	
I	Isoleucin
ICAD	Inhibitor von CAD
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid

K	
k	Kilo- (10^3)
K	Lysin
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
L	
L	Leucin
l	Liter oder linear
LAP	Laemmli-Auftragspuffer
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Lys	Lysin
M	
m	milli- (10^{-3})
M	Molar
Me ²⁺	zweiwertiges Metallion
Mg ²⁺	Magnesium
MgAc	Magnesiumacetat
min	Minuten
Mn ²⁺	Mangan
N	
n	nano- (10^{-9})
N	Asparagin
NaAC	Natriumacetat
Ni-NTA	Nickel- <i>nitrilo-triaceticacid</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
O	
oc	<i>open circle</i>
OD ^{xnm}	optische Dichte bei x nm Lichtwellenlänge
P	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI3P	Phosphatidyl-Inositol-3 Phosphat
Poly[d(I-C)]	<i>Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid</i>
PUMA	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
Q	
Q	Glutamin
R	
R	Arginin
RNAi	RNA <i>interference</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>

RT	Raumtemperatur
S	
sc	<i>supercoiled</i>
SDS	Sodium dodecylsulfate
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
STE	Salz-Tris-EDTA
T	
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>Transformation-storage-solution</i>
TTBS	<i>Tween-Tris-buffered saline</i>
U	
u	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	
V	Volt oder Valin
Vol.	Volumen
W	
W	Watt
wt	Wildtyp
Y	
Y	Tyrosin
Z	
z.B.	zum Beispiel

8. Literatur

1. Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306 (1980).
2. 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**, 239-257 (1972).
3. Vaux, D.L. & Korsmeyer, S.J. Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254 (1999).
4. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795 (2000).
5. Baumann, S., Krueger, A., Kirchhoff, S. & Krammer, P.H. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med* **2**, 257-272 (2002).
6. Vogt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte *Alytes obstetricans*. (1842).
7. Bellamy, C.O., Malcomson, R.D., Harrison, D.J. & Wyllie, A.H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* **6**, 3-16 (1995).
8. Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15 (1995).
9. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891-2906 (2004).
10. Clarke, P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 195-213 (1990).
11. Deter, R.L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**, 437-449 (1967).
12. Pfeifer, U. Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy. *J Cell Biol* **78**, 152-167 (1978).
13. Dunn, W.A., Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**, 1923-1933 (1990).
14. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* **78**, 217-245 (2007).
15. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556 (1980).
16. Kihlmark, M., Imreh, G. & Hallberg, E. Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 3643-3653 (2001).
17. Counis, M.F. & Torriglia, A. DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol* **78**, 405-414 (2000).
18. Williams, J.R., Little, J.B. & Shipley, W.U. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* **252**, 754-755 (1974).
19. Kaufmann, S.H., Mesner, P.W., Jr., Samejima, K., Tone, S. & Earnshaw, W.C. Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods Enzymol* **322**, 3-15 (2000).
20. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-18 (2000).
21. Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 108-116 (2003).
22. Krysko D.V., D.G., Festjens N., et al in Cell death and differentiation 2006).
23. Fadok, V.A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207-2216 (1992).
24. McIlroy, D. *et al.* An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* **14**, 549-558 (2000).
25. Samejima, K. & Earnshaw, W.C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 677-688 (2005).
26. Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 581-586 (1994).
27. Horvitz, H.R., Shaham, S. & Hengartner, M.O. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 377-385 (1994).
28. Johnson, E.M., Jr. Possible role of neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **15 Suppl 2**, S187-189 (1994).

29. Lev, N., Melamed, E. & Offen, D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 245-250 (2003).
30. Roshal, M., Zhu, Y. & Planelles, V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* **6**, 103-116 (2001).
31. Gray, F. *et al.* Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 321-328 (1999).
32. Lowe, S.W. & Lin, A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-495 (2000).
33. Huang, Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* **19**, 6627-6631 (2000).
34. Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
35. Peter, M.E. & Kramer, P.H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* **10**, 545-551 (1998).
36. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995).
37. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675-1687 (1998).
38. Kischkel, F.C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**, 5579-5588 (1995).
39. Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 2926-2930 (1998).
40. Boatright, K.M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**, 529-541 (2003).
41. Johnson, H., Scorrano, L., Korsmeyer, S.J. & Ley, T.J. Cell death induced by granzyme C. *Blood* **101**, 3093-3101 (2003).
42. Ashton-Rickardt, P.G. The granule pathway of programmed cell death. *Crit Rev Immunol* **25**, 161-182 (2005).
43. Andrade, F., Casciola-Rosen, L.A. & Rosen, A. Granzyme B-induced cell death. *Acta Haematol* **111**, 28-41 (2004).
44. Andrade, F. *et al.* Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* **8**, 451-460 (1998).
45. Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 151-165 (1998).
46. Brenner, C. & Kroemer, G. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* **289**, 1150-1151 (2000).
47. Kroemer, G. & Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-519 (2000).
48. Zamzami, N. & Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 67-71 (2001).
49. Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619 (1993).
50. Nakano, K. & Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-694 (2001).
51. Wolter, K.G. *et al.* Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 1281-1292 (1997).
52. Acehan, D. *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423-432 (2002).
53. Shi, Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* **10**, 285-288 (2002).
54. Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J. & Kroemer, G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* **6**, 516-524 (1999).
55. Cande, C. *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-222 (2002).
56. Parrish, J. *et al.* Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**, 90-94 (2001).
57. Li, L.Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
58. Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 299-306 (1997).

59. Mitamura, S., Ikawa, H., Mizuno, N., Kaziro, Y. & Itoh, H. Cytosolic nuclease activated by caspase-3 and inhibited by DFF-45. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 480-484 (1998).
60. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652 (1993).
61. Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. & Vandenabeele, P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**, 358-361 (2002).
62. Coll, N.S. *et al.* Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science* **330**, 1393-1397 (2010).
63. Koonin, E.V. & Aravind, L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ* **9**, 394-404 (2002).
64. Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
65. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184 (1997).
66. Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. & Krammer, P.H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* **127**, 15-20 (1994).
67. Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D., Ormerod, M.G. & Cohen, G.M. Changes in nuclear chromatin precede internucleosomal DNA cleavage in the induction of apoptosis by etoposide. *Biochem Pharmacol* **47**, 187-195 (1994).
68. 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. *The Journal of biological chemistry* **270**, 20239-20241 (1995).
69. 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. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21458-21467 (2002).
70. Schafer, P., Cymerman, I.A., Bujnicki, J.M. & 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).
71. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-788 (2000).
72. Vlassov, V., Abramova, T., Godovikova, T., Giege, R. & Silnikov, V. Sequence-specific cleavage of yeast tRNA(Phe) with oligonucleotides conjugated to a diimidazole construct. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**, 39-42 (1997).
73. Vlassov, V.V., Zuber, G., Felden, B., Behr, J.P. & Giege, R. Cleavage of tRNA with imidazole and spermine imidazole constructs: a new approach for probing RNA structure. *Nucleic Acids Res* **23**, 3161-3167 (1995).
74. Fedor, M.J. The catalytic mechanism of the hairpin ribozyme. *Biochem Soc Trans* **30**, 1109-1115 (2002).
75. Roberts, R.J. Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem* **4**, 123-164 (1976).
76. Pingoud, A. & Jeltsch, A. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**, 3705-3727 (2001).
77. Galburt, E.A. & Stoddard, B.L. Catalytic mechanisms of restriction and homing endonucleases. *Biochemistry* **41**, 13851-13860 (2002).
78. Chevalier, B.S. & Stoddard, B.L. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* **29**, 3757-3774 (2001).
79. Hsia, K.C., Li, C.L. & Yuan, H.S. Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 126-134 (2005).
80. Silva, G.H. & Belfort, M. Analysis of the LAGLIDADG interface of the monomeric homing endonuclease I-Dmol. *Nucleic Acids Res* **32**, 3156-3168 (2004).
81. Fuxreiter, M. & Simon, I. Protein stability indicates divergent evolution of PD-(D/E)XK type II restriction endonucleases. *Protein Sci* **11**, 1978-1983 (2002).
82. Kuhlmann, U.C., Moore, G.R., James, R., Kleanthous, C. & Hemmings, A.M. Structural parsimony in endonuclease active sites: should the number of homing endonuclease families be redefined? *FEBS Lett* **463**, 1-2 (1999).
83. Jurica, M.S., Monnat, R.J., Jr. & Stoddard, B.L. DNA recognition and cleavage by the LAGLIDADG homing endonuclease I-Crel. *Mol Cell* **2**, 469-476 (1998).

84. Moure, C.M., Gimble, F.S. & Quioco, F.A. The crystal structure of the gene targeting homing endonuclease I-SceI reveals the origins of its target site specificity. *J Mol Biol* **334**, 685-695 (2003).
85. Lagerback, P. & Carlson, K. Amino acid residues in the GIY-YIG endonuclease II of phage T4 affecting sequence recognition and binding as well as catalysis. *J Bacteriol* **190**, 5533-5544 (2008).
86. Walker, D.C. *et al.* Mutagenic scan of the H-N-H motif of colicin E9: implications for the mechanistic enzymology of colicins, homing enzymes and apoptotic endonucleases. *Nucleic Acids Res* **30**, 3225-3234 (2002).
87. Kleanthous, C. *et al.* Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nature structural biology* **6**, 243-252 (1999).
88. Landthaler, M., Shen, B.W., Stoddard, B.L. & Shub, D.A. I-BasI and I-Hmul: two phage intron-encoded endonucleases with homologous DNA recognition sequences but distinct DNA specificities. *J Mol Biol* **358**, 1137-1151 (2006).
89. Biertumpfel, C., Yang, W. & Suck, D. Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction. *Nature* **449**, 616-620 (2007).
90. Ghosh, M., Meiss, G., Pingoud, A., London, R.E. & Pedersen, L.C. Structural insights into the mechanism of nuclease A, a betabeta alpha metal nuclease from *Anabaena*. *The Journal of biological chemistry* **280**, 27990-27997 (2005).
91. Scholz, S.R. *et al.* Experimental evidence for a beta beta alpha-Me-finger nuclease motif to represent the active site of the caspase-activated DNase. *Biochemistry* **42**, 9288-9294 (2003).
92. Wu, S.L. *et al.* Mutagenesis identifies the critical amino acid residues of human endonuclease G involved in catalysis, magnesium coordination, and substrate specificity. *J Biomed Sci* **16**, 6 (2009).
93. 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**, 217-228 (2004).
94. Galburt, E.A. *et al.* A novel endonuclease mechanism directly visualized for I-Ppol. *Nature structural biology* **6**, 1096-1099 (1999).
95. Miller, M.D., Tanner, J., Alpaugh, M., Benedik, M.J. & Krause, K.L. 2.1 A structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nature structural biology* **1**, 461-468 (1994).
96. Li, C.L. *et al.* DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J* **22**, 4014-4025 (2003).
97. Meiss, G., Scholz, S.R., Korn, C., Gimadutdinow, O. & Pingoud, A. Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD. *Nucleic Acids Res* **29**, 3901-3909 (2001).
98. Huang, H. & Yuan, H.S. The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases. *J Mol Biol* **368**, 812-821 (2007).
99. Widlak, P., Li, P., Wang, X. & Garrard, W.T. Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *The Journal of biological chemistry* **275**, 8226-8232 (2000).
100. Meiss, G., Gimadutdinow, O., Haberland, B. & Pingoud, A. Mechanism of DNA cleavage by the DNA/RNA-non-specific *Anabaena* sp. PCC 7120 endonuclease NucA and its inhibition by NuiA. *J Mol Biol* **297**, 521-534 (2000).
101. Eaves, G.N. & Jeffries, C.D. Isolation and Properties of an Exocellular Nuclease of *Serratia Marcescens*. *J Bacteriol* **85**, 273-278 (1963).
102. Focareta, T. & Manning, P.A. Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system. *Mol Microbiol* **5**, 2547-2555 (1991).
103. Mishra, N.C. & Forsthoefel, A.M. Biochemical genetics of *Neurospora* nuclease II: Mutagen sensitivity and other characteristics of the nuclease mutants. *Genet Res* **41**, 287-297 (1983).
104. Chow, T.Y. & Resnick, M.A. An endo-exonuclease activity of yeast that requires a functional RAD52 gene. *Mol Gen Genet* **211**, 41-48 (1988).
105. Alani, E., Padmore, R. & Kleckner, N. Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* **61**, 419-436 (1990).
106. Yang, W. Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat Res* **460**, 245-256 (2000).

107. Grafi, G. & Larkins, B.A. Activity of single-stranded DNA endonucleases in mung bean is associated with cell division. *Plant Mol Biol* **29**, 703-710 (1995).
108. Liu, L.F., Liu, C.C. & Alberts, B.M. Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* **19**, 697-707 (1980).
109. Nicholson, R.H. & Nicholson, A.W. Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome* **13**, 67-73 (2002).
110. Tijsterman, M. & Plasterk, R.H. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* **117**, 1-3 (2004).
111. Widlak, P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* **47**, 1037-1044 (2000).
112. Williamson, R. Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *J Mol Biol* **51**, 157-168 (1970).
113. Kornberg, R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871 (1974).
114. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99 (1998).
115. Liu, X. *et al.* The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8461-8466 (1998).
116. Korn, C. *et al.* Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *The Journal of biological chemistry* **280**, 6005-6015 (2005).
117. Lechardeur, D. *et al.* Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol* **150**, 321-334 (2000).
118. Xerri, L. *et al.* Frequent nuclear localization of ICAD and cytoplasmic co-expression of caspase-8 and caspase-3 in human lymphomas. *J Pathol* **192**, 194-202 (2000).
119. Neimanis, S., Albig, W., Doenecke, D. & Kahle, J. Sequence elements in both subunits of the DNA fragmentation factor are essential for its nuclear transport. *The Journal of biological chemistry* **282**, 35821-35830 (2007).
120. Sakahira, H. & Nagata, S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 3364-3370 (2002).
121. Lechardeur, D., Dougaparsad, S., Nemes, C. & Lukacs, G.L. Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 40216-40225 (2005).
122. Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S. & Yamazaki, T. Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nature structural biology* **7**, 658-662 (2000).
123. Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Nunez, G. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* **17**, 2526-2533 (1998).
124. Uegaki, K. *et al.* Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J Mol Biol* **297**, 1121-1128 (2000).
125. Zhou, P., Lugovskoy, A.A., McCarty, J.S., Li, P. & Wagner, G. Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6051-6055 (2001).
126. Woo, E.J. *et al.* Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell* **14**, 531-539 (2004).
127. Reh, S., Korn, C., Gimadutdinow, O. & Meiss, G. Structural basis for stable DNA complex formation by the caspase-activated DNase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 41707-41715 (2005).
128. Fukushima, K. *et al.* Solution structure of the DFF-C domain of DFF45/ICAD. A structural basis for the regulation of apoptotic DNA fragmentation. *J Mol Biol* **321**, 317-327 (2002).
129. Widlak, P. & Garrard, W.T. The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyanions. *Apoptosis* **11**, 1331-1337 (2006).
130. Widlak, P. & Garrard, W.T. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* **66**, 263-274 (2009).

131. Durrieu, F. *et al.* DNA topoisomerase II α interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* **10**, 923-926 (2000).
132. Kalinowska-Herok, M. & Widlak, P. High mobility group proteins stimulate DNA cleavage by apoptotic endonuclease DFF40/CAD due to HMG-box interactions with DNA. *Acta Biochim Pol* **55**, 21-26 (2008).
133. Liu, Q.L., Kishi, H., Ohtsuka, K. & Muraguchi, A. Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood* **102**, 1788-1796 (2003).
134. Lu, C. *et al.* Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell* **23**, 121-132 (2006).
135. Ahn, J.Y. *et al.* Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase. *EMBO J* **25**, 2083-2095 (2006).
136. Ahn, J.Y. *et al.* Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell* **18**, 435-445 (2005).
137. Squatrito, M., Mancino, M., Donzelli, M., Areces, L.B. & Draetta, G.F. EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. *Oncogene* **23**, 4454-4465 (2004).
138. Larsen, B.D. *et al.* Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4230-4235.
139. McCarty, J.S., Toh, S.Y. & Li, P. Multiple domains of DFF45 bind synergistically to DFF40: roles of caspase cleavage and sequestration of activator domain of DFF40. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 181-185 (1999).
140. Sakahira, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *The Journal of biological chemistry* **275**, 8091-8096 (2000).
141. Halenbeck, R. *et al.* CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* **8**, 537-540 (1998).
142. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L, and ICAD-S. *The Journal of biological chemistry* **274**, 15740-15744 (1999).
143. Scholz, S.R. *et al.* The effect of ICAD-S on the formation and intracellular distribution of a nucleolytically active caspase-activated DNase. *Nucleic Acids Res* **30**, 3045-3051 (2002).
144. Xiao, F., Widlak, P. & Garrard, W.T. Engineered apoptotic nucleases for chromatin research. *Nucleic Acids Res* **35**, e93 (2007).
145. Gu, J. *et al.* Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *The Journal of biological chemistry* **274**, 20759-20762 (1999).
146. Chen, D. *et al.* Characterization of the rat DNA fragmentation factor 35/Inhibitor of caspase-activated DNase (Short form). The endogenous inhibitor of caspase-dependent DNA fragmentation in neuronal apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **275**, 38508-38517 (2000).
147. Park, H.H. Fifty C-terminal amino acid residues are necessary for the chaperone activity of DFF45 but not for the inhibition of DFF40. *BMB Rep* **42**, 713-718 (2009).
148. McCarty, J.S., Toh, S.Y. & Li, P. Study of DFF45 in its role of chaperone and inhibitor: two independent inhibitory domains of DFF40 nuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 176-180 (1999).
149. Ball, T.K., Suh, Y. & Benedik, M.J. Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. *Nucleic Acids Res* **20**, 4971-4974 (1992).
150. Kleanthous, C. & Walker, D. Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends Biochem Sci* **26**, 624-631 (2001).
151. Cheng, Y.S., Hsia, K.C., Doudeva, L.G., Chak, K.F. & Yuan, H.S. The crystal structure of the nuclease domain of colicin E7 suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA by the H-N-H endonucleases. *J Mol Biol* **324**, 227-236 (2002).
152. Ku, W.Y. *et al.* The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis. *Nucleic Acids Res* **30**, 1670-1678 (2002).
153. Muro-Pastor, A.M., Flores, E., Herrero, A. & Wolk, C.P. Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **6**, 3021-3030 (1992).

154. Muro-Pastor, A.M., Herrero, A. & Flores, E. The *nuiA* gene from *Anabaena* sp. encoding an inhibitor of the NucA sugar-non-specific nuclease. *J Mol Biol* **268**, 589-598 (1997).
155. Ghosh, M., Meiss, G., Pingoud, A.M., London, R.E. & Pedersen, L.C. The nuclease a-inhibitor complex is characterized by a novel metal ion bridge. *The Journal of biological chemistry* **282**, 5682-5690 (2007).
156. Temme, C. *et al.* The *Drosophila melanogaster* Gene *cg4930* Encodes a High Affinity Inhibitor for Endonuclease G. *The Journal of biological chemistry* **284**, 8337-8348 (2009).
157. Loll, B., Gebhardt, M., Wahle, E. & Meinhart, A. Crystal structure of the EndoG/EndoGI complex: mechanism of EndoG inhibition. *Nucleic Acids Res* **37**, 7312-7320 (2009).
158. Miller, J.C. *et al.* An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* **25**, 778-785 (2007).
159. Wah, D.A., Bitinaite, J., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10564-10569 (1998).
160. Beumer, K., Bhattacharyya, G., Bibikova, M., Trautman, J.K. & Carroll, D. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics* **172**, 2391-2403 (2006).
161. Colleaux, L., Michel-Wolwertz, M.R., Matagne, R.F. & Dujon, B. The apocytochrome b gene of *Chlamydomonas smithii* contains a mobile intron related to both *Saccharomyces* and *Neurospora* introns. *Mol Gen Genet* **223**, 288-296 (1990).
162. Monteilhet, C., Perrin, A., Thierry, A., Colleaux, L. & Dujon, B. Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron. *Nucleic Acids Res* **18**, 1407-1413 (1990).
163. 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**, 2172-2175 (1989).
164. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
165. Kirsch, R.D. & Joly, E. An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res* **26**, 1848-1850 (1998).
166. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
167. Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48** (1992).
168. Frank, R. SPOT-synthesis: an easy and flexible tool to study molecular recognition. Epton, R. (Ed.), *Proc. International Symposium on 'Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis', Oxford 1993. Mayflower Worldwide, Birmingham*, 509 (1994).
169. Frank, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* **267**, 13-26 (2002).
170. Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Schneider-Mergener, J. & Hohne, W. Characterizing and optimizing protease/peptide inhibitor interactions, a new application for spot synthesis. *J Biochem* **128**, 1051-1057 (2000).
171. Wenschuh, H. *et al.* Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* **55**, 188-206 (2000).
172. Hilpert, K., Winkler, D.F. & Hancock, R.E. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc* **2**, 1333-1349 (2007).
173. Reineke, U., Volkmer-Engert, R. & Schneider-Mergener, J. Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 59-64 (2001).
174. Merrifield, R.B. Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry* **3**, 1385-1390 (1964).
175. Dujon, B. Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations--a review. *Gene* **82**, 91-114 (1989).
176. Dujon, B. *et al.* Mobile introns: definition of terms and recommended nomenclature. *Gene* **82**, 115-118 (1989).
177. Colleaux, L., D'Auriol, L., Galibert, F. & Dujon, B. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6022-6026 (1988).
178. Kahle, J., Piaia, E., Neimanis, S., Meisterernst, M. & Doenecke, D. Regulation of nuclear import and export of negative cofactor 2. *The Journal of biological chemistry* **284**, 9382-9393 (2009).

179. Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R.B. & Garrard, W.T. Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 26915-26922 (2003).
180. Kanouchi, H., Nishizaki, H., Minatogawa, Y. & Tone, S. Large complex formation of the inhibitor of caspase-activated DNase. *Apoptosis* **10**, 651-656 (2005).
181. Bjergbaek, L. *et al.* Communication between the ATPase and cleavage/religation domains of human topoisomerase II α . *The Journal of biological chemistry* **275**, 13041-13048 (2000).
182. Reece, R.J. & Maxwell, A. The C-terminal domain of the Escherichia coli DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* **19**, 1399-1405 (1991).
183. Wigley, D.B., Davies, G.J., Dodson, E.J., Maxwell, A. & Dodson, G. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**, 624-629 (1991).
184. Morais Cabral, J.H. *et al.* Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388**, 903-906 (1997).
185. Brino, L. *et al.* Dimerization of Escherichia coli DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *The Journal of biological chemistry* **275**, 9468-9475 (2000).
186. Fass, D., Bogden, C.E. & Berger, J.M. Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nature structural biology* **6**, 322-326 (1999).
187. Fass, D., Bogden, C.E. & Berger, J.M. Crystal structure of the N-terminal domain of the DnaB hexameric helicase. *Structure* **7**, 691-698 (1999).
188. Shaiu, W.L., Hu, T. & Hsieh, T.S. The hydrophilic, protease-sensitive terminal domains of eucaryotic DNA topoisomerases have essential intracellular functions. *Pac Symp Biocomput*, 578-589 (1999).
189. Adachi, N. *et al.* Cellular distribution of mammalian DNA topoisomerase II is determined by its catalytically dispensable C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* **25**, 3135-3142 (1997).
190. Mirski, S.E., Gerlach, J.H. & Cole, S.P. Sequence determinants of nuclear localization in the α and β isoforms of human topoisomerase II. *Exp Cell Res* **251**, 329-339 (1999).
191. Champoux, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**, 369-413 (2001).
192. Cai, S.X. *et al.* Dipeptidyl aspartyl fluoromethylketones as potent caspase inhibitors: SAR of the N-protecting group. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 5295-5300 (2004).
193. M.J. Betts, R.B.R. Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*, Chapter 14 (2003).
194. Li, S.C., Goto, N.K., Williams, K.A. & Deber, C.M. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6676-6681 (1996).
195. Talanian, R.V. *et al.* Substrate specificities of caspase family proteases. *The Journal of biological chemistry* **272**, 9677-9682 (1997).
196. Joshi, R. *et al.* Evolution of I-SceI homing endonucleases with increased DNA recognition site specificity. *J Mol Biol* **405**, 185-200 (2010).
197. Christian, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
198. Boch, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512 (2009).