

**DNA-Bindung und -Spaltung durch den DNA-Fragmentierungs-Faktor
(DFF)**

DNA-Bindung und -Spaltung durch den DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF)

Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften, FB08

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Oec. troph. Christian Korn

geboren am 17.06.1968 in Neuwied

Gießen, 2005

Für Gulmira und ...

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie (FB08) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit vom 01.11.2000 bis 28.02.2005 unter Leitung von Prof. Dr. A. Pingoud angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer
Institut für Biologiedidaktik, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Karl-Glöckner-Straße 21, 35394 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud
Institut für Biochemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Albrecht Bindereif
Institut für Biochemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Tag der Promotion: 18.04.2005

I. Liste der Veröffentlichungen

1. Korn C¹, Scholz SR¹, Gimadutdinow O, Lurz R, Pingoud A, Meiss G. Interaction of DFF with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *J Biol Chem.* 2004 Nov 30; [Epub ahead of print]. PMID: 15572351
2. Scholz SR, Korn C, Bujnicki JM, Gimadutdinow O, Pingoud A, Meiss G. Experimental evidence for a beta beta alpha-Me-finger nuclease motif to represent the active site of the caspase-activated DNase. *Biochemistry.* 2003 Aug 12;42(31):9288-94. PMID: 12899615
3. Scholz SR, Korn C, Gimadutdinow O, Knoblauch M, Pingoud A. The effect of ICAD-S on the formation and intracellular distribution of a nucleolytically active caspase-activated DNase. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3045-51. PMID: 12136086
4. Korn C, Scholz SR, Gimadutdinow O, Pingoud A, Meiss G. Involvement of conserved histidine, lysine and tyrosine residues in the mechanism of DNA cleavage by the caspase-3 activated DNase CAD. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1325-32. PMID: 11884629
5. Meiss G, Scholz SR, Korn C, Gimadutdinow O, Pingoud A. Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD. *Nucleic Acids Res.* 2001 Oct 1;29(19):3901-9. PMID: 11574671
6. Meiss G, Bottcher U, Korn C, Gimadutdinow O, Pingoud A. Vectors for dual expression of target genes in bacterial and mammalian cells. *Biotechniques.* 2000 Sep;29(3):476-8, 480. No abstract available. PMID: 10997261
7. Korn C, Meiss G, Gast F, Gimadutdinow O, Urbanke C, Pingoud A. Genetic engineering of *Escherichia coli* to produce a 1:1 complex of the *Anabaena* sp. PCC 7120 nuclease NucA and its inhibitor NuiA. *Gene.* 2000 Aug 8;253(2):221-9. PMID: 10940560

¹: Erstautorteilung

II. Posterbeiträge

1. Scholz, S.R., Korn, C., Gimadutdinow, O., Pingoud, A., Meiss, G. (2004) Activity and nuclear transport of human DNA fragmentation factor, 29th FEBS Congress, Warschau, 26.06-1.07.2004
2. Meiss G., Scholz, S.R., Korn, C. Patrick Schäfer, Cymerman, I, Bujnicki, J.M., Gimadutdinow, O., Pingoud, A. (2004) CAD (DFF40) and EndoG: two $\beta\beta\alpha$ -Me-finger nucleases involved in apoptotic DNA fragmentation, 29th FEBS Congress, Warschau, 26.06-1.07.2004
3. Scholz, S.R., Korn, C., Gimadutdinow, O., Kann, M., Pingoud, A., Meiss, G. (2003) ICAD-isoforms regulate the formation, activity and intracellular distribution of CAD, HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX World Congress, Montreal, 8.-11.10.2003
4. Korn, C. Scholz, S.R., Schäfer, P., Cymerman, I., Bujnicki, J.M., Ruiz-Carrillo, A., Gimadutdinow, O., Pingoud, A., Meiss, G. (2003) CAD and Endo G are $\beta\beta\alpha$ -Me-finger nucleases: implications for the active site structures and catalytic mechanisms, ELSO 2003 together with the GBM (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie), Dresden, 20.-24.09.2003
5. Scholz, S.R., Korn, C., Gimadutdinow, O., Pingoud, A., Meiss, G (2003) The role of ICAD-isoforms in the formation and intracellular distribution of CAD, Apoptosis 2003 From signaling pathways to therapeutic tools, Luxemburg, 29.01-01.02.2003
6. Meiss, G., Scholz, S.R., Korn, C., Schäfer, P., Cymerman, I., Bujnicki, J.M., Ruiz-Carrillo, A., Gimadutdinow, O., Pingoud, A. (2001) CAD and Endo G are $\beta\beta\alpha$ -Me-finger nucleases: implications for the active site structures and catalytic mechanisms, Apoptosis 2003 From signaling pathways to therapeutic tools, Luxemburg, 29.01-01.02.2003
7. Scholz, S.R., Korn, C., Pingoud, A., Meiss, G. (2001) The Caspase Activated DNase (CAD): Nuclear Export and Catalytic Activity, Workshop des Graduiertenkollegs Biochemie von Nukleoproteinkomplexen, Schloss Rauischolzhausen bei Marburg, 7.-9.10.2001

Danksagungen

Zuerst möchte ich Herrn Professor Dr. Alfred M. Pingoud für die Übernahme des Referates, die Unterstützung dieser Arbeit und die gewährten Freiheiten danken.

Herrn Professor Dr. Albrecht Bindereif möchte ich für die Großzügigkeit bei der Übernahme des Coreferates danken.

Herrn Doktor Gregor Meiss möchte ich dafür danken, dass diese Arbeit geworden ist, was sie ist. Vielen Dank, Gregor.

Frau Ute Konradi möchte ich für die Vermittlung der erlernten Methoden und ihre liebe Art danken.

Herrn Doktor Sebastian Richard „Basti“ Scholz danke ich für die gute Zusammenarbeit und viele „Highlights“ in dieser Zeit.

Herrn Dipl.-Biol. Patrick Schäfer danke ich für die super Dänemark-Reise.

Herrn Doktor Oleg Gimadutdinow danke ich für viele unvergessene Gespräche.

Den Dipl.-Biol. Frau Wibke Müller und Frau Stefanie Reh danke ich für Spaß im Laboralltag.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie, auch der Arbeitsgruppe Prof. Bindereif sowie den ehemaligen Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima.

Meiner geliebten Frau Gulmira danke ich für ihre Unterstützung und Rücksichtnahme.

Zum Schluß möchte ich meinen Eltern danken, die immer für mich da waren.

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
Ω	Ohm, Maßeinheit für den Widerstand
λ	Wellenlänge
A	
A	Ampère
AAP	Agaroseauftragspuffer
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ad	auffüllen auf
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäurerest
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	
bp	Basenpaar(e)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	
c	centi, ein Hundertstel
CAD	Caspase aktivierte DNase
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-CoA-Transferase
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl]-dimethylammonio]-1-propansulfonat
D	
Da	Dalton (molekulare Gewichtseinheit; g/mol)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor, Heterodimer aus CAD und ICAD
DFF40	40 kDa Untereinheit von DFF
DFF45	45 kDa Untereinheit von DFF
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat

Abkürzungsverzeichnis

dsDNA	doppelsträngige DNA
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz-Dihydrat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	
F	Farad, Maßeinheit für die elektrische Kapazität
G	
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GdnCl	Guanidiniumchlorid
ggfs.	gegebenenfalls
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H	
h	Stunde(n) (hour)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-1-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hrsg.	Herausgeber
I	
ICAD	Inhibitor von CAD
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> , immobilisierte Metallionen-Affinitäts- chromatographie
IPTG	I- sopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
J	
J	Joule
K	
k	Kilo, Tausend
K	Kelvin oder Gleichgewichtskonstante
L	
l	Liter
LAP	Laemmli-Auftragspuffer

Abkürzungsverzeichnis

LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithiumacetat
lin	linear
ln	natürlicher Logarithmus
log	logarithmisch
Lys	Lysin
M	
m	Meter oder milli (ein Tausendstel)
M	Mol
mcs	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäuremonohydrat
min	Minute(n)
Mr	Molekularmasse
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
N	
N	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
O	
oc	<i>open circle</i>
OD	Optische Dichte
OD ^{x nm}	Optische Dichte bei x nm
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylen-Glykol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	
R	
R	allgemeine Gaskonstante (8.314 kJ * mol ⁻¹ * K ⁻¹)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite

Abkürzungsverzeichnis

sc	<i>supercoiled</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
STE	Salz-Tris-EDTA
T	
t	Zeit (<i>time</i>)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TSS	<i>Transformation Storage Solution</i>
Tyr	Tyrosin
U	
U	Aktivitätseinheit für Enzyme (unit(s))
u.a.	und andere oder unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
UV	Ultraviolett
V	
v	Volumen
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	
w	Gewicht (<i>weight</i>)
W	Watt
Wdh.	Wiederholungen
Wt oder wt	Wildtyp
X	
Y	
Z	
z. B.	zum Beispiel

I. PUBLIKATIONEN/LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	VI
II. POSTERBEITRÄGE.....	VII
1 EINLEITUNG	XIV
1.1 Apoptose oder der programmierte Zelltod	XIV
1.2 Der rezeptorvermittelte Signalweg der Apoptose	XIV
1.3 Granzym-induzierte Apoptose	15
1.4 Die Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen	15
1.5 Nukleasen.....	16
1.5.1 Einteilung der Nukleasen	16
1.5.2 Biologische Funktion von Nukleasen.....	16
1.5.3 Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen	17
1.6 Der DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF)	18
1.6.1 Die apoptotische Nuklease DFF40 (CAD).....	18
1.6.2 Die Isoformen DFF45 (ICAD-L) und DFF35 (ICAD-S)	21
1.6.3 Regulation von DFF/DFF40 (CAD).....	22
1.6.4 Chaperone Funktion der ICAD-Isoformen.....	24
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
2 MATERIALIEN UND METHODEN	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien	28
2.1.2.1 Enzyme und Marker	28
2.2 Mikrobiologische Arbeiten.....	29
2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen	29
2.2.2 <i>E. coli</i> -Stämme	29
2.2.3 Plasmid-Vektoren.....	30
2.2.4 Bereitung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.4.1 Bereitung TSS-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.2.5.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen	32
2.2.5.2 Elektrotransformation.....	32

2.3 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.3.1 Agarosegelelektrophorese	33
2.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese.....	33
2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.3.2.1 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.3.3 Plasmid-DNA-Isolation.....	34
2.3.3.1 Plasmid-Präparationen im Kleinmaßstab.....	34
2.3.3.2 Plasmid-Präparationen im Großmaßstab	34
2.3.4 DNA-Konzentrations-Bestimmung	34
2.3.5 DNA-Modifizierung	34
2.3.5.1 Restriktionsspaltung von DNA.....	34
2.3.5.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase.....	35
2.3.6 Oligonukleotide	35
2.4 PCR	36
2.4.1 PCR-Standardbedingungen	36
2.4.2 Design von PCR-Primern.....	37
2.4.3 <i>In vitro</i> -Mutagenese mittels inverser PCR	37
2.4.4 Screening nach positiven Klonen	38
2.5 Proteinexpression und Reinigung.....	39
2.5.1 Eigenschaften der verwendeten Expressionssysteme.....	39
2.5.1.1 Expression von Genen mit Hilfe des T7-Promotor-Systems	39
2.5.1.2 Expression von Genen mit Hilfe des <i>tac</i> -Promotors.....	39
2.5.1.3 Expression von Genen mit Hilfe der λP_L - und <i>tac</i> -Promotor-Systeme.....	40
2.5.2 Expression der Proteine im analytischen Maßstab	40
2.5.3 Expression und Reinigung von Proteinen im präparativen Maßstab.....	40
2.5.4 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitäts-Chroma-tographie	41
2.5.4.1 Ni^{2+} -NTA-Affinitäts-Chromatographie	41
2.5.4.2 Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatographie.....	41
2.5.5 Reinigung von DFF durch Anionenaustauschchromatogra- phie.....	42
2.5.6 Abspaltung des GST- <i>tags</i> durch Thrombin.....	42
2.6 Proteincharakterisierungen	43
2.6.1 Gelfiltrationsanalysen.....	43
2.6.2 SDS-Gelelektrophorese	43
2.6.3 Bestimmung der Konzentration von Proteinen.....	43
2.6.4 Ultrafiltration.....	44
2.6.5 Nuklease-Aktivitätsassay	44
2.6.6 Aktivitätskinetiken	44
2.6.7 <i>Time-order-of-addition</i> -Experimente	44
2.6.8 Nachweis von DFF45 durch Caspase-3.....	45

Inhaltsverzeichnis

2.6.9 DNA-Bindungsexperimente	45
2.6.9.1 DNA-Shift-Assay oder EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	45
2.6.9.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie	46
2.6.9.3 DNA-Cellulose-Bindungsassay	46
2.6.9.4 <i>Photocrosslink</i> -Experimente.....	46
2.6.10 Kristallisationsansätze	46
3 ERGEBNISSE	47
3.1 Etablierung eines Expressions- und Reinigungssystems für DFF.....	47
3.1.1 Renaturierung von CAD.....	47
3.1.2 Bicistronisches Expressionssystem	48
3.1.3 Zwei-Plasmid-Expressionssysteme	49
3.1.3.1 Herstellung des rekombinanten DFF-Komplexes.....	49
3.1.3.2 Löslichkeit der Proteine	50
3.1.3.3 Ni-NTA-affinitätschromatographische Reinigung von DFF	50
3.1.3.4 Anionenaustauschchromatographische Reinigung von DFF	51
3.2 Kristallisationsversuche mit His-CAD/DFF45	53
3.3 Charakterisierung des aktiven Zentrums der Nuklease.....	53
3.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese	53
3.3.2 Auswahl der Aminosäuren zur Untersuchung ihrer katalytischen Relevanz.....	53
3.3.3 Herstellung von CAD (DFF40) -Mutanten	55
3.3.3.1 Expressionsstrategie und -ergebnis von GST-CAD <i>Mutante</i>	55
3.3.3.2 Affinitätschromatographische Reinigung GST-DFF-Komplex Varianten	56
3.3.4 Charakterisierung der Mutanten	56
3.3.4.1 Inhibitorbindung	57
3.3.4.2 DNase-Aktivität.....	57
3.3.4.3 DNA-Bindung	58
3.3.4.4 Oligomerenstatus	59
3.3.4.5 Eigenschaften von CAD-Varianten mit Austauschen konservierter Aminosäurereste in der C-terminalen katalytischen Domäne von CAD	60
3.3.5 Identifizierung der für den Spaltmechanismus essentiellen Histidinreste His263 und His308	61
3.3.6 $\beta\alpha$ -Me-finger-Modell	62
3.3.6.1 Sequenzhomologien von CAD und H-N-H Nukleasen	62
3.3.6.2 Entwicklung des $\beta\alpha$ -Me-finger-Modells.....	64
3.3.6.3 Mechanismus der Phosphodiester-spaltung	65
3.3.7 Funktionen weiterer konservierter Histidine	66
3.3.8 Funktionen von Lysinen und Tyrosinen	67
3.3.9 Funktionen von Argininen.....	67

3.4 ICAD-S (DFF35)	68
3.4.1 Herstellung von CAD/ICAD-S-Komplex	68
3.4.1.1 Systemkonstruktion	68
3.4.1.2 Expressionsstrategie	68
3.4.1.3 Reinigung der Proteine	69
3.4.2 Biochemische Charakterisierung von CAD/ICAD-S	70
3.4.2.1 Interaktion mit CAD (DFF40)	70
3.4.2.2 Untersuchung auf chaperone Eigenschaften	70
3.4.2.3 Inhibition der Nuklease durch ICAD-S	71
3.5 DNA-Bindung von DFF	71
3.5.1 Die Bedeutung der DNA-Bindung von DFF	71
3.5.2 Präparation der Komplexe für DNA-Bindungsexperimente	72
3.5.3 Nachweismethoden	72
3.5.4 Bindung von DFF und freier Nuklease an DNA-Substrate verschiedener Größe	72
3.5.5 Die Nukleaseuntereinheit vermittelt die DNA-Bindung von DFF	74
3.5.6 Elektronenmikroskopische Dokumentation der DNA-Bindung von DFF und aktivierter Nuklease.....	76
3.5.7 Stimulation der Nukleaseaktivität durch DNA-Bindung von DFF vor oder während DFF40-(CAD) Aktivierung	78
4 DISKUSSION	80
4.1 Etablierung eines effektiven Expressionssystems für DFF	80
4.2 Charakterisierung des aktiven Zentrums	80
4.3 Funktionen weiterer Histidine	83
4.4 Die Funktionen von Tyrosinen und Lysinen	84
4.5 Funktionen konservierter Argininreste	86
4.6 Charakterisierung von ICAD-S	87
4.6.1 ICAD-S weist im Vergleich zu DFF45 eine etwa 50-fach niedrigere Faltungshelferaktivität auf.....	87
4.7 DNA-Bindung	88
4.7.1 Ein bisher unbekannter Mechanismus der Nukleaseinhibition am Beispiel von DFF.....	88
4.7.2 DFF-Aktivierung in DNA-gebundener Form.....	89
4.7.3 Modell der DFF-Aktivierung	90
4.7.4 Nichtkatalytische DNA-Bindung von DFF40 (CAD) in DFF unter Beteiligung des aktiven Zentrums .	90
5 ZUSAMMENFASSUNG	93

7 LITERATURVERZEICHNIS 95

1 Einleitung

1.1 Apoptose oder der programmierte Zelltod

Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein fundamentaler Prozess, der für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase essentiell ist (Jacobson *et al.*, 1997, Nagata, 1997). Der Prozess wurde zuerst von Kerr *et al.* (1972) erkannt. Apoptotische Zellen zeigen *membrane blebbing*, zytoplasmatisch morphologische Veränderungen, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, den Zusammenbruch des Zellkerns, apoptotische Körperchen und schließlich Phagozytose (Wyllie *et al.*, 1980). Defekte bei der Apoptose sind mit zahlreichen Krankheiten verbunden, wie Neoplasien, AIDS, Autoimmunerkrankungen und der Degenerierung von Neuronen (Thompson, 1995). Die grundlegenden Vorgänge bei der Apoptose sind hochkonserviert und in allen Metazoen zu finden. Apoptose kann sowohl in Gegenwart von Inhibitoren der RNA- oder Proteinsynthese (Itoh *et al.*, 1991) als auch in Zellen, denen der Nukleus entfernt wurde, ausgelöst werden (Schultze-Osthoff *et al.*, 1994). Alle apoptotischen Komponenten sind in wachsenden Zellen vorhanden und müssen nur durch Stimuli aktiviert werden. Für die Pionierarbeit auf dem Gebiet der Entwicklungsgenetik und des programmierten Zelltodes in *Caenorhabditis elegans* wurde der Nobelpreis für Medizin im Jahr 2002 gemeinsam an Brenner, Horvitz und Sulston verliehen.

1.2 Der rezeptorvermittelte Signalweg der Apoptose

Die beiden großen apoptotischen Signalwege sind der Todesrezeptor-Signalweg und der hier nicht weiter beschriebene mitochondriale Pfad (Green, 2000, Wang, 2001). Es gibt vielfache apoptotische Stimuli, wie ionisierende Strahlung, Substanzen, die die DNA angreifen oder die Aktivierung des Fas-Rezeptors. Fas, ebenfalls als APO-1 oder CD95 bekannt, ist ein TypI-Membranprotein und gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. Diese Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne, sowie einer konservierten intrazellulären Domäne bestehend aus etwa 80 Aminosäuren (Curtin, *et al.*, 2003). Die intrazelluläre Domäne wird auch als *death domain* bezeichnet und vermittelt die Signalweiterleitung nach Bindung des FasL-Liganden, einem sogenannten Todessignal. Das wahrscheinlich trimere Protein FasL bindet über die extrazelluläre Region an drei Fas-Moleküle und stimuliert dadurch eine Trimerisierung des Rezeptors in der Membran. Dies führt zur Bildung

des DISC (*death inducing signalling complex*), der aus verschiedenen Proteinen besteht. FADD (*Fas-associated protein with death domain*) bindet über seine C-terminal gelegene *death domain* an die *death domain* von Fas. Die N-terminale Domäne wird als DED (*death effector domain*) bezeichnet. Sie rekrutiert Caspase-8, die mit zwei N-terminalen DED an FADD bindet. Caspasen sind Aspartat-spezifische Cysteinyln-Proteasen, die in der Zelle als inaktive Vorstufen (Zymogene) vorliegen. Aktive Caspasen kommen als Tetramere, aufgebaut aus zwei Heterodimeren, vor und besitzen somit zwei aktive Zentren. Ihre Aktivierung durch die genannten apoptotischen Stimuli initiiert und führt das apoptotische Programm aus (Reidl und Shi, 2004). *Upstream* (Initiator) -Caspasen, wie Caspase-1 und Caspase-11, sind in der Lage, sich durch Autokatalyse zu aktivieren, wogegen *downstream* oder Effektor-Caspasen erst durch Initiator-Caspasen gespalten werden müssen, um eine katalytisch aktive Form zu erlangen. Caspase-3 und -7 sind Beispiele hierfür. Im aktiven Zustand ist Caspase-8 in der Lage, Procaspase-3 in aktive Caspase-3 zu spalten. Dies führt letztendlich dazu, dass Caspase-3 die inhibitorische Untereinheit des DNA-Fragmentierungs-Faktors spaltet und die so aktivierte Nuklease DFF40 mit der Degradierung der DNA beginnt (Nagata, 1997). Des Weiteren spaltet Caspase-8 BID, ein Protein aus der Bcl-2-Familie und produziert dadurch das pro-apoptotische tBID-Fragment, welches wiederum die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien stimuliert (Gross *et al.*, 1999). Cytochrom *c* bildet mit Apaf-1 und Caspase-9 das Apoptosom, das ebenfalls in der Lage ist, Caspase-3 zu aktivieren.

1.3 Granzym-induzierte Apoptose

T-Zellen und T-Killer-Zellen benutzen zur Eliminierung von Virus-infizierten Zellen einen exozytotischen Signalweg. Dabei sekretieren sie ein porenbildendes Protein (Perforin) und Granzyme. Granzyme sind Proteasen, die zur Serin-Protease-Familie gehören. Durch die gebildeten Poren gelangen die Granzyme in die Zelle und aktivieren gezielt ausgewählte, pro-apoptotische Proteine. Granzym B spaltet z.B. Caspase-3, aber auch BID und ICAD, was zur Aktivierung von CAD (Heusel *et al.*, 1994, Alimonti *et al.*, 2001), und zu tBID führt.

1.4 Die Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen

Die Signalwege der Apoptose und die Signalwege zur Aufnahme der apoptotischen Zelle durch Phagozytose sind eng miteinander verknüpft. Die DNA-Fragmentierung in den späten

apoptotischen Stadien in mononukleosomale Fragmente durch apoptotische Nukleasen liefert den Makrophagen „bißgerechte“ Bruchstücke für eine effektive Beseitigung der DNA durch Phagozytose. Die komplette Beseitigung der apoptotischen Körperchen durch Phagozytose stellt einen sehr wichtigen Schritt dar (Savill und Fadok, 2000). Patienten oder Tiermodelle mit einer gestörten apoptotischen DNA-Prozessierung haben eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen (Napirei *et al.*, 2000, Yasutomo *et al.*, 2001). In Phagozyten erfolgt internukleosomale DNA-Spaltung primär durch DNase II, die aus den Lysosomen freigesetzt wird.

1.5 Nukleasen

Nukleasen gemein ist die Katalyse der Spaltung von Nukleinsäuren. Bereits zweiwertige Metallionen, wie Pb^{2+} oder Mg^{2+} , sind in der Lage, in Hefe bzw. Tintenfisch spezifisch tRNA zu spalten (Brown *et al.*, 1985, Matsuo *et al.*, 1995). Auch Imidazol kann in *E. coli* tRNA spalten (Vlassov *et al.*, 1995). Ribozyme sind als RNA-Moleküle in der Lage, die Spaltung von Phosphodiesterbindungen in cis (intramolekular) und in trans (intermolekular) zu katalysieren (Symons, 1992, Been, 1993). Als letztes seien die proteinogenen Nukleasen genannt, die in vielen zellulären Funktionen DNA spalten.

1.5.1 Einteilung der Nukleasen

Nukleasen weisen in ihren biochemischen Charakteristika und Mechanismen eine hohe Diversität auf. Dabei können sie nach der Art der zu spaltenden Bindung (C3'-O3'; O3'-Phosphat; O5'-Phosphat), nach ihrem Angriffspunkt (exo- oder endonukleolytisch), nach ihrer Spezifität (Substratspezifität: DNA vs. RNA; Basenspezifität; Sequenzspezifität; Strukturspezifität: Einzel-, Doppelstrang- oder Sekundärstrukturspezifisch), der Art der Doppelstrangspaltung bei Endonukleasen (Einzel- oder Doppelstrangbrüche, glatte oder überhängende Enden) und der Spaltpolarität der Exonukleasen (5'→3' oder 3'→5' Exonukleaseaktivität) unterschieden werden.

1.5.2 Biologische Funktion von Nukleasen

Nukleasen aus allen Bereichen des Lebens sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Nukleasen sind für den Nukleinsäuremetabolismus wichtig und sind an der Wiederverwertung der Nukleinsäurebausteine beteiligt (*salvage pathway*). Die von *E. coli* sezernierten Colicin DNasen, wie ColE7 und ColE9, dienen dem Schutz der Wirtszelle (Hsia *et al.*, 2005). Die von *Serratia marcescens* sezernierte Nuklease dient vermutlich der Versorgung von Phos-

phat und Nukleotiden für das Zellwachstum (Hsia *et al.*, 2005). Bakterien besitzen zum Schutz gegen Phagen und eindringende Fremd-DNA Restriktionsendonukleasen (Pingoud, 2004). Bei Methylierung der Erkennungssequenzen der eigenen DNA erkennen und spalten diese spezifisch die Fremd-DNA. Nukleasen sind am Prozess der DNA-Reparatur und Rekombination beteiligt. Beispiele sind das MTHLS-Reparatursystem aus *E. coli*, sowie das *Mismatch*-Reparatursystem aus *Homo sapiens* und der Hefe. Auch spielt eine Vielzahl von speziellen Ribonukleasen bei der Prozessierung von DNA-Transkripten, wie z.B. dem Spleißen der pre-mRNA oder der Prozessierung der pre-tRNAs zu reifen tRNAs eine wichtige Rolle. Die Prozessierung von pri-miRNAs zu pre-miRNAs und schließlich zu reifen miRNAs erfolgt durch die Ribonukleasen Drosha bzw. Dicer. RNA-Interferenz ist ein bedeutender Mechanismus zur Regulation der Genexpression, bei dem die mRNA nicht translatiert wird oder degradiert wird. Die DNA-Fragmentierung im Verlauf der Apoptose wird von Nukleasen durchgeführt. Als Beispiel hierfür sei der DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF) genannt, der in dieser Arbeit charakterisiert wurde.

1.5.3 Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen

Nukleasen katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung und sind somit Phosphodiesterasen. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind Phosphodiester sehr stabil. Nukleasen beschleunigen die DNA-Spaltung gegenüber 1 M NaOH um den Faktor 10^{16} . Das aktive Zentrum neutralisiert die Ladung, stabilisiert durch die Bereitstellung einer elektrophilen Gruppe den Übergangszustand der Spaltreaktion, generiert durch die Bereitstellung eines allgemeinen Säure-Base-Paares die nukleophile Gruppe für den Angriff auf die zu spaltende Phosphodiesterbindung und protoniert die Abgangsgruppe. Die allgemeine Base abstrahiert einem Wassermolekül ein Proton. Dadurch entsteht ein OH^- , welches das positiv polarisierte Phosphoratom nukleophil angreift. Die allgemeine Säure protoniert nach erfolgter Spaltung die Abgangsgruppe. Das allgemeine Säure-Base-Paar kann direkt aus den Seitenketten der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren stammen oder aber von mindestens einem durch das aktive Zentrum koordiniertem Me^{2+} -Ion bereitgestellt werden.

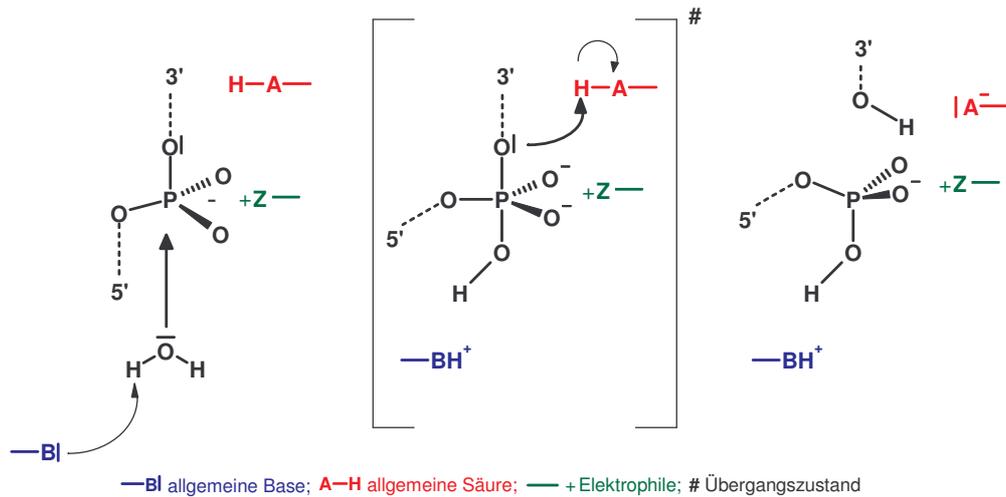


Abb. 1-1: Allgemeiner Mechanismus einer Phosphodiester-Spaltung

Durch die Abstrahierung eines Protons von einem Wassermolekül durch die allgemeine Base wird ein Hydroxylanion generiert, welches als Nucleophil die zu spaltende Phosphodiesterbindung angreift. Im bipyramidalen Übergangszustand wird die zusätzliche, am pentakovalenten Phosphor entstehende negative Ladung durch das Elektrophil neutralisiert. Die allgemeine Säure protoniert schließlich die Abgangsgruppe (modifiziert nach Saenger 1991, Suck 1992).

1.6 Der DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF)

Ein wichtiges Kennzeichen der Apoptose ist die internukleosomale DNA-Spaltung (Wyllie, 1980). Diese ist an einer „DNA-Leiter“ zu erkennen. Die wichtigste Nuklease hierbei ist die Caspase-aktivierte-DNase (CAD), die auch als DNA-Fragmentierungsfaktor 40 kDa (DFF40) bezeichnet wird. 1997 konnte der DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF), der Komplex aus DFF40 und seinem spezifischen Inhibitor und Chaperon DFF45, aus dem Zytoplasma humaner HeLa-Zellen isoliert werden (Liu *et al.*, 1997). Ein Jahr später, nachdem in dem homologen Maus-Komplex CAD/ICAD-L CAD als nukleolytisch aktive Komponente identifiziert wurde (Sakahira *et al.*, 1998), konnte auch DFF40 kloniert und als Nuklease nachgewiesen werden (Halenbeck *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1998, Mukae *et al.*, 1998).

1.6.1 Die apoptotische Nuklease DFF40 (CAD)

Die apoptotische Nuklease CAD wurde bisher aus den Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *T. ruperipes*, *O. latipes* und *A. gambiae* identifiziert. Das Drosophila-Homolog ist mit 52 kDa größer als die Vertreter der anderen Spezies mit ca. 40 kDa und unterscheidet sich auch noch durch das Vorhandensein einer Caspase-Erkennungssequenz in der Mitte der Aminosäuresequenz, die der Caspase-3-Spaltung zugänglich ist (Yokohama *et al.*, 2000). Humanes DFF40 bzw. murines CAD spaltet Chromatin erst in 50 - 300 kB große Fragmente und zeigt anschließend eine

außergewöhnliche Präferenz für internukleosomale DNA-Spaltung. Enzymatische Eigenschaften von CAD sind die spezifische Spaltung von dsDNA, hauptsächlich ohne Erzeugung von Überhängen in Gegenwart von Mg^{2+} bei neutralem pH-Wert, die Präferenzen für A/T reiche Sequenzen und das Erzeugen einer 3'OH- und einer 5'Phosphat-Gruppe (Widlak *et al.*, 2000). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen strukturelle Informationen nur über die regulatorische N-terminale CAD- oder CIDE-N-Domäne von CAD (DFF40) vor, die für die Interaktion mit ICAD zuständig ist (McCarty *et al.*, 1999A, 1999B, Otomo *et al.*, 2000). Dort befinden sich auch die konservierten Lysinreste Lys12, Lys21 und Lys35, die an der Interaktion zu der N-terminalen Domäne von DFF45 beiligt sind (Inohara *et al.*, 1999, Otomo *et al.*, 2000). Der Aufbau des aktiven Zentrums mit den katalytisch relevanten Aminosäuren war ebenso unklar wie eine Zuordnung des Enzyms zu einer Enzymfamilie. Diese Arbeit hat Teil an der Entwicklung eines Modells des aktiven Zentrums von CAD (DFF40), dem $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv, der Identifizierung von katalytisch essentiellen Aminosäureresten, der Klärung des Mechanismus der DNA-Spaltung und an einer Zuordnung dieser bedeutsamen apoptotischen Nuklease zu der Familie der $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Nukleasen. In dem Mechanismus der Substratspaltung fungiert His263 als allgemeine Base, die dem Wasser ein Proton für den nukleophilen Angriff abstrahiert, His308 und Asp262 koordinieren das Metallion, aus dessen äußerer Hydrathülle vermutlich ein Wasser als allgemeine Säure die Abgangsgruppe protoniert, und die Reste Asn260 und Asn299 stabilisieren die Konformation des aktiven Zentrums (Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002, Scholz *et al.*, 2003). Die kürzlich gelöste Kristallstruktur bestätigt den im Modell vorgeschlagenen Aufbau des aktiven Zentrums mit den katalytisch relevanten Aminosäuren weitestgehend (s. **Abb. 3-10**, **3.3.6.2**, S. 51 f.). Diese Kristallstruktur zeigt CAD als Dimer mit den geordneten Aminosäureresten 86 - 328 der Monomere, die die beiden Domänen C2 und C3 bilden (Woo *et al.*, 2004). Die Struktur der regulatorischen N-terminalen CAD- oder CIDE-N-Domäne (Aminosäuren 1 - 85) konnte interessanterweise nicht ermittelt werden (Woo *et al.*, 2004). Ebenfalls nicht zu erkennen ist das C-terminale Kernlokalisierungssignal der Nuklease, das bei der Klonierung deletiert wurde. Die Domäne C2 besteht aus drei Helices α_1 , α_2 und α_3 (s. **Abb. 1-2**), umfaßt 45 Aminosäurereste (86 - 131) und dient der Dimerisierung. Die C-terminale Domäne C3 (Aminosäurereste 132 - 328) ist wesentlich größer als die vorherigen und beinhaltet das aktive Zentrum sowie die Reste His242, Cys229, Cys238 und Cys307, die das für die Dimerisierung wichtige Zn^{2+} -Ion koordinieren (s. **Abb. 1-2**). Das Dimer zeigt das aktive Zentrum der Nuklease, das $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv, am Boden eines tiefen Spalts, der von zwei α_4 -Helices gebildet wird (s. **Abb. 1-2**). Dieser Aufbau, der an die Klingen einer Schere erinnert, ermöglicht dem Enzym die Un-

terscheidung zwischen kompakter DNA und den zu spaltenden Linker-Regionen (s. **Abb. 1-2**; Woo *et al.*, 2004).

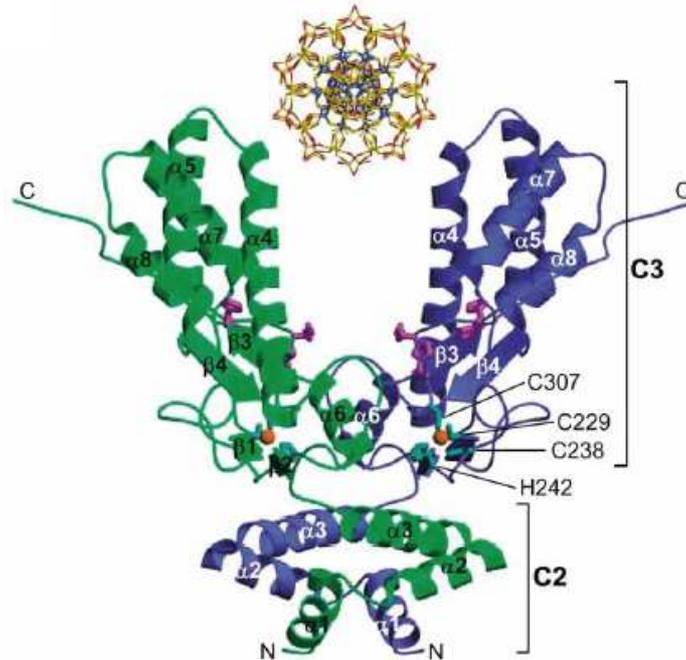


Abb. 1-2: Kristallstruktur von CAD (aus Woo *et al.*, 2004)

Die Struktur zeigt die aktivierte DNase CAD als Dimer mit den Aminosäureresten 86 - 328 der Monomere. Die Domäne C2 mit den drei Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ ist eine wichtige Dimerisierungsdomäne. Die Domäne C3 enthält das aktive Zentrum, das $\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv, am Boden eines tiefen Spaltes, der durch zwei $\alpha 4$ -Helices gebildet wird. Die katalytisch relevanten Reste sind in purpur gekennzeichnet. Außerdem ist in orange das für die Dimerisierung wichtige Zn^{2+} -Ion zu erkennen. Die Koordination dieses Metallions durch die Reste His242, Cys229, Cys238 und Cys307 hält die Faltblätter $\beta 1$, $\beta 2$ und den Anfang des C-terminalen Loops im Dimerisierungsinterface der Nuklease zusammen. Die regulatorische N-terminale CAD- oder CIDE-N-Domäne konnte nicht kristallisiert werden. Zu erkennen ist die DNA, die zur Spaltung die an der Katalyse beteiligten Reste erreichen muß. Die Scherenstruktur ermöglicht der Nuklease die Unterscheidung zwischen Linker-Regionen und kompakten DNA-Strukturen (Woo *et al.*, 2004).

Die Struktur des CAD-Dimers ermöglicht die Modellierung des Substrat-Enzym-Komplexes (s. **Abb. 1-3** nach Woo *et al.*, 2004, Korn, Scholz *et al.*, 2005). So offenbaren sich Regionen der Nuklease für potentielle Interaktionen mit dem DNA-Substrat. Die erwähnte Helix- $\alpha 4$ paßt in die große Furche der DNA (Woo *et al.*, 2004) und das $\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv des aktiven Zentrums ist in einer guten Position für Interaktionen zu der kleinen Furche der DNA, um dort Phosphodiesterbindungen anzugreifen (Korn, Scholz *et al.*, 2005).

Im Laufe dieser Arbeit wurde die DNA-Bindung von DFF untersucht. Der für eine unspezifische Nuklease ungewöhnliche Nachweis der Bindung des Substrats erfolgte sowohl in aktivierter Form für DFF40 (CAD) als auch für den DFF-Komplex. Letzteres wurde für diese

Klasse von Nukleasen bisher nicht gezeigt und weist auf einen Mechanismus der Inhibition hin, der DNA-Bindung erlaubt und -Spaltung verhindert. Darin unterscheidet sich DFF von anderen durch Proteine inhibierte Nukleasen (Korn, Scholz *et al.*, 2005).

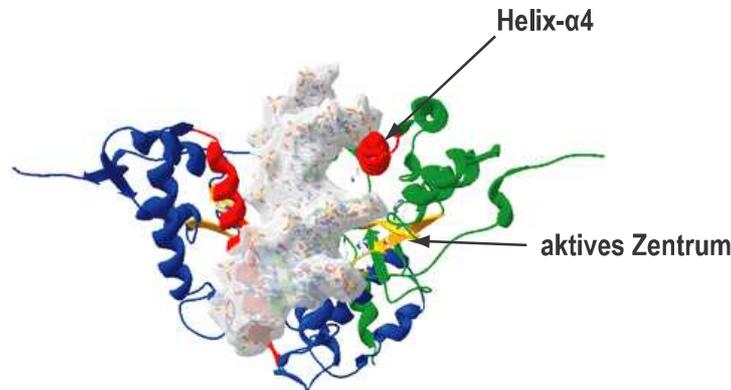


Abb. 1-3: Potentiell DNA-bindende Regionen in Caspase-aktivierter DNase (CAD)

In rot sind die beiden Helices- $\alpha 4$ der Monomere zu erkennen, über die DNA-Bindung erfolgen soll (Woo *et al.*, 2004). In gelb/gold ist die Struktur des $\beta\alpha$ -Me-Finger-Motivs des aktiven Zentrums dargestellt, über die Interaktionen zu der kleinen Furche möglich sind, wo die zu spaltende Phosphodiesterbindung attackiert wird. (Abb. modifiziert nach Woo *et al.*, 2004, Korn, Scholz *et al.*, 2005).

1.6.2 Die Isoformen DFF45 (ICAD-L) und DFF35 (ICAD-S)

DFF45 (ICAD-L) homologe Proteine wurden in *R. norvegicus* und *D. melanogaster* gefunden. Für humanes DFF45 bzw. murines ICAD-L wurden Funktionen als spezifischer Inhibitor und Chaperon von DFF40 bzw. CAD nachgewiesen. Die beiden orthologen, spezifischen Regulatoren der nukleolytischen Aktivität weisen jeweils 331 Aminosäurereste auf (s. Abb. 1-4). In vielen Geweben mit Caspase-3 abhängiger nukleolytischer Aktivität wurde die kürzere Splicevariante ICAD-S (DFF35) als einzige Isoform gefunden (Chen *et al.*, 2000, Masuoka *et al.*, 2001), die 265 (268) Aminosäuren umfaßt (s. Abb. 1-4; Enari *et al.*, 1998). Eine chaperone Funktion konnte für ICAD-S (DFF35) bis zu Beginn dieser Arbeit aber nicht nachgewiesen werden (Sakahira *et al.*, 1998, Sakahira *et al.*, 1999, Gu *et al.*, 1999, Sakahira *et al.*, 2000). Gefunden wurde *in vitro* für DFF35 (ICAD-S) eine Funktion als wirksamer Inhibitor von DFF40 (CAD) (Gu *et al.*, 1999, Sakahira *et al.*, 2001). Der als CIDE-N- oder CAD-Domäne bezeichnete N-Terminus der ICAD-Isoformen (1 - 117) ist für die Wechselwirkung zu der homologen N-terminalen Domäne (1 - 85) von DFF40 (CAD) verantwortlich (Inohara *et al.*, 1998). Essentiell für die Bindung an CAD sind die Aspartatreste Asp66, Asp71, Asp72, Asp73 und Asp74 in ICAD. Werden mindestens drei von ihnen gegen Alanin ausgetauscht, so ist die Bindung an CAD drastisch reduziert. Eine Einteilung von DFF45 (ICAD-L) in die drei Domänen D1, D2 und D3 ergibt sich aus den Fragmenten, die durch Spaltung mit Caspase-3 oder -7 (McIlroy *et al.*, 1999, Wolf *et al.*, 1999) an den Positionen 117

und 224 (Liu *et al.*, 1997, Sakahira *et al.*, 1998) entstehen. Beide Isoformen inaktivieren die Nuklease, indem sie die Dimerisierung von DFF40 (CAD) verhindern (Woo *et al.*, 2004). Nachgewiesen wurde die besondere Wichtigkeit der Domäne D2 für die inhibitorische Funktion von ICAD-L. Isoliert sind alle drei Domänen aufgrund einer zu schwachen Affinität ($K_d = 6 - 18 \mu\text{M}$) nicht in der Lage, an die Nuklease zu binden (McCarthy *et al.*, 1999A, Ootomo *et al.*, 2000, Uegaki *et al.*, 2000). Die Kombinationen D1/D2 und D2/D3 binden an die Nuklease und inhibieren sie wirkungsvoll (Woo *et al.*, 2004).

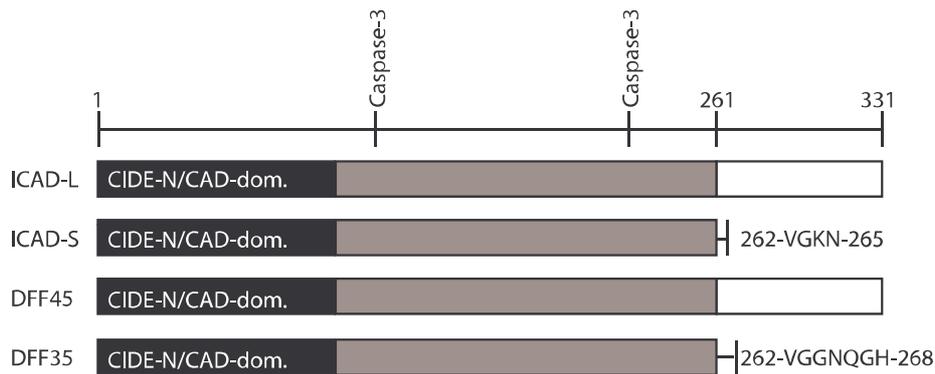


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der beiden Isoformen DFF45/DFF35 bzw. ICAD-L/ICAD-S DFF45, der spezifische Inhibitor und Chaperon von DFF40, umfaßt 331 Aminosäuren. Die kürzere Spleißvariante DFF35, deren Inhibitorfunktion vor Beginn dieser Arbeit nachgewiesen wurde, endet an Position 268. An die Stelle des C-Terminus von DFF45 treten ab Position 262 die Reste VGGNQGH. In den orthologen Proteinen der Maus treten anstelle der Reste 262 -331 von ICAD-L die Reste VGKN in ICAD-S.

1.6.3 Regulation von DFF/DFF40 (CAD)

Wird DFF40 (CAD) *in vivo* in Abwesenheit von ICAD-L (DFF45) exprimiert, aggregiert es im Cytosol der Zelle (Nagata, 1999). Nur in Anwesenheit oder bei Koexpression von ICAD-L wird eine funktionelle CAD-Nuklease gebildet (Enari *et al.*, 1998, Sakahira *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang ist die co-translationale Bindung der beiden homologen N-terminalen, als CAD oder CIDE-N bezeichneten Domänen von DFF40 (CAD) und DFF45 (ICAD-L) für die Bildung des DFF-Komplex wichtig, bei dem DFF40 (CAD) durch DFF45 korrekt gefaltet wird und damit seine Funktion erhält (Inohara *et al.*, 1998, McCarthy *et al.*, 1999 (A), 1999 (B), Sakahira *et al.*, 2002). Bei der Translation von CAD (DFF40) unterstützen die generellen Chaperone Hsp70 und Hsp40 die Bildung des funktionellen Heterodimers CAD/ICAD-L (Sakahira und Nagata, 2002). Beide Untereinheiten besitzen ein C-terminales Kernlokalisations-signal (Samejima und Earnshaw, 1998, 2000, Lechardeur *et al.*, 2000) und DFF40 (CAD) und DFF45 (ICAD-L) sind im Zellkern lokalisiert (Liu *et al.*, 1998, Samejima und Earnshaw, 1998, 2000, Lechardeur *et al.*, 2000). Über die Lokalisation von DFF gibt es widersprüchliche

Angaben: die Proteine werden auch cytosolisch gesehen. Möglicherweise sind die Unterschiede Zelltyp-bedingt. Die Aktivierung von Caspase-3 oder -7 während der Apoptose führt zur Spaltung von DFF45 (ICAD-L) und DFF35 (ICAD-S) mit Freisetzung der Nuklease, die Homo-Oligomere bildet (Liu *et al.*, 1999, Widlak *et al.*, 2003, Woo *et al.*, 2004). Chromosomale Proteine wie Histon H1, *high mobility group protein* (HMG-1, HMG-2) und Topoisomerase II α können an CAD binden und ihre Aktivität stimulieren (Liu *et al.*, 1998, 1999, Durrieu *et al.*, 2000). CIDE (*cell death inducing DFF like effector*)-Proteine, die homologe N-Termini zu DFF40 (CAD) und (ICAD) aufweisen (Inohara *et al.*, 1998), können Apoptose bei vorhandener Inhibierung durch DFF45 (ICAD-L) aktivieren (Inohara *et al.*, 1998). Granzym B ist ebenfalls in der Lage, DFF zu aktivieren (Thomas *et al.*, 2000, Sharif-Askari *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit *in vitro* gefundene DNA-Bindung von DFF und die damit verbundene Aktivitätserhöhung von CAD (DFF40) bei Freisetzung aus DFF in DNA-gebundener Form suggerieren zusammen mit der *in situ* dargestellten DNA-Bindung von DFF die Aktivierung von DFF in DNA-gebundener Form in apoptotischen Zellen (Korn, Scholz *et al.*, 2005). Obwohl sich DFF in *photo-bleaching*-Experimenten wie frei bewegliche Proteine verhält, wird eine transiente Bindung von DFF an Chromatin nicht ausgeschlossen (Lechardeur *et al.*, 2004). Ein gefundener hoher Überschuss an DFF45 (ICAD-L) im Zellkern und DFF35 (ICAD-S) im Zytoplasma verschiedener Zelllinien (Widlak und Garrard, 2005) und die Fähigkeit dieser Proteine aktivierten DFF40 (CAD) zu inhibieren (Widlak *et al.*, 2003) weisen auf einen Sicherheitsmechanismus für den Fall einer ungewollten Aktivierung von DFF hin (Widlak und Garrard, 2005).

Ein weiterer Sicherheitsmechanismus, um bei Apoptose benachbarte Zellen vor DFF40 (CAD) zu schützen, scheint die beobachtete Assoziation der aktivierten Nuklease an die Kernmatrix in späten apoptotischen Stadien zu sein (Lechardeur *et al.*, 2005). *Knockout*-Mäuse ohne DFF (CAD) -Aktivierung zeigen keinen signifikanten Phänotyp (Zhang *et al.*, 1998, McIlroy *et al.*, 2000). Die DNA apoptotischer Körperchen in diesen Tieren wird durch DNase II verdaut, die aus Lysosomen von Phagozyten stammt (McIlroy *et al.*, 2000). Unter vielen Bedingungen mit apoptotischen Stimuli ist die DNA-Fragmentierung in den Zellen der Tiere stark vermindert (Zhang *et al.*, 1999), unter einigen anderen bewirken apoptotische Stimuli dagegen internukleosomale DNA-Spaltung (Li *et al.*, 2001). Durch diese Beobachtungen wurde ein anderer Weg entdeckt, der zur Aktivierung einer weiteren apoptotischen Nuklease, EndoG, führt.

1.6.4 Chaperone Funktion der ICAD-Isoformen

ICAD-L (DFF45) stellt für CAD ein spezifisches Chaperon dar (McCarty *et al.*, 1999 (A), (B), Zhang *et al.*, 1998). Besondere Bedeutung für die chaperone Aktivität kommt dem C-Terminus von ICAD-L (DFF45) zu, der aus den vier Helices $\alpha 1$ (Aminosäurereste 239-247); $\alpha 2$ (257-265), $\alpha 3$ (268-275) und $\alpha 4$ (280-300) gebildet wird (s. **Abb. 1-5**; Fukushima *et al.*, 2002).

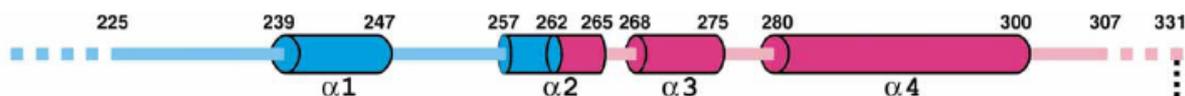


Abb. 1-5: Die C-terminalen Domänen von ICAD-L (in blau/magenta) und ICAD-S (in blau) (aus Fukushima *et al.*, 2002)

Der C-Terminus von ICAD-L umfaßt die Helices $\alpha 1$ - $\alpha 4$. Die kürzere Spleißvariante ICAD-S unterscheidet sich von ICAD-L ab dem Aminosäurerest an Position 262. Bei ICAD-S folgen noch die Reste 262-VGKN-265, die möglicherweise die Helix- $\alpha 2$ vervollständigen.

Die gelöste 3D-Struktur des C-Terminus offenbart eine lange C-terminale $\alpha 4$ -Helix, an die Helix- $\alpha 2$ und - $\alpha 3$ eng gepackt sind. Helix- $\alpha 1$ ragt aus dieser Struktur heraus (s. **Abb. 1-5**). Die Stabilisierung der Helix-Struktur erfolgt durch eine Anzahl hydrophober Interaktionen, an der hauptsächlich die Aminosäurereste Leu242 und Leu245 in Helix $\alpha 1$, Leu260 und Val263 aus Helix $\alpha 2$, Leu271 und Leu275 aus Helix $\alpha 3$, sowie Val285, Gln286, Cys289 und Leu293 aus Helix $\alpha 4$ beteiligt sind. Die positiv geladenen Aminosäurereste sind gleichmäßig verteilt, die negativ geladenen dagegen liegen nahe zusammen und bilden eine negativ geladene Oberfläche, über die möglicherweise eine Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne von CAD erfolgt.

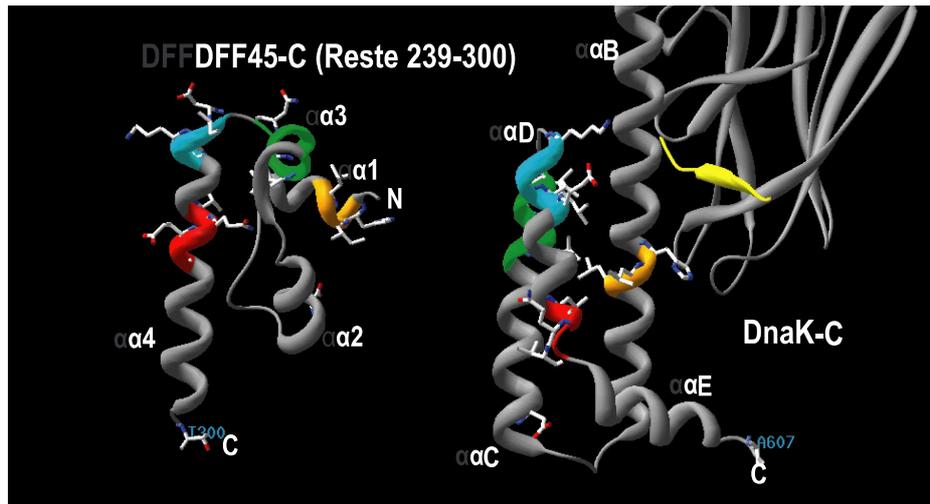


Abb. 1-6: Strukturvergleich der C-Termini von DnaK (nach Zhu *et al.*, 1996) **und DFF45** (nach Fukushima *et al.*, 2002)

Der Vergleich der C-Termini von DFF45 und DnaK offenbart eine ähnliche Struktur. Bereiche, die in DnaK-C und DFF45-C voll oder teilweise konservierte Aminosäurereste enthalten, sind in einer Farbe dargestellt. Das Substratpeptid, gebunden in der Substratbindestelle von DnaK ist in gelb dargestellt. Helix- αA ist nicht dargestellt.

Der C-Terminus von DnaK besteht aus den fünf α -Helices A, B, C, D und E, die zusammen eine kompakte Deckelstruktur bilden (s. **Abb. 1-6**; Slepnev *et al.*, 2003). Bei Bindung eines Substratpeptids verschließt dieser Deckel die Substratbindestelle. Helix D ist für die Bildung eines antiparallelen Bündels aus den Helices B, C und D wichtig. Diese Struktur stabilisiert den DnaK-Substrat-Komplex. Die Stabilisierung des Helix-Bündels wird durch einzelne Aminosäuren erreicht, wie z.B. Glu590 und Leu591, die Wechselwirkungen mit Helix B eingehen (s. **Abb. 1-6**). Ohne Substratbindung befindet sich der Aminosäurerest Leu543 aus Helix B in der hydrophoben Tasche der Bindestelle.

Der Mechanismus der Faltung von CAD durch ICAD ist bis zu diesem Zeitpunkt unklar. Der Vergleich der C-Termini von DnaK und DFF45 zeigt sowohl strukturelle Ähnlichkeiten (s. **Abb. 1-6**) als auch konservierte Aminosäurereste in den beiden Sequenzen. Vermutlich haben die Helices der C-terminalen Domäne von DFF45 ähnliche Funktionen wie die in DnaK und bilden auch eine Deckelstruktur aus. Bis zum Beginn dieser Arbeit konnte für ICAD-S (DFF35) keine chaperone Aktivität festgestellt werden. Aus der Kristallstruktur des C-Terminus von ICAD-L (DFF45) ist zu entnehmen, dass die Sequenz von ICAD-S in der Mitte der Helix- $\alpha 2$ endet und dadurch sowohl der hydrophobe Kern des C-Terminus zertrennt ist, als auch die negativ geladene Oberfläche nicht vorhanden ist (Fukushima *et al.*, 2002). In ICAD-S folgen die Aminosäuren $_{262}VGKN_{265}$ auf die letzte gemeinsame Aminosäure der beiden Isoformen, wodurch möglicherweise die Helix- $\alpha 2$ vervollständigt wird. Diese Struktur

wäre möglicherweise für eine chaperone Funktion ausreichend. In Abwesenheit einer dreidimensionalen Struktur des C-Terminus von ICAD-S konnten wir für diese Isoform in *E. coli* und in Säugerzellen sowohl Bindung an CAD als auch eine chaperone Aktivität zeigen, die allerdings ca. 50 mal schwächer als bei der Varianten ICAD-L ist. Zu vermuten ist für ICAD-L und ICAD-S eine gewebsspezifische Regulatorfunktion der CAD-Aktivität (Scholz *et al.*, 2002).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das erste Ziel war die Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung von rekombinanten DFF-Komplex. Als nächstes sollte das aktive Zentrum der Nuklease DFF40 (CAD) mittels Alignment-gestützter Mutagenestudien charakterisiert werden. Die Untersuchung der chaperonen Funktion von ICAD-S, der kürzeren Splice-Variante von ICAD, war ein weiteres wichtiges Thema. Hier ging es auch um den Aufbau eines geeigneten Expressionssystems, bei dem das Chaperon schon gebildet ist, bevor die Expression der Nuklease induziert wird. Der letzte Teil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der DNA-Bindung von DFF. Für einen Komplex einer unspezifischen Nuklease mit ihrem Inhibitor konnte dies bislang nicht gezeigt werden.

2 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden nur die für diese Arbeit typischen Methoden detailliert beschrieben. Gängige Standardverfahren wurden, sofern dies nicht anders vermerkt ist, nach den Ausführungen der Laborhandbücher *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989) und *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1987 - 1995) durchgeführt.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Die über den Laborstandard hinausgehenden, besonderen Geräte sowie deren Verwendungszweck und Hersteller werden im Folgenden gelistet.

Gerät	Verwendung	Hersteller
Äktabasic™ 10-HPLC-System	Anionenaustauschchromatographie	Amersham Bioscience
Autoklav	Sterilisation von Gebrauchsgegenständen	Tecnomara/Integra Biosciences
BioDocAnalyze	Geldokumentation und -auswertung	Biometra
Biosys™ 2000 Series-HPLC-System	Anionenaustauschchromatographie	Beckman
Brutschrank	<i>E. coli</i> -Kultivierung auf Festmedien	Mommsen
Dri-Block DB3	Reaktionsansatz-Inkubation	Techne
Elektroporator II	<i>E. coli</i> -Elektrotransformation	Invitrogen
Fermenter	<i>E. coli</i> -Kultivierung im 10 l Maßstab	Schott
GeneAmp PCR System 2400	DNA-Amplifikation	Perkin Elmer
Gyrotory-Rotationsschüttler G76	Großvolumige <i>E. coli</i> -Kultivierung (25 - 500 ml)	New Brunswick Scientific
HPLC-System: D-2500 Chromato-Integrator Gradientenpumpe LC Organizer Lichograph® L-4200 UV-Vis-Detektor Lichograph® L-6200A	Gelfiltration	Merck-Hitachi
Kombinationselektrode Typ N6280/pH-Meter 761	pH-Messung	Schott/Knick
MonoQ HR 5/5- und HR 10/10-Säulen	Anionenaustauschchromatographie	Pharmacia
Schüttelinkubator 1083	Kleinvolumige <i>E. coli</i> -Kultivierung (3 ml)	GFL Labortechnik
Seralpur PRO 90 CN-Reinstwasseranlage	Reinstwassergewinnung	Seral
Sonifier 250	<i>E. coli</i> -Zellaufschluß	Branson
Superdex®75HR	Gelfiltration	Pharmacia

10/30-Säule

T personal PCR-Maschine	DNA-Amplifikation	Biometra
Thermomixer	Reaktionsansatz-Inkubation	Eppendorf
U3000 Spectrophotometer	UV-Spektren-Messung	Hitachi

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

In der folgenden Liste werden alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien aufgeführt.

Chemikalie	Verwendung	Hersteller
Acrylamid	Gelelektrophorese	Applichem
Chaps	Detergenz	Applichem
Coomassie brilliant blau G250, R250	Proteinfärbung	Serva
DTT	Reduktion	Applichem
EDTA	Metallionenkomplexierung	Applichem
EGTA	Ca ²⁺ -Komplexierung	Roche
Glutathion reduziert	Proteinreinigung	Roche
Glutathion-Sepharose [®] -4B	Proteinreinigung	Pharmacia-Biotech
Guanidiniumchlorid	Proteindenaturierung	Fluka
Medien-Komponenten	<i>E. coli</i> -Kultivierung	Gibco-BRL
Mikrokonzentratoren	Proteinultrafiltration	Amicon
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Proteinreinigung	Qiagen
Nucleobond [®] AX Maxi-Prep Kits	DNA-Präparation	Macherey-Nagel
Oligodesoxyribonukleotide	PCR-Primer	MWG-Biotech AG, Interaktiva
Protease-Inhibitor Cocktail	Proteinreinigung	Roche
<i>QIAprep Spin Miniprep Kits</i>	DNA-Präparation	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification Kits</i>	DNA-Präparation	Qiagen
SDS	Proteindenaturierung	Serva
Tris	Puffer	Gibco-BRL
Triton-X 100	Detergenz	Merck
<i>Ultra-Pure™</i> Agarose	Gelelektrophorese	Gibco-BRL

Alle anderen Chemikalien und Biochemikalien wurden, sofern dies nicht im Verlaufe des Textes gesondert vermerkt ist, von der Firma Merck in der Qualität *pro analysi* bezogen.

2.1.2.1 Enzyme und Marker

Restriktionsendonukleasen und ihre zugehörigen Reaktionspuffer wurden von den Firmen AGS, Amersham Bioscience, Fermentas und New England Biolabs bezogen und nach deren Empfehlungen eingesetzt (s. 2.3.5.1). Weitere Enzyme und Marker sowie ihre Bezugsquellen werden im Folgenden genannt.

1kb DNA-Ladder	Fermentas
Caspase-3	eigenes Labor
DNase I	Fermentas
Page Ruler™ (10 - 200 kDa)	Fermentas
Proteinstandard IV	Merck
pTR54 * Hinfl	eigenes Labor
pUC Mix Marker 8	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas
Taq- und Pfu-DNA-Polymerase	eigenes Labor
Thrombin	Amersham Biosciences

2.2 Mikrobiologische Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter möglichst sterilen Bedingungen mit autoklavierten, keimfreien Geräten, Materialien und Lösungen an einer Sterilbank durchgeführt. Das Autoklavieren der Gebrauchsgegenstände erfolgte für 30 min bei einer Temperatur von 121 °C.

2.2.1 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen

TSS-kompetente (s. 2.2.4.1 u. 2.2.5.1) und elektroporierte (s. 2.2.5.2) *E. coli*-Zellen wurden mit LB-Medium (10.0 g Caseinhydrolysat, 5.0 g Hefeextrakt, 10.0 g NaCl, mit NaOH auf pH 7.5 einstellen, ad 1 l mit H₂O) und SOC-Medium (20.0 g Caseinhydrolysat, 5.0 g Hefeextrakt, 7.4 g NaCl, 2.0 g KCl, 3.6 g Glucose, 1.27 ml 40 % (w/v) Phytinsäure, pH 7.0 ad 1 l mit H₂O) angezüchtet.

2.2.2 *E. coli*-Stämme

In dieser Arbeit wurden die im Folgenden unter Angabe ihres Genotyps beschriebenen *E. coli*-Stämme zu Klonierungs- oder Expressionszwecken eingesetzt. Die Anzucht von Flüssigkulturen kleiner Volumina (3 ml) in Glasröhrchen und größerer Volumina (- 500 ml) in Kolben oder Schikanekolben erfolgte in Schüttelwasserbädern. Temperaturen von 28 und 37 °C wurden hierbei sowie zur Kultivierung von *E. coli* auf Platten mit Festmedium in Brut-schränken verwendet. Die Anzucht von Kulturen im 10 l Maßstab erfolgte in Fermentern bei 37 °C.

Stamm	Genotyp (Referenz)	Verwendung
-------	--------------------	------------

XL1BlueMRF'	$\Delta(\text{mcrA})183\Delta(\text{mcrBC-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1}$ sup- E44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac [F'proAB lacIqZ Δ M15Tn10(TetR)] (Stratagene)	Klonierung von Genen
BL21Gold(DE3)	(F- ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ TetR gal (DE3) EndA Hte) (Stratagene)	Expression T7 ϕ 10-Promo- tor-kontrollierter Gene
TGE900	[F-, su-1, ilv-1, bio(λ cIts857 Δ Bam Δ H1)] (Courtney <i>et al.</i> , 1984)	Expression λ PL- Promotor-kon- trollierter Gene

2.2.3 Plasmid-Vektoren

An dieser Stelle folgt eine Beschreibung der im Laufe dieser Arbeit zu Klonierungs- und Expressionszwecken verwendeten Vektoren. Expressionsexperimente mit diesen Plasmiden werden an entsprechender Stelle im Ergebnisteil detailliert beschrieben (s. 3.).

pACET-DFF45

Zur Klonierung von DFF45 wurde pET15b-DFF45 (Meiss, unveröffentlicht) verwendet, der die über RT-PCR hergestellte cDNA von humanem DFF45 als NcoI/Sal-I-XhoI Fragment enthält. Eine Expressionskassette, bestehend aus T7-Promotor, ribosomaler Bindungsstelle und offenem Leseraster des DFF45-Gens wurde aus den PaeI- und HindIII-*sites* dieses Vektors herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pMQ393 (Dr. Marinus) inseriert. Der entstandene Vektor pACET-DFF45 enthält somit die DFF45 cDNA unter Kontrolle des T7-Promotors, verleiht – wichtig aus Kompatibilitätsgründen zur Kotransformation von *E. coli* mit weiteren Vektoren - Chloramphenicolresistenz und hat einen Replikationsursprung für niedrige Plasmidkopienzahlen (pA15 ori).

pLK-His-DFF45

Auch dieses Plasmid hat den pA15 ori, aber im Gegensatz zu pACET-DFF45 verleiht es Kanamycinresistenz und enthält die cDNA für humanes DFF45 unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren λ P_L-Promotors (G. Meiss, unveröffentlicht).

pLK-HisFlag-ICAD-S entstand durch Ersetzen der cDNA von DFF45 im Vektor pLK-His-DFF45 mit der cDNA von murinem ICAD-S. Zusätzlich zu einer für einen N-terminalen His-tag codierenden Sequenz enthält das eingesetzte Fragment 5'-terminal auch eine für einen N-terminalen Flag-tag codierende Sequenz.

pET-DUET-His-CAD und pACYC-DUET-HisCAD

Ein aus murinem CAD und der für einen N-terminalen His-Tag codierenden Sequenz bestehendes PCR-Produkt wurde zunächst in den Vektor pACYC-DUET-1 (Novagen) inseriert und anschließend aus dem resultierenden Vektor pACYC-DUET-His-CAD durch Restriktionsspaltung mit NcoI und NotI in den gleichartig gespaltenen Vektor pET-DUET-1 (Novagen) inseriert. In beiden Vektoren befindet sich die CAD cDNA unter Kontrolle eines der beiden T7-Promotoren dieser Plasmide. pET-Duet-1 verfügt über einen ColE1 ori und codiert unter anderem für die β -Lactamase, verleiht somit Ampicillinresistenz, während pACYC-Duet-1 einen pA15 ori trägt und Chloramphenicolresistenz verleiht.

pGEX2T-CADWT

Dieses Konstrukt (Meiss *et al.*, 2001) diente in der vorliegenden Arbeit der Expression von GST-fusioniertem, murinem CAD-Wildtyp (GST-CADWT). Es entstand durch einsetzen eines BglIII und EcoRI gespaltenen PCR-Produktes in den BamHI und EcoRI gespaltenen Expressionsvektor pGEX-2T (Amersham Biosciences). In diesem Vektor steht GST-CADWT unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Der Vektor codiert außerdem für einen konstitutiv exprimierten *lac*-Repressor und verleiht Ampicillinresistenz.

pGEX2T-CAD*Mutante*

CAD-Mutanten wurden durch ortsgerichtete Mutagenese mittels der PCR nach einem Protokoll von Kirsch und Joly (1998), hergestellt (s. 2.4.3). Als Template diente das Plasmid pGEX2T-CADWT (s. o.).

Außerdem wurde **pBSVDEX** (NEB) mit einer Größe von 3702 bp für DNA-Bindungs- und Aktivitätsstudien von DFF verwendet (s. 2.6.5, 6 u. 9).

2.2.4 Bereitung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für eine effiziente Transformation von Zellen mit DNA müssen natürlicherweise nicht-kompetente *E. coli*-Zellen für DNA aufnahmefähig gemacht werden.

2.2.4.1 Bereitung TSS-kompetenter *E. coli*-Zellen

Eines der in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren geht auf die TSS-Methode (*Transformation Storage Solution*) zurück (Chung *et al.*, 1989). Diese Methode zeichnet sich durch eine einfache Handhabung, eine hohe Transformationseffizienz und eine lange Lagermöglichkeit ohne Kompetenzverlust aus (- 3 Monate).

1. Inkubieren einer 25-ml-Vorkultur ü.N. bei 37 °C im Schüttelwasserbad.

2. 1 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 0.5 OD_{600 nm} (frühe logarithmische Phase) anziehen.
 3. Abzentrifugieren dieser Zellen für 10 min bei 3500 rpm (3480 × g) und 4 °C (Beckmann 36 HC, Ty-3s-4.2 Rotor) und anschließend auf Eis lagern.
 4. Das Zellpellet in 0.1 Vol (des ursprünglichen Kulturvolumens) eiskaltem TSS (LB-Vollmedium mit 10 % (w/v) PEG 3300 oder PEG 8000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM Mg²⁺ (MgCl₂ oder MgSO₄), pH 6.0 - 6.5) resuspendieren.
 5. Die nicht sofort benötigten 200-µl-Aliquots bei -196 °C in flüssigem Stickstoff schockfrieren und anschließend bei -70 °C lagern. TSS wird autoklaviert und bei 4 °C gelagert.
- Derartig behandelte Zellen sind sofort kompetent und können zur Transformation eingesetzt werden. Die hier verwendeten Stämme behalten auf diese Weise für 2 – 3 Monate ihre Kompetenz.

2.2.5 Transformation von *E. coli*

2.2.5.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen

1. 10 ng - 2 µg Plasmid in gelöster Form zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot (200 µl) TSS-kompetenter Zellen geben und für 30 min bei 0 °C inkubieren.
2. Zellen einem dreiminütigen Hitzeschock (40 sec. bei BL21Gold(DE3)) bei 42 °C aussetzen und dann auf Eis abkühlen.
3. Den Transformationsansatz mit 800 µl sterilem LB-Vollmedium (900 µl sterilem SOC-Medium bei BL21GoldDE-3) versetzen und 60 min bei 37 °C inkubieren.
4. Die Zellen abzentrifugieren (Tischzentrifuge Sorvall MC 12 V, Rotor F-12 M.18, 12 000 rpm, 2 min, 4 °C) und das überstehende Medium dekantieren. In dem verbleibenden Rest (in den üblicherweise verwendeten Eppendorfreaktionsgefäßen ca. 100 µl) das Zellpellet vorsichtig resuspendieren.
5. Die Zellsuspension auf einer Selektivplatte ausstreichen und ü.N. bei 37 °C inkubieren.

2.2.5.2 Elektrotransformation

Auch hier muss wie schon bei der Präparation elektrokompetenter Zellen sehr sorgfältig auf die Kühlung aller benötigten Substanzen und Reaktionsgefäße geachtet sowie mit salzfreien DNA-Lösungen gearbeitet werden.

1. Ein 80-µl-Aliquot elektrokompetenter Zellen unmittelbar vor Gebrauch auf Eis auftauen und mit vorgekühlter salz- und proteinfreier, in Wasser oder TE gelöster DNA (1 - 2 µl maximales Volumen, 1 - 200 ng oc- oder cccDNA bzw. 10 pg - 10 ng scDNA) mischen.

2. Das Gemisch in eine Elektroporationsküvette überführen und diese verschließen. Bei einer maximalen Kapazität von 50 μF , einem Widerstand von 150 Ω , einer vorgelegten Hochspannung von 1500 V, einer Stromstärke von 25 mA und maximal 25 W Leistung werden die Zellen im Elektroporator kurzzeitig dem angelegten elektrischen Feld ausgesetzt und dabei transformiert.
3. Den Ansatz in 1 ml SOC-Medium aufnehmen und 1 h bei 37 °C inkubieren.
4. Die Zellen pelletieren, im restlichen Medium resuspendieren, auf einer Selektivplatte ausplattieren und ü. N. bei 37 °C inkubieren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Agarosegelelektrophorese

2.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von DNA aus PCR-Ansätzen, Restriktionsspaltungen etc. erfolgte nach Zugabe von 0.2 Vol Auftragspuffer (250 mM EDTA, 0.2 % SDS (w/v), 25 % Saccharose (w/v), 0.1 % Bromphenolblau (w/v)) durch horizontale Elektrophorese in 0.5 – 0.8%igen Agarosegelen in TBE- (TBE: 100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) oder TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 8.0) bei maximal 10 V/cm und RT. Nach erfolgtem Lauf wurden die Gele in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt und anschließend gewässert. Die DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator in einer Anlage zur Geldokumentation und -auswertung (Biometra) durch Anregung im UV-Bereich sichtbar gemacht. Das integrierte Videosystem mit angeschlossenem Thermoprinter sorgte für die Dokumentation der Gele als Ausdruck oder Datenfiles.

2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.3.2.1 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Shifts von PCR-Produkten, PCR-Produkte oder kürzere Restriktionsfragmente wurden durch Elektrophorese auf 6 - 8%igen (Acrylamid : Bisacrylamid/29 : 1), 10 × 10 × 0.1 cm großen, nativen TPE (80 mM Tris-Phosphat, 2 mM EDTA, pH 8.0) -Gelen bei einer Stromstärke von 45 mA analysiert. Nach erfolgtem Lauf wurden die Gele wie beschrieben (s. 2.3.1.1) ausgewertet.

2.3.3 Plasmid-DNA-Isolation

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und sind Modifikationen des Verfahrens der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly (1979).

2.3.3.1 Plasmid-Präparationen im Kleinmaßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA im Kleinmaßstab (*Plasmid-Mini-Präparation*), z. B. zur Überprüfung neuer Konstrukte durch Restriktionsspaltungen oder danach zur Genexpression, erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Hierbei wurden je nach Art der verwendeten Plasmide (s. 2.2.3) und Bakterienstämme (s. 2.2.2) Ausbeuten zwischen 2 - 20 µg Plasmid-DNA aus 3 ml-Zellkultur erreicht.

2.3.3.2 Plasmid-Präparationen im Großmaßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA im Großmaßstab (*Plasmid-Maxi-Präparation*) erfolgte mit dem *QIAprep Spin Maxiprep Kit*. Hierbei wurden je nach Art der verwendeten Plasmide (s. 2.2.3) und Bakterienstämme (s. 2.2.2) Ausbeuten zwischen 200 – 800 µg Plasmid-DNA aus 500 ml Kulturvolumen erreicht.

2.3.4 DNA-Konzentrations-Bestimmung

Die Konzentration von DNA in einer Lösung wird durch eine Messung der optischen Dichte (Lichtabsorption) bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Aufnahme eines Spektrums im Wellenlängenbereich zwischen 320 nm und 220 nm bestimmt. Ausgehend davon, dass $1 E^{260 \text{ nm}} 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$ entsprechen, kann die DNA-Konzentration ermittelt werden.

Bei DNA-Präparationen kann der Reinheitsgrad der isolierten DNA über das Verhältnis der gemessenen Extinktionen bei 260 nm und 280 nm, $E^{260 \text{ nm}}/E^{280 \text{ nm}}$, das idealerweise zwischen 1.6 und 1.8 liegen sollte, bestimmt werden. Kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, größere (> 1.8) auf RNA in der Lösung.

2.3.5 DNA-Modifizierung

2.3.5.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten in Klonierungsexperimenten, die mit Hilfe der *Vector NTI software* (InforMax) geplant wurden, oder für DNA-Shift-Assays (s. 2.6.9.1) erfolgte teilweise durch Restriktionsspaltungen. Die dafür benötigten Restriktionsenzyme wurden gemäß den Angaben der Hersteller in den mitgelieferten 10×Puffern eingesetzt. Für analytische

Spaltungen wurden 0.1 - 0.5 µg DNA mit ca. 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym bei 37 °C für 1 h in einem Volumen von 10 µl inkubiert. Präparative Spaltungen erfolgten mit 5 - 10 µg DNA und 20 - 40 U eines Restriktionsenzym bei einer Inkubationszeit von maximal 2.5 h bei 37 °C in einem Volumen von 30 - 60 µl. Zur Verwendung in darauffolgenden enzymatischen Reaktionen wurden präparative Spaltansätze mittels *QIAquick Spin PCR Purification Columns* nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Durch Zugabe von 0.2 Vol Auftragspuffer (250 mM EDTA, 0.2 % SDS (w/v), 25 % Saccharose (w/v), 0.1 % Bromphenolblau (w/v), 0.1 % Xylencyanol FF (w/v)) können die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert oder präparativ getrennt werden.

2.3.5.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

DNA-Ligationsreaktionen wurden mit Hilfe der DNA-Ligase des T4 Phagen durchgeführt. Die Effizienz von Ligationsreaktionen hängt entscheidend von der Konzentration, dem molaren Verhältnis der Reaktionspartner sowie der Reaktionstemperatur ab. Die hier beschriebene Reaktionsbedingung wurde für gerichtete Ligationen verwendet, bei denen die durch zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen generierten Enden (mindestens ein überhängendes) eines Fragments definiert in entsprechend geöffnete Vektoren ligiert werden.

Ligationsansatz:

Ca. 0.4 - 1 kb große Fragmente mit überhängenden Enden (3-facher molarer Überschuß zu Vektor-DNA).

Vektor-DNA mit einer Größe von ca. 2.5 - 5.5 kb (50 - 100 ng).

2 Weiss-U T4 DNA-Ligase bei einer Temperatur von 15 °C für 12 h in einem Volumen von 70 µl in Ligasepuffer.

Ligationsprodukte, die für Elektro- oder TSS-Transformation von *E. coli* bestimmt waren, wurden entweder in Anwesenheit von 1 µg Glykogen als Fällungshilfe ethanolpräzipitiert und anschließend in 10 µl H₂O aufgenommen oder über PCR-Säulchen gereinigt.

2.3.6 Oligonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide wurden HPLC-gereinigt geliefert und als Primer in der PCR in einer Endkonzentration von 0.3 µM eingesetzt (s. 2.4.1). Auch DNA-Shift-Assays (s. 2.6.9.1) wurden mit diesen kurzen DNA-Fragmenten durchgeführt.

2.4 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in dieser Arbeit auf vielfältige Weise eingesetzt. Dazu gehörte die Klonierung von Genen, die *in vitro*-Mutagenese klonierter Gene durch inverse PCR, aber auch das *Screening* nach positiven Klonen eines klonierten Gens oder eines Mutageneseansatzes. Als exemplarische Publikationen für Standardprotokolle, die verschiedensten PCR-Varianten sowie ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten seien Ausubel *et al.* (1987-1995), McPherson *et al.* (1995), Boehringer Mannheim (1995) und Mullis *et al.* (1994) genannt.

2.4.1 PCR-Standardbedingungen

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten z. B. zur Generierung von Inserts oder linearisierten Vektoren in Klonierungen oder zur Überprüfung von klonierten Genen (Screening) wurden im Wesentlichen PCR-Ansätze folgender Art bereitet:

PCR-Standard-Ansatz:

100 ng Plasmid DNA als Template

0.1 Vol 10×Puffer

1.5 mM MgCl₂

200 µM eines jeden dNTP's

0.3 µM Primer 1

0.3 µM Primer 2

0.05 U/µl *Taq* DNA-Polymerase

30 - 50 µl Endvolumen

Standardprozeßbedingungen, die vor allem in Abhängigkeit von der für ein spezifisches Primerpaar optimalen *annealing*-Temperatur variiert wurden, waren:

PCR-Standard-Prozeßbedingungen:

1. Einmalige Denaturierung: 1 × (94 - 98 °C für 2 - 5 min).
2. Mehrmalige Denaturierung, Hybridisierung und Primerextension: 20 - 35 × (94 -98 °C für 15 sec - 1 min, 50 - 68 °C für 30 sec - 1 min, 72 °C für 30 sec - 1 min).
3. Einmalige Extension: 1 × (72 °C für 2 - 7 min), danach Abkühlung auf 4 °C.

Die *annealing*-Temperatur (T_M-Wert) für Primerpaare wurde nach dem GC- bzw. AT-Gehalt der jeweiligen Primersequenzen ermittelt (Wallace *et al.*, 1979):

$$T_M = [(G+C) \times 4 \text{ °C} + (A+T) \times 2 \text{ °C}].$$

2.4.2 Design von PCR-Primern

PCR-Primer wurden mit Hilfe des Programmes Vector NTI (Informax) ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass

1. PCR-Primer keine selbstkomplementären Bereiche aufweisen.
2. keine weiteren oder nur stark degenerierte zusätzliche Primerbindungsstellen auf dem Template vorhanden sind.
3. keine stabilen *stem loop*- oder *hairpin*-Strukturen ausgebildet werden können.
4. keine Primerdimere über den 3'-terminalen Bereich gebildet werden können, die eine Verlängerung ermöglichen.
5. die Primer eines Primerpaares vergleichbar hohe T_M -Werte aufweisen.
6. der 3'-terminale Bereich eines Primers zur Spezifitätserhöhung eine geringere Stabilität aufweist als der übrige Sequenzbereich.

2.4.3 *In vitro*-Mutagenese mittels inverser PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die inverse PCR (Kirsch and Joly, 1998) zur Generierung von CAD-Mutanten eingesetzt. Über einen Primer wird in das Nukleasegen bei Amplifikation des gesamten Templates eine gewünschte Mutation eingeführt. Ein typischer Ansatz zur Amplifikation von Plasmiden bis zu einer Größe von ca. 6.0 kb mit *Pfu* DNA-Polymerase sei im Folgenden geschildert:

Ansatz für inverse PCR:

100 ng scPlasmid DNA als Template

0.1 Vol 10 × Puffer

2.25 mM MgCl₂

500 μM eines jeden dNTPs

0.3 μM Primer 1

0.3 μM Primer 2

0.2 U/μl *Taq* DNA-Polymerase

50 μl Endvolumen

Die Prozeßbedingungen für eine inverse-PCR sehen gegenüber Standardprotokollen vor allem längere Extensionszeiten vor, die zusätzlich mit einem Zeitinkrement versehen sein können. In dieser Arbeit wurden folgende Prozeßparameter gewählt:

Prozeßbedingungen zur Durchführung der inversen PCR:

1. Einmalige Denaturierung: 1 × 94 °C für 2 min.
2. Mehrmalige Denaturierung, Hybridisierung, Primerextension: 10 × (94 - 96 °C für 15 sec, 60 - 64 °C für 30 sec, 68 - 72 °C für 4 min).
3. Mehrmalige Denaturierung, Hybridisierung, Primerextension: 15 × (94 - 96 °C für 15 sec, 60 - 64 °C für 30 sec, 68 - 72 °C für 4 min, mit einem Inkrement von 20 sec pro Zyklus).
4. Einmalige Extension: 1 × 72 °C für 7 min.

Die linearen Amplifikate wurden mittels *QIAquick Spin PCR Purification Columns* gereinigt. DpnI wurde, da es methylierte dam-Erkennungsstellen (GmATC) mittig spaltet, zur Eliminierung von möglicherweise noch vorhandener, in den Bakterienzellen methylierter *template*-Plasmid-DNA verwendet. Nach Transformation des *E.coli*-Stammes XL1blue (s. 2.2.2) mit dem unmethylierten, linearen PCR-Produkt wurde dieses von der zelleigenen Ligase ligiert.

2.4.4 Screening nach positiven Klonen

Zur Überprüfung von Klonierungen wurde ein Screening nach positiven Klonen durchgeführt:

1. Von einzelnen Kolonien wurde mit einem Zahnstocher eine geringe Menge *E. coli* in ein Reaktionsgefäß überführt.

2. Nach kurzzeitiger thermischer Denaturierung der Zellen in 50 μl H_2O bei 95 °C wurden 4 μl der Zellsuspension in einer genspezifischen PCR (*colony PCR*) als Template eingesetzt.
3. Mit den als positiv identifizierten Klonen wurden Plasmid-DNA-Minipräparationen durchgeführt (s. 2.3.3.1), die mit einem für die Mutation spezifischen Markerenzym nochmals überprüft wurden.

Die so gewonnenen Plasmide wurden für Expressionstests (s. 2.5.2) verwendet, mit denen die Überexpression von klonierten Genen festzustellen ist. Ist dies der Fall, folgte zur Verifizierung der Mutation und zum Ausschluß von Sekundärmutationen die Gensequenzierung.

2.5 Proteinexpression und Reinigung

2.5.1 Eigenschaften der verwendeten Expressionssysteme

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Expressionssysteme und ihre charakteristischen Eigenschaften (Genotyp der Wirtszelle, Promotor, Kontrollelemente etc.) vorgestellt, mit denen auf definierte Art und Weise eine Überexpression von DFF in *E. coli* erreicht bzw. moduliert wurde.

2.5.1.1 Expression von Genen mit Hilfe des T7-Promotor-Systems

Die Induktion von Genen unter der Kontrolle des T7-Promotors, die indirekt durch den *lac*-Repressor reprimiert werden (Expressionskaskade der T7 ϕ 10-Promotor-Systeme; Studier, 1990) erfolgte nach Zugabe von IPTG in dem *E. coli*-Stamm BL21Gold(DE3) (s. 2.2.2). Diese Zellen sind lysogen für den DE3-Phagen und enthalten dadurch eine Kopie des T7A1-Gens, das für die T7 RNA-Polymerase codiert und seinerseits unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Gibt man zur Induktion eines Zielgens IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zu einer Kultur dieser Zellen, die zuvor mit pACET-DFF45 oder pACET-DFF45/pET-DUET-His-CAD (s. 2.2.3) transformiert wurde, wird zunächst die Expression des T7A1-Gens und daraufhin durch die gebildete T7 RNA-Polymerase erst ein oder beide Zielgene induziert.

2.5.1.2 Expression von Genen mit Hilfe des *tac*-Promotors

Bei diesem Promotor handelt es sich um ein Hybrid aus Teilen des starken Trp-Promotors und des *lac*-Promotors. In dieser Arbeit wurden GST-CAD^{WT} und GST-CAD^{Mutante} unter Kontrolle dieses ebenfalls durch IPTG induzierbaren Promotors mit pGEX2T-CAD^{Mutante} und pGEX2T-CAD^{WT} exprimiert.

2.5.1.3 Expression von Genen mit Hilfe der λP_L - und *tac*-Promotor-Systeme

TGE 900 enthält chromosomal integriert die temperatursensitive Mutante *cIts857* des λ -Repressors. Dies wurde zur Induktion einer λP_L -Promotor kontrollierten Genexpression mit den entsprechenden Plasmiden, pLK-His-DFF45 bzw pLK-His-Flag-ICAD-S, genutzt. Bei einem Temperaturshift von 28 °C auf 42 °C führt die hohe, nicht-permissive Temperatur zur Inaktivierung des Repressors, wodurch die Hemmung der Expression beseitigt wird. Nach Induktion des λP_L -Systems wurde in diesen Zellen die Expression eines Gens unter der Kontrolle des *tac*-Promotors mit dem entsprechenden Plasmid pGEX2T-CADWT induziert (s. 2.5.1.2).

2.5.2 Expression der Proteine im analytischen Maßstab

Zum Nachweis der Expression neu klonierter Gene wurden Expressionstests im 3-ml-Maßstab durchgeführt. Dabei wurde das LB-Kulturmedium mit einem Klon eines vorher transformierten Expressionsstammes von einer Platte angeimpft. Die Selektion dieser Zellen erfolgte durch Zugabe ein oder mehrerer Antibiotika, wobei Ampicillin in einer vergleichsweise hohen Konzentration von 175 - 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zur Verhinderung eines eventuellen Plasmidverlustes eingesetzt wurde. Die Kultur wurde üblicherweise bis zu einer Zelldichte von 0.5 - 0.6 OD⁶⁰⁰ nm (mittlere logarithmische Phase) angezogen.

Vor und nach geeigneter Induktion der Expression (s. 2.5.1.1 - 2.5.1.3) wurden je 500 μl Zellsuspension abgenommen und zentrifugiert. Von der Suspension des erhaltenen Zellpellets in 50 μl Laemmli-Auftragspuffer (160 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 20 % (w/v) Saccharose und 0.01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8) wurde anschließend ein Aliquot durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (s. 2.6.2).

2.5.3 Expression und Reinigung von Proteinen im präparativen Maßstab

Zur Expression bestimmte, ein bis vier 500 ml- oder 10 l *E. coli*-Flüssigkulturen, wurden mit einem Teil einer Vorkultur, die mit einem Klon von einer Platte angeimpft wurde und sich möglichst noch in der Wachstumsphase befand, angeimpft und zur benötigten OD⁶⁰⁰ (s. 2.6.2) angezogen. Die Expression wurde den verwendeten Expressionssystemen entsprechend induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation: 2500 \times g, 15 min, 4 °C), gewaschen (Resuspendieren in STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 8.0) und erneut zentrifugiert. Danach erfolgten 1. ein Ultraschallaufschluß (10 \times 20 sec/-500 ml Kultur, duty cycle 50 %, output level 5) der Zellen in einem für die weitere Verarbeitung ge-

eigneten Puffer (s. 2.5.4.1 u. 2.5.4.2) und 2. ein Zentrifugationsschritt zur Fraktionierung der löslichen und unlöslichen Komponenten dieser Suspension ($31\,400 \times g$, 60 min, 4 °C). Der lösliche DFF-Komplex wurde zur weiteren Verarbeitung nach dem Zentrifugationsschritt über Affinitätschromatographie (s. 2.5.4) gereinigt.

2.5.4 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitäts-Chromatographie

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mit einer His₆- oder GST-Fusion überexprimiert und konnten dadurch mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Mit dieser Methode erfolgte auch die Reinigung von Nuklease/Inhibitor-Komplexen (z. B. GST-CAD/DFF45), bei denen nur einer der Partner mit einem Affinitätstag versehen war.

2.5.4.1 Ni²⁺-NTA-Affinitäts-Chromatographie

In dieser Arbeit charakterisierte CAD (DFF40) -Nuklease liegt als N-terminales His₆-Fusionsprotein vor. Der hier verwendete Fusionsanteil aus sechs hintereinanderliegenden Histidinresten erlaubt eine affinitätschromatographische Reinigung von überexprimierten Proteinen an Ni²⁺-NTA-Agarose durch IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*). Hier wurde diese Affinitätsmatrix säulenchromatographisch, aber auch im *batch*-Verfahren eingesetzt. Die Reinigung wurde im Wesentlichen nach den Protokollen des Herstellers ausgeführt. Dabei wurden die Proteine, DFF, in 20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Imidazol, 1mM DTT und 2.5 mM MgCl₂ an die Säulenmatrix gebunden und gewaschen. Zu ihrer Elution wurde der gleiche Puffer, jedoch mit einer Imidazolkonzentration von 200 mM, eingesetzt. Nach der Elution wurden die Proteine zur Imidazolentfernung und Stabilisierung gegen 20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Chaps, 10 % Glycerin und 5 mM DTT dialysiert.

2.5.4.2 Glutathion-Sepharose-Affinitäts-Chromatographie

Einige Proteine wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine überexprimiert (GST-CADWT, GST-CADMutante). Die Fusion an GST ermöglicht eine affinitätschromatographische Reinigung der Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose. Dabei wurde diese Affinitätsmatrix säulenchromatographisch und im *batch*-Verfahren eingesetzt. Die Reinigung erfolgte im Wesentlichen nach den Protokollen des Herstellers mit 20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 % Glycerin, 5 mM DTT und 0.01 % Triton-X 100 als Binde- und Waschpuffer. Zur Proteinelution wurde der gleiche Puffer ohne Glycerin und mit 20 mM Glu-

tation (red.) verwendet. Zur Entfernung von Glutathion und zur Stabilisierung wurden die Proteinpräparationen gegen einen Puffer mit 20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 10 mM DTT und 0.01 % Triton-X 100 dialysiert.

2.5.5 Reinigung von DFF durch Anionenaustauschchromatographie

Kristallisationsstudien sowie die Durchführung einiger biochemischer Experimente, wie z. B. die Untersuchung der DNA-Bindung mit DNA-Shift-Assays (s. 2.6.9.1), sind nur mit einer sehr reinen, hoch konzentrierten DFF-Komplexpräparation durchzuführen. Um die angestrebte Reinheit zu erreichen, wurde nach der affinitätschromatographischen Reinigung des Komplexes (s. 2.5.4.1 u. 2.5.4.2) eine Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule durchgeführt. Dadurch konnten sowohl die zwei mit SDS-PAGE erkennbaren Proteinverunreinigungen, von denen eine wahrscheinlich DnaK (HSP 70) ist, als auch komplexgebundene *E. coli*-DNA beseitigt werden. Eine genaue Beschreibung dieser Methode findet sich im Ergebnisteil (s. 3.1.3.5).

2.5.6 Abspaltung des GST-tags durch Thrombin

DNA-Bindungsstudien wurden u. a. mit DFF-Komplex durchgeführt, bei dem der N-terminale GST-Fusionsanteil der Nuklease von affinitätschromatographisch gereinigtem GST-CAD/DFF45-Komplex (s. 3.3.3.3) durch Thrombin abgespalten wurde. Hierzu wurde der Komplex nach seiner Expression an Glutathion-Sepharose gebunden und gewaschen (s. 2.5.4.2). Nach dem Ersetzen des Waschpuffers durch 1 x PBS ($\text{Na}_3\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.7 mM KH_2PO_4 , pH 7.4, 137 mM NaCl 2.7 mM KCl) erfolgte die Inkubation mit Thrombin gemäß den Herstellerangaben (Eine U des Enzyms spaltet $\geq 90\%$ von 100 μg eines Test-GST-Fusionsproteins bei Inkubation in 1 x PBS bei 22 °C für 16 h). Die Protease spaltet zwischen Arg und Gly der Erkennungssequenz Leu-Val-Pro-Arg-↓-Gly-Ser. GST bleibt an den beads zurück; der Überstand mit CAD/DFF45 wurde gegen den geeigneten Puffer dialysiert (s. 2.5.4.1).

2.6 Proteincharakterisierungen

2.6.1 Gelfiltrationsanalysen

Zur Bestimmung des Oligomerenstatus von CAD und CAD-Varianten wurden analytische Gelfiltrationsläufe mit Hilfe einer Superdex™ 75-Säule an einer Merck-Hitachi HPLC-Anlage mit aktivierter DFF-Nuklease durchgeführt. 15 µg Protein wurden eingesetzt, bei 280 nm detektiert und die Eluate fraktioniert gesammelt. Die Größe der oligomeren Nuklease wurde anhand der Referenzproteine Cytochrom C, Carboanhydrase und Bluedextran ermittelt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Experimente folgt im Ergebnisteil (s. 3.3.4.4).

2.6.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele von 10 × 10 × 0.1 cm Größe eingesetzt (Laemmli, 1976). Es wurden 6 %-ige Sammelgele sowie Trenngele der Größe der interessierenden Proteine entsprechend in einer Konzentration von 12.5 % (Acrylamid:Bisacrylamid/29:1) benutzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die Proteinmischung Merck IV (12.4, 17.0, 30.0, 42.7, 66.3 und 77.8 kDa) sowie der 10 kDa Standard von Fermentas verwendet. Der Auftrag erfolgte nach Denaturierung mit Laemmli-Auftragspuffer, 160 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 40 % Glycerin und 0.1 % Bromphenolblau. Die getrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und einem System zur Geldokumentation und -auswertung zugeführt (s. 2.2.1). Proteine aus geringkonzentrierten Lösungen wurden vor dem Auftragen durch Zugabe von TCA (10 % Endkonzentration) gefällt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis und 30 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Das Proteinpellet wurde mit 5 µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt, die entstandene Gelbfärbung mit 1 M Tris bis zum Farbumschlag nach Blau titriert, und das resuspendierte Protein aufgetragen.

2.6.3 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Molare Extinktionskoeffizienten wurden nach Pace *et al.* (1995) mit Hilfe des Algorithmus

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

berechnet. Hierbei spielen der Tryptophangehalt, der Tyrosingehalt und die Anzahl der in einem Protein enthaltenen Disulfidbrücken (Cystinreste) eine Rolle.

2.6.4 Ultrafiltration

Einige Anwendungen, z. B. DNA-Shiftassays, gleichbedeutend mit EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*; s. 2.6.9.1), oder strukturelle Untersuchungen (s. 2.6.10), erforderten eine vorherige Konzentrierung von DFF. Dazu dienten Centricon (Probenvolumen - 2 ml) bzw. Centriplus (Probenvolumen 10 - 15 ml) -Konzentratoren der Ausschlußgröße 50 kDa, die durch Ultrafiltration gemäß Herstellerangaben im Retentat DFF mit einem Molekulargewicht von ca. 78 kDa konzentrierten. Für strukturelle Untersuchungen wurde DFF (His-CAD/DFF45) bis zu einer Konzentration von ca. 10 mg/ml konzentriert.

2.6.5 Nuklease-Aktivitätsassay

Durch Spaltung von sc-Plasmid-DNA wurde die enzymatische Aktivität von DFF40 (CAD) sowie von Nuklease-Mutanten nachgewiesen. Ein affinitätschromatographisch (s. 2.5.4.1 u. 2.5.4.2) oder zusätzlich HPLC gereinigter DFF-Komplex (s. 2.5.5) wurde mit Caspase-3 Δ 1-18 durch Spaltung von DFF45 an den Positionen Asp117 und Asp224 aktiviert. In einem Volumen von 20 μ l wurde 25 ng/ μ l Plasmid-DNA im Ansatz für 5 - 30 min bei 37 °C mit Enzymkonzentrationen von 10 nM - 1 μ M in einem Puffer mit 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 3.6 % Glycerin, 0.01 % Chaps, 5 mM MgCl₂ inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend gelelektrophoretisch mit 0.8 %-igen TBE-Agarosegelen (s. 2.3.1.1) auf Plasmidspaltung untersucht.

2.6.6 Aktivitätskinetiken

Zur Untersuchung der Aktivität von CAD-Varianten im Vergleich zur Wildtyp-Nuklease wurden Enzymkinetiken mit den Zeitwerten 1, 3, 9, 15 und 30 min durchgeführt. Die Ansätze waren wie für Aktivitätsassays beschrieben (s. 2.6.5) zusammengesetzt, die Ansatzgröße auf 30 μ l erhöht, jeweils 5 μ l entnommen, mit 5 x AAP versetzt und auf 0.8% -igen Agarosegelen aufgetragen (s. 2.3.1.1). Je nach Aktivität wurden die Enzymkonzentrationen angepasst, um die für die Berechnung der Aktivität benötigten Abnahme an scPlasmid-DNA verfolgen zu können. Die zur Aktivitätsberechnung verwendete Methode wird im Ergebnisteil beschrieben (s. 3.3.4.2).

2.6.7 Time-order-of-addition-Experimente

Bei diesen Experimenten wurde der Einfluß der Reihenfolge von DNA-Bindung und Caspase-3-Aktivierung von DFF auf die Aktivität der Nuklease untersucht. In einem ersten Ansatz wurde His-DFF (20 nM) für 5 min mit pBSVDEX (s. 2.2.3; 25ng/ μ l) bei 37 °C inkubiert, an-

schließlich DFF40 für 15 min aus dem Komplex durch Caspase-3-Zugabe freigesetzt und die Protease danach durch den Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk inhibiert. Die Aktivitätsbestimmung von DFF40 (CAD) in diesem und den folgenden zwei Ansätzen erfolgte mit Kinetiken (s. 2.6.6) nach Zugabe von Mg^{2+} in einer Endkonzentration von 5 mM. Nach 0 min, d. h. sofort nach Starten der Reaktion, 1 min, 3 min, 9 min und 15 min wurde jeweils ein Aliquot entnommen und analysiert (s. 2.6.6). In dem zweiten Ansatz wurde His-DFF für 15 min aktiviert, dann Caspase-3 inhibiert, gefolgt von der Inkubation mit Plasmid-DNA für 5 min mit anschließendem Start der Reaktion durch Zugabe von Mg^{2+} . In einem dritten Ansatz wurde His-DFF gleichzeitig mit DNA und Caspase-3 für 15 min inkubiert, dann die Caspase inhibiert, weitere 5 min inkubiert und die Kinetik mit Mg^{2+} gestartet.

2.6.8 Nachweis von DFF45 durch Caspase-3

Der Nachweis von DFF45, z. B. nach affinitätschromatographischer Reinigung von DFF40/DFF45, erfolgte durch Spaltung des Inhibitors mit Caspase-3. Dabei wurden μ g-Mengen von DFF45 oder DFF-Komplex in einem Standard-DFF-Dialysepuffer mit 20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 10 mM DTT, 0.01 % Chaps mit der Protease für 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine Spaltung des Inhibitors in die für DFF45 typischen Fragmente wurde mit SDS-PAGE nachgewiesen (s. 2.6.2).

2.6.9 DNA-Bindungsexperimente

Der Nachweis der DNA-Bindung von DFF erfolgte mit mehreren Methoden, die im Folgenden beschrieben werden. Bis auf den DNA-Cellulose-Bindungsassay (s. 2.6.9.3), erforderten alle Methoden eine DNA-freie Proteinpräparation.

2.6.9.1 DNA-Shift-Assay oder EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

In 20 μ l-Ansätzen wurden Plasmid-DNA (s. 2.2.1.3) und PCR-Produkte der Länge 822 bp, 578 bp, 376 bp und 130 bp in einer Konzentration von 5 μ M mit DFF oder aktiviertem DFF (entspricht freier Nuklease, s. 2.6.5), oder Kontrolle mit DFF45 gleicher Konzentration für 30 min bei RT in Shift-Puffer (20 mM Hepes-NaOH, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01 % Chaps, 10 % Glycerin) inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 5 x AAP (s. 2.3.1.1) ohne SDS versetzt und auf 0.5 - 0.8 % -igen TBE-Agarose- bzw. 6 % -igen nicht denaturierenden Acrylamidgelen untersucht (s. 2.3.1.1 bzw. 2.3.2.1).

2.6.9.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Diese Experimente wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin in Kooperation mit Herrn Dr. Rudi Lurz durchgeführt. 30 ng Plasmid-DNA und DFF in Konzentrationen von 0 - 300 ng (molare Enzym-DNA-Verhältnisse zwischen 30:1 und 300:1) wurden in 10 µl Reaktionsvolumen bei 37°C für 30 min in Shiftpuffer (s. 2.6.9.1) inkubiert. Komplexe wurden mit 0.2 % (v/v) Glutaraldehyd für 10 min bei 37°C fixiert und, nach 3-facher Verdünnung in 10 mM Triethanolaminchlorid, pH 7.5, und 10 mM MgCl₂, an frisch gespaltenes Eisenkies adsorbiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop bei 100 kV und einer Schnellabtastungs-CCD-Kamera (Tietz Video- und Bildverarbeitungssysteme GmbH, Gauting, Deutschland).

2.6.9.3 DNA-Cellulose-Bindungsassay

50 µl einer Suspension von DNA-Cellulose in 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.5, 0.01 % Triton-X 100, 100 mM NaCl und 10 % Glycerin wurden mit 5 µg wt GST-CAD und Varianten, die in o. g. Puffer vorlagen, für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µl des gleichen Puffers für je 10 min bei 4 °C erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch Zugabe von 20 µl Auftragspuffer (s. 2.6.2) zur abzentrifugierten DNA-Cellulose bei einer Inkubationszeit von 5 min bei 95 °C. Der Überstand wurde abgenommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (s. 2.6.2).

2.6.9.4 Photocrosslink-Experimente

DNA-Bindung wurde durch *Photocrosslinks* mit einem 39 bp Oligo, das zentral drei 5-Iododesoxyuridine in einem Strang enthielt, nachgewiesen. In den *Crosslink*-Ansätzen hatten DFF, aktivierte Nuklease und DNA eine Konzentration von 5 µM.

2.6.10 Kristallisationsansätze

Kristallisationsversuche wurden in Kooperation mit Prof. Dr. V. Siksnys, Vilnius, Litauen, mit DFF nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen unter Verwendung von 96 -er *wells* durchgeführt. Weitere Informationen finden sich im Ergebnisteil (s. 3.2).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Expressions- und Reinigungssystems für DFF

Ein Ziel dieser Arbeit war, unter Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems ein Herstellungsverfahren von rekombinantem DFF in einer für die Durchführung von strukturellen und biochemischen Studien benötigten Menge und Reinheit. Die alleinige Expression der Nuklease führt zu keinem funktionellen Protein (Sakahira *et al.*, 1999). Versuche zur isolierten Expression von rekombinantem DFF40 (CAD) und DFF45 (ICAD-L) mit anschließenden Versuchen zur Renaturierung der unlöslichen Nuklease waren nicht erfolgreich, werden aber im Folgenden kurz vorgestellt. Vor und im Laufe dieser Arbeit wurden zur Überwindung der oben skizzierten Probleme Systeme zur gemeinsamen Expression von DFF40 (CAD) und ihrem spezifischen Inhibitor und Faltungshelfer DFF45 (ICAD-L) entwickelt. Diese Koexpressionsstrategie zielt auf die Vermeidung der Bildung unlöslicher Nuklease ab. Die methodische Entwicklung dieser Systeme, ausgehend von frühen Zwei-Plasmid- sowie bicistronischen Systemen und Versuchen zur Komplexrenaturierung, wird im Folgenden detailliert beschrieben. Einige dieser Systeme sowie die verwendeten Expressionstrategien und deren Ergebnisse waren schon Thema eigener Arbeiten (Meiss *et al.*, 2000, Korn, 1999), werden aber wegen ihrer Bedeutung für das weitere Vorgehen im Folgenden noch einmal kurz gegenübergestellt. Die Präparation von DFF gelang in dieser Arbeit unter Verwendung der zwei Zwei-Plasmid-Expressionssysteme pACET-DFF45/pET-DUET-His-CAD und pACET-DFF45/pGEX2T-CADWT. In *E. coli* BL21Gold(DE3) exprimiert, konnten die DFF-Komplexe His-CAD/DFF45 und GST-CAD/DFF45 in hoher Reinheit und Menge präpariert werden.

3.1.1 Renaturierung von CAD

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zur Präparation von DFF-Komplexen zunächst der Versuch unternommen, rekombinante Nuklease und ihren Inhibitor getrennt zu exprimieren und den heterodimeren DFF-Komplex nachfolgend zu rekonstituieren.

His-CAD wurde unter Verwendung des Vektors pTriEx-mCAD und GST-DFF45 mit Hilfe des Vektors pET28a-GST-DFF45 getrennt in BL21Gold(DE-3) exprimiert. Der Inhibitor wurde anschließend aus der löslichen Zellfraktion über den N-terminalen GST-tag durch Af-

finitätschromatographie GSH-Sepharose gereinigt (s. 2.5.4.2) und gegen einen Puffer mit 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Chaps, 10 mM DTT ü. N. bei 4 °C dialysiert. Komplizierter sind die Verhältnisse für die Expression der Nuklease in Abwesenheit des spezifischen Chaperons DFF45. Hierbei wird His-CAD nicht richtig gefaltet, aggregiert und fällt in Form unlöslicher *inclusion-bodies* an. Nach Separierung der löslichen von der unlöslichen Zellfraktion durch Zentrifugation (s. 2.5.3), wurde His-CAD aus dem Pellet durch einen Puffer mit 6 M Guanidiniumchlorid bei 4 °C ü. N. gelöst und an Ni²⁺-NTA-Agarose gebunden. Das denaturierte Protein wurde gewaschen und fraktioniert eluiert. Zur Renaturierung wurde die Nuklease zunächst in guanidiniumchloridhaltigem Elutionspuffer verdünnt, anschließend mit einer stöchiometrischen Menge Inhibitor versetzt und dieser Ansatz dann bei 4 °C ü. N. gegen einen Renaturierungspuffer mit 20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Triton-X 100, 1 mM DTT dialysiert. Bei der nachfolgenden Analyse durch SDS-PAGE war der Inhibitor als Bande zu erkennen, dagegen fehlte die Nuklease, die vermutlich ausgefallen ist (Daten nicht gezeigt). Dies könnte an einer zu geringen DTT-Konzentration im Renaturierungspuffer gelegen haben, aber auch am Fehlen anderer, für die CAD-Renaturierung möglicherweise benötigter Chaperone wie HSP40 und HSP70, sowie in diesem Zusammenhang auch ATP.

3.1.2 Bicistronisches Expressionssystem

Das erste System, das in dieser Arbeitsgruppe 1999 zur Komplexexpression konstruiert wurde, beruhte auf einer bicistronischen Anordnung von DFF40 und DFF45 im Vektor pBB-DFF40His/DFF45. Bei diesem wird nach Induktion der Expression eine für beide Proteine codierende, bicistronische mRNA gebildet, die 5'terminal das offene Leseraster für DFF40 und 3'terminal das für DFF45 enthält. Dieses System lieferte nur eine geringe, durch SDS-PAGE kaum feststellbare Expression der beiden Gene (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einer Arbeit über die unspezifische *Anabaena*-Nuklease NucA und deren Inhibitor NuiA aus *Anabaena* sp. der Einfluß der Genreihenfolge bei bicistronischer Expression in *E. coli* gezeigt (Korn *et al.* 2000). Um diesen Resultaten Rechnung zu tragen, wurde die Reihenfolge der Gene DFF40 und DFF45 in dem oben beschriebenen Expressionssystem vertauscht, wodurch der bicistronische Vektor pBB-DFF45/DFF40His entstand. Für Expressionsversuche mit dem bicistronischen Vektor pBB-DFF45/DFF40His wurden entsprechend transformierte BL21Gold(DE3)-Zellen (s. 2.2.2) in LB-Medium (s. 2.2.1.1) - 0.5 OD⁶⁰⁰ bei 37 °C angezogen und die Expression mit 1 mM IPTG bei 28 °C für ca. 15 h induziert. Bei dem bicistronischen System pBB-DFF45/DFF40His entsteht ebenfalls eine für beide Proteine

codierende mRNA. Die DFF-Expression konnte durch Umkehrung der Genreihenfolge gegenüber dem ersten bicistronischen System, pBB-DFF40His/DFF45, kaum gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Die mit diesen Systemen überexprimierten Proteine, von denen die Nuklease einen C-terminalen His₆-tag trägt, waren immerhin in der löslichen Fraktion zu finden.

3.1.3 Zwei-Plasmid-Expressionssysteme

Parallel zu der Entwicklung von bicistronischen Systemen erfolgte außerdem die Konstruktion von Zweiplasmidsystemen. Mit der Klonierung von pACET-DFF45/pCI-His-DFF40 (Meiss *et al.* 2000) stand eine Alternative für eine gemeinsame Expression der beiden Gene zur Verfügung. Für Expressionsversuche mit den beiden Plasmiden pACET-DFF45/pCI-His-DFF40 wurden entsprechend transformierte BL21Gold(DE3)-Zellen (s. 2.2.2) in LB-Medium (s. 2.2.1.1) - 0.5 OD⁶⁰⁰ bei 37 °C angezogen und die Expression mit 1 mM IPTG bei 28 °C für ca. 15 h induziert. Im Unterschied zu den bicistronischen Systemen werden bei dem Zweiplasmidsystem für die Nuklease und deren Inhibitor einzelne mRNAs gebildet, die unabhängig voneinander translatiert werden. Mit diesem System konnte der Komplex aus DFF40 mit N-terminalem His₆-tag und DFF45 exprimiert und in einer Ausbeute von 0.75 mg/l *E. coli*-Kultur präpariert werden (Meiss *et al.*, 2000; Daten nicht gezeigt).

Nach den Ergebnissen der Expressions- und Reinigungsversuche mit den verschiedenen Systemen (s. 3.1.2 u. 3.1.3) wurden keine weiteren bicistronischen Systeme zur DFF-Expression, da nicht erfolversprechend, konstruiert. Stattdessen wurde die Entwicklung von Zweiplasmidsystemen weiterverfolgt. In Experimenten wurde die Kombination aus der murinen Nuklease CAD mit dem humanen Inhibitor DFF45 am besten exprimiert (Daten nicht gezeigt). Mit pET-DUET-His-CAD/pACET-DFF45, dessen Konstruktion bereits im Methodenteil beschrieben wurde (s. 2.2.3), wurde ein effektives Expressionssystem etabliert, das im Folgenden vorgestellt werden soll.

3.1.3.1 Herstellung des rekombinanten DFF-Komplexes

Mit den Expressionsplasmiden pET-Duet-His-CAD und pACET-DFF45 (s. 2.2.3) transformierte BL21Gold(DE3)-Zellen (s. 2.2.2) wurden in 500 ml LB-Medien (s. 2.2.1.1) - 0.5 OD⁶⁰⁰ bei 37 °C angezogen und die Expression mit 1 mM IPTG bei 28 °C für ca. 15 h induziert. His-CAD und DFF45 wurden unter Kontrolle des T7-Promotors sehr gut exprimiert und die rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE analysiert (s. Abb. 3-1).

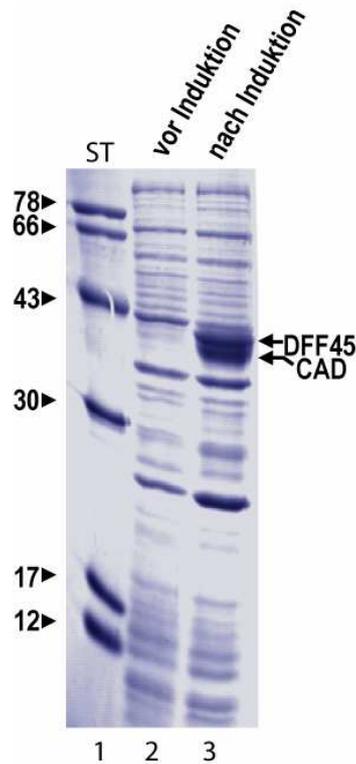


Abb. 3-1: Rekombinante Expression von DFF in *E. coli*

Die SDS-PAGE-Analyse eines Expressionsversuches von DFF mit dem Zweiplasmidsystem pACET-DFF45/pET-Duet-His-CAD in *E. coli* BL21Gold(DE3). Vor Induktion sind beide Proteine nicht vorhanden (Spur 2), nach Induktion sind für DFF40 (CAD) und DFF45 (ICAD-L) deutliche Banden zu erkennen. Das typische Laufverhalten zeigt den etwas kleineren Inhibitor oberhalb der ca. 40 kDa großen Nuklease (Spur 3). Spur 1 Proteinstandard.

3.1.3.2 Löslichkeit der Proteine

Der His-CAD/DFF45-Komplex war nach Zellfraktionierung (s. 2.5.3) in der löslichen Fraktion zu finden (Daten nicht gezeigt). Zur Verbesserung der Adsorption bei der folgenden affinitätschromatographischen Komplexreinigung wurde ein Verdau der im Überstand vorhandenen chromosomalen Bakterien-DNA mit DNase I oder *Serratia*-Nuklease durchgeführt.

3.1.3.3 Ni-NTA-affinitätschromatographische Reinigung von DFF

Die affinitätschromatographische Reinigung des Komplexes erfolgte über den His-tag der Nuklease mit den geeigneten Puffern an Ni-NTA-Agarose (s. 2.5.4.1). Mittels SDS-PAGE wurde die Reinigung dokumentiert (s. Abb. 3-2).

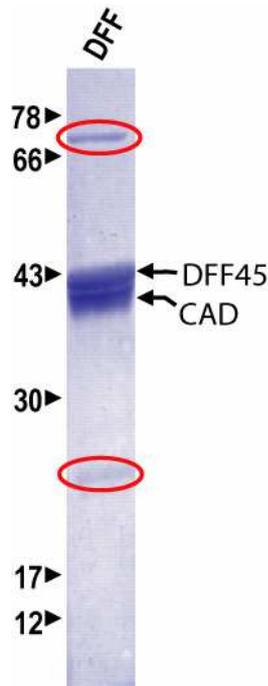


Abb. 3-2: Ni-NTA-affinitätschromatographische Reinigung von DFF (CAD/DFF45)

DFF wurde über den His-tag der Nuklease affinitätschromatographisch gereinigt. Neben dem eluierten Komplex sind auf dem SDS-Gel zwei Kontaminationen sichtbar (rot umrandet).

Dieser Komplex wurde anschließend zur Entfernung der an DFF gebundenen chromosomalen Bakterien-DNA mit DNase I versetzt. Zur Entfernung der zum Spalten dieser DNA zugesetzten DNase I sowie der in der Präparation ebenfalls vorhandenen Proteinkontaminationen (s. **Abb. 3-2**) wurde anschließend über Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt.

3.1.3.4 Anionenaustauschchromatographische Reinigung von DFF

Die Entfernung der Kontaminationen von affinitätschromatographisch gereinigtem DFF (s. 3.1.3.3) erfolgte mit einer MonoQ HR5/5 oder HR10/10 -Säule (s. 2.1.1), bei einer Flußrate von 1 ml/min bzw. 4 ml/min und einem Salzgradienten von 100 - 300 mM NaCl. DFF wurde bei ca. 275 mM NaCl eluiert (s. **Abb. 3-3, obere Figur**) und in Fraktionen à 0.5 ml gesammelt. Mit SDS-PAGE überprüfte Fraktionen (s. **Abb. 3-3, mittlere Figur**) wurden mit Centricon YM50-Ultrafiltrationseinheiten (s. 2.1.1) unter Erhalt von ca. 50 mg Protein aus 10 l *E. coli*-Kultur auf 10 mg/ml konzentriert und zur Stabilisierung der Proteine gegen 20 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 %Chaps, 10 % Glycerin und 5 mM DTT dialysiert. Die SDS-Gelanalyse zeigt einen sehr reinen und durch Caspase-3 aktivierbaren Komplex (s. **Abb. 3-3, untere Figur**).

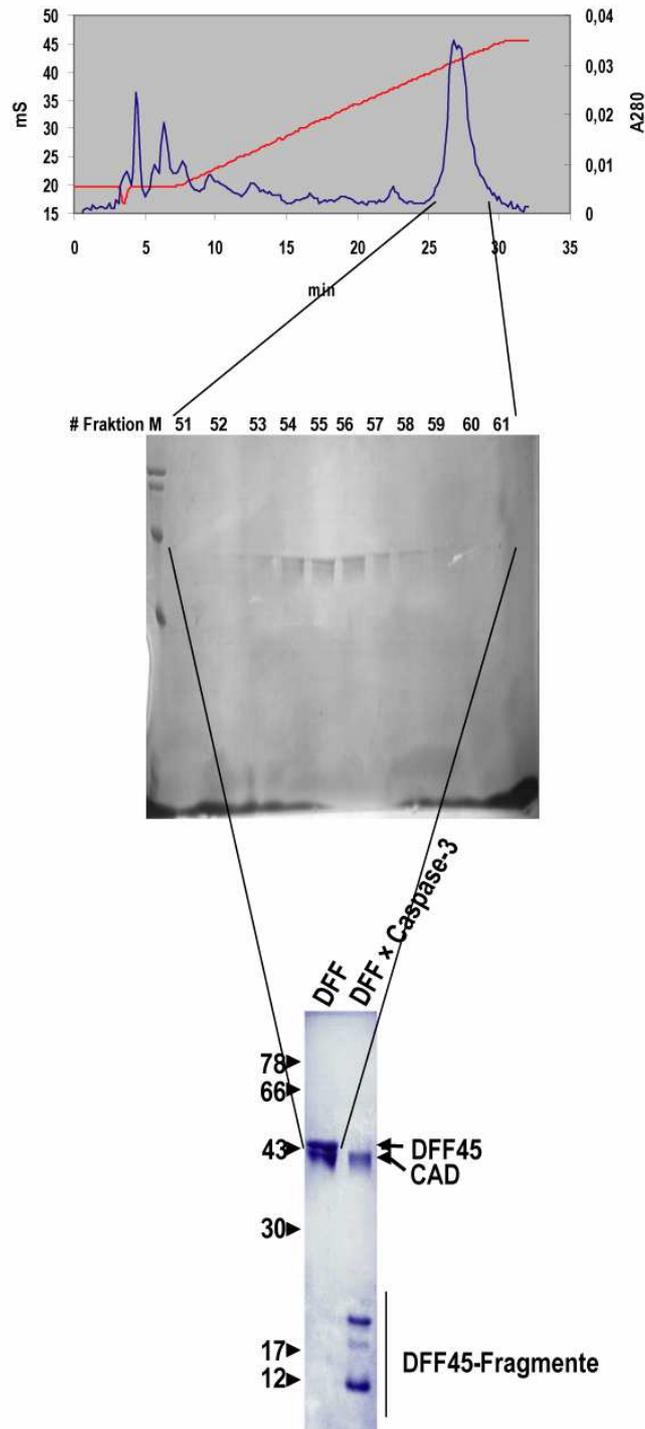


Abb. 3-3: MonoQ-Reinigung von DFF

Obere Figur Das Elutionsprofil (blau) eines durch Anionenaustauschchromatographie gereinigten DFF-Komplexes. Unter Verwendung einer HR5/5 oder HR10/10 -Säule, einem Salzgradienten von 100 - 300 mM (rot) und einer Flußrate von 1ml/min oder 4 ml/min wurde DFF bei ca. 275 mM NaCl eluiert.

Mittlere Figur SDS-PAGE von DFF-Fractionen, die den Elutionspeak der oberen Figur widerspiegeln.

Untere Figur Durch Ultrafiltration der eluierten DFF-Fractionen konzentrierter DFF-Komplex mit anschließender Caspase-3-Aktivierung.

3.2 Kristallisationsversuche mit His-CAD/DFF45

In Kooperation mit Herrn Prof. V. Siksnys, Biotechnologisches Institut, Vilnius, Litauen, wurde der Versuch unternommen, rekombinanten DFF zu kristallisieren (s. 2.6.10). Der wie unter (s. 3.1.3.1 - 5) präparierte Komplex wurde in An- und Abwesenheit eines 12 Basenpaare umfassenden Oligodesoxyribonukleotids eingesetzt und für die Kristallisation übliche Bedingungen, bestehend aus einem speziellen Raum mit einer Temperatur von 16 °C und einer niedrigen relativen Luftfeuchte, geschaffen. Von den jeweils ca. 500 getesteten Bedingungen ist bislang jedoch eine kleine Kristallnadel das bisher einzige erfreuliche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

3.3 Charakterisierung des aktiven Zentrums der Nuklease

Ein Ziel dieser Arbeit lag in der biochemischen Charakterisierung des aktiven Zentrums von DFF40 (CAD). Die erste Aufgabe, die Identifizierung katalytisch relevanter Aminosäurereste, wurde mittels Mutationsstudien und chemischer Modifizierung gelöst. Eine genaue Identifizierung der beteiligten Aminosäurereste durch ortsgerichtete Mutagenese wird im Folgenden beschrieben. Da die chemische Modifizierung von Aminosäureresten in der vorliegenden Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielte, siehe dazu jedoch Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002, Scholz *et al.*, 2003, wird diese Methode hier nur kurz erwähnt.

3.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Bei dieser Vorgehensweise werden gezielt Aminosäurereste von Proteinen ausgewählt, ausgetauscht und die Mutanten anschließend im Vergleich zu Wildtyp DFF40/CAD biochemisch charakterisiert. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise und der Ergebnisse liefern die folgenden Kapitel (s. 3.3.2 - 3.3.4.).

3.3.2 Auswahl der Aminosäuren zur Untersuchung ihrer katalytischen Relevanz

Durch Sequenzvergleiche der C-terminalen katalytischen Domäne fünf verschiedener CAD-Spezies aus Maus, Ratte, Mensch, Zebrafisch und Fliege (*Drosophila*), wurden an 17 Positionen konservierte, potentiell funktionell relevante Aminosäurereste in muriner CAD ermittelt und ausgetauscht (s. **Abb. 3-4**). Es handelt sich dabei um voll bzw. teilweise konservierte

Histidine an den Positionen 242, 263, 304, 308 bzw. 127 und 313. Funktionen, die Histidine bei anderen Nukleaseen übernehmen, wie die der allgemeinen Säure oder Base, der Metallionenkoordinierung, der DNA-Bindung über das Zucker-Phosphat-Rückgrat und der Übergangszustandstabilisierung wurden auch für diese CAD-Reste in Betracht gezogen. Bei den sechs konservierten Argininresten 151, 166, 168, 212, 250 und 269 und den drei ebenfalls konservierten Lysinresten 155, 301 und 310, wurden beschriebene Funktionen positiver Reste bei Nukleasen wie die Beteiligung an der Positionierung der spaltbaren Phosphodiesterbindung über Interaktionen zu dem negativen Phosphatrückgrat, die Stabilisierung des pentavalenten Übergangszustands und auch das Aktivieren des Wassermoleküls für den nukleophilen Angriff vermutet. Interessanterweise liegen die beiden Reste Arg151 und Lys155 in einer Sequenz mit einer etwaigen Homologie zu einem DNA bindenden Motiv von *uvrA*. Dieses Protein ist eine Untereinheit von der an der DNA-Reparatur beteiligten *uvrABC*-Excisionsnuklease. Die Tyrosinreste 170 und 247 könnten die DNA positionieren, d. h. DNA-Bindungen über *stacking* Interaktionen zu den Basen eingehen und auch die spaltbare Phosphodiesterbindung analog zu Topoisomerasen attackieren. Die vorzunehmenden Austausche wurden bei möglichst geringer Änderung der räumlichen Struktur und Polarität so gewählt, dass entweder die Funktion übernommen werden kann, z. B. Lys → Arg, oder diese ausgeschaltet wurde, z. B. Arg → Ala. Eigene Austausche wurden mit H242 nach D und R, H263 nach D und R, H313, nach D, R und K, R151, R166, R168, R212, R250 und R269 nach A, K155 nach R, K301 nach R, K310 nach R und Y247 nach S durchgeführt.

Ergebnisse

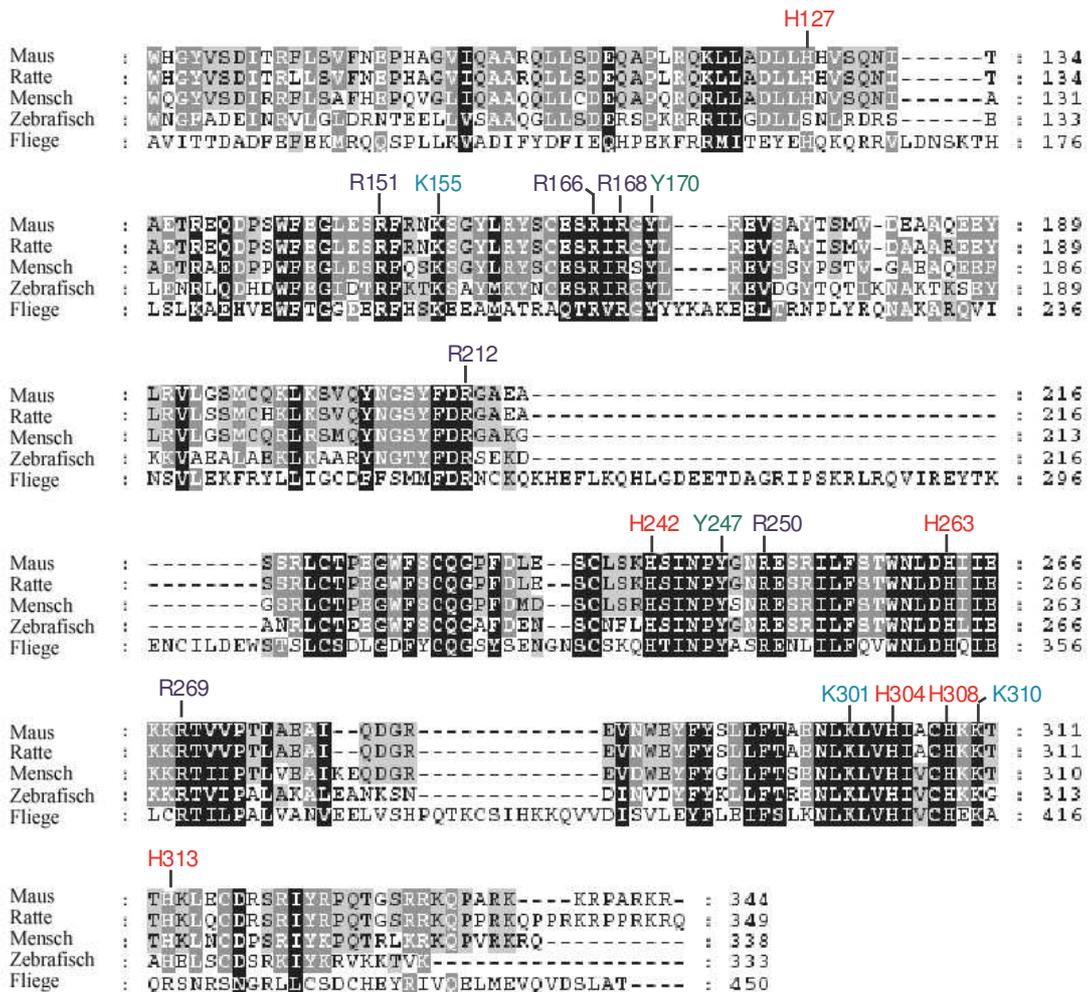


Abb. 3-4: Vergleich der Aminosäuresequenz der C-terminalen katalytischen Domäne von fünf CAD (DFF40) -Spezies

Zur Ermittlung von potentiell katalytisch relevanten Aminosäureresten für ortsgerichtete Mutagenesestudien erfolgte ein Alignment der C-terminalen katalytischen Domäne von fünf CAD-Spezies. Schwarze Bereiche beinhalten völlig konservierte Reste, Abstufungen in grau für teilweise konservierte Aminosäuren; weiß zeigt keine Konservierung; farbig die ausgetauschten Reste und ihre Positionen.

3.3.3 Herstellung von CAD (DFF40) -Mutanten

3.3.3.1 Expressionsstrategie und -ergebnis von GST-CADMutante

Mit dem Zweiplasmidsystem pGEX2T-CADMutante/pACET-DFF45, von dem die Klonierungen im Methodenteil ausführlich beschrieben sind (s. 2.2.3), wurde GST-CADMutante zusammen mit DFF45 in *E. coli* BL21Gold(DE3) exprimiert. Die angewendete Strategie entsprach der bereits für His-CAD/DFF45 beschriebenen (s. 3.1.3.2). Anzumerken ist, dass die Induktion von GST-CADMutante unter Kontrolle des *tac*-Promotors erfolgte (s. 2.5.1.2). Die Ergebnisse wurden mit SDS-PAGE analysiert (Daten nicht gezeigt) und die löslichen Proteine nach Zell-Fraktionierung (s. 2.5.3) affinitätschromatographisch gereinigt (s. 2.5.4.2 u. 3.3.3.2).

3.3.3.2 Affinitätschromatographische Reinigung GST-DFF-Komplex Varianten

Die Reinigung der DFF-Komplexe erfolgte über den GST-tag der Nuklease-Varianten mit den geeigneten Puffern an Glutathion-Sepharose (s. 2.5.4.2). Mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen/gereinigten Proteine analysiert (s. Abb. 3-5, Spur 1). Alle Nuklease-Varianten lassen sich aus dem Komplex mit DFF45 durch Caspase-3 aktivieren (s. Abb. 3-5, Spur 2). Die Wildtyp-Nuklease wurde ohne Unterschied zu den CAD-Varianten gereinigt und aktiviert (Daten nicht gezeigt). Zum Entfernen von reduziertem Glutathion wurden die Proteine gegen 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 10 mM DTT, 0.01 % Chaps dialysiert und in Versuchen eingesetzt (s. 3.3.4.1 - 3.3.4.4). Eine Entfernung der komplexgebundenen *E. coli*-DNA aus der Präparation (s. 3.1.3.5) unterblieb, da diese Methode noch nicht etabliert war. So erforderte die Konzentrationsbestimmung von DFF eine Auswertung von Bandenstärken auf SDS-Gelen im Vergleich zu Referenzproteinen bekannter Konzentrationen, da die DNA Konzentrationsbestimmungen aus UV-Spektren verfälscht.

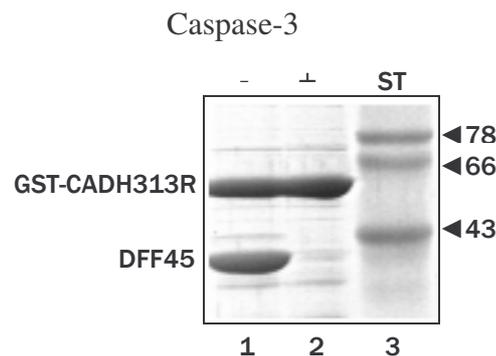


Abb. 3-5: DFF-Präparation mit Nukleasemutante vor und nach Aktivierung

DFF-Komplexe mit wildtyp DFF40 (CAD) und Varianten wurden durch Affinitätschromatographie über den GST-Fusionsanteil der Nukleasen gereinigt. Beispielhaft ist hier DFF mit der Varianten CADH313R vor (Spur 1) und nach Aktivierung der Nuklease durch Caspase-3 (Spur 2) gezeigt. Alle gereinigten Komplexe lieferten das gleiche Ergebnis.

3.3.4 Charakterisierung der Mutanten

Die gereinigten Mutanten (s. 3.3.3.2) wurden anschließend biochemisch im Vergleich zur WT-Nuklease charakterisiert. Die untersuchten Eigenschaften waren Inhibitorbindung, DNA-Bindung, Oligomerenzustand und die DNA-Spaltaktivität (s. 3.3.4.1 - 4). Es wurden in dieser Arbeit alle aufgeführten 32 Varianten untersucht (s. Tabelle 3-1), jedoch nicht immer in allen Eigenschaften. Die in einer anderen Arbeit mittels CD ermittelte strukturelle Integrität sei hier nur erwähnt. Mit dieser Methode wurde bei allen getesteten Varianten, außer bei H242N, die gleiche Sekundärstrukturzusammensetzung wie bei der Wildtyp-Nuklease festgestellt (Meiss

et al., 2001). Die Ergebnisse der Untersuchungen (s. 3.3.4.1 - 4) sind in **Tabelle 3-1** zusammengestellt. In den folgenden Kapiteln werden exemplarisch Ergebnisse und die verwendeten Methoden, soweit nicht im Methodenteil ausreichend beschrieben (s. 2.6), dargestellt.

3.3.4.1 Inhibitorbindung

Alle Mutanten konnten über ihren N-terminalen GST-tag zusammen mit dem Inhibitor affinitätschromatographisch gereinigt und so die Komplexbildung nachgewiesen werden (s. **Abb. 3-5** u. **Tabelle 3-1**). Die Mutationen verhindern folglich nicht die Nuklease/Inhibitor-Interaktion. In den Aktivitätstests mit Nukleasevarianten zeigte sich in keinem Fall ein Verlust der inhibitorischen Funktion des Inhibitors, da vor Caspase-Aktivierung in allen Fällen die Mutanten wie der WT inhibiert sind (Daten nicht gezeigt).

3.3.4.2 DNase-Aktivität

Die Bestimmung der DNase-Aktivität der CAD-Varianten erfolgte in Kinetiken mit den Zeitwerten 1, 3, 9, 15 und 30 min (s. **Abb. 3-6**). Die aus der zeitlichen Abnahme der scPlasmid-DNA berechnete Anfangssteigung gibt im Verhältnis zum WT die Aktivität der Varianten wieder (s. 2.6.6). Die ermittelten Werte der relativen Aktivität der untersuchten Mutanten reichen von nicht detektierbar bis zu 109 % des WT (s. **Tabelle 3-1**). Bei den ermittelten Aktivitätsänderungen der Varianten weisen die Ergebnisse aus strukturellen Untersuchungen, der Bestimmung der Quartärstruktur (Oligomerenstatus, s. 3.3.4.4; Meiss *et al.*, 2001) und der Sekundärstruktur (CD; Meiss *et al.*, 2001), eher auf eine fehlende funktionelle Gruppe als auf große strukturelle Störungen hin. Bemerkenswert ist die Produktion von Spaltpatternen durch die Varianten Y170F, H242N, H313R, H308N, K310R und R269A, die einer Steigerung der Spezifität gleichkommt (s. **Tabelle 3-1** u. **Abb. 3-6**; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Zur Kontrolle, dass das Spaltpattern auf eine Kontamination aus *E. coli* zurückzuführen ist, wurde die Variante Y170F in humanen embryonischen 293-T Nierenzellen exprimiert. In Aktivitätstests mit dieser Variante war das beschriebene Spaltpattern ebenfalls zu beobachten (Korn *et al.*, 2002). Die Auswirkungen der Mutationen auf die Aktivität der Nuklease und das Auftreten von Spaltpatternen bei einigen Varianten hatten einen entscheidenden Einfluß für die Beurteilung der katalytischen Relevanz der untersuchten Reste (s. 3.3.5, 3.3.7, 3.3.8 u. 3.3.9). In der Diskussion werden diese beiden Eigenschaften nochmals thematisiert.

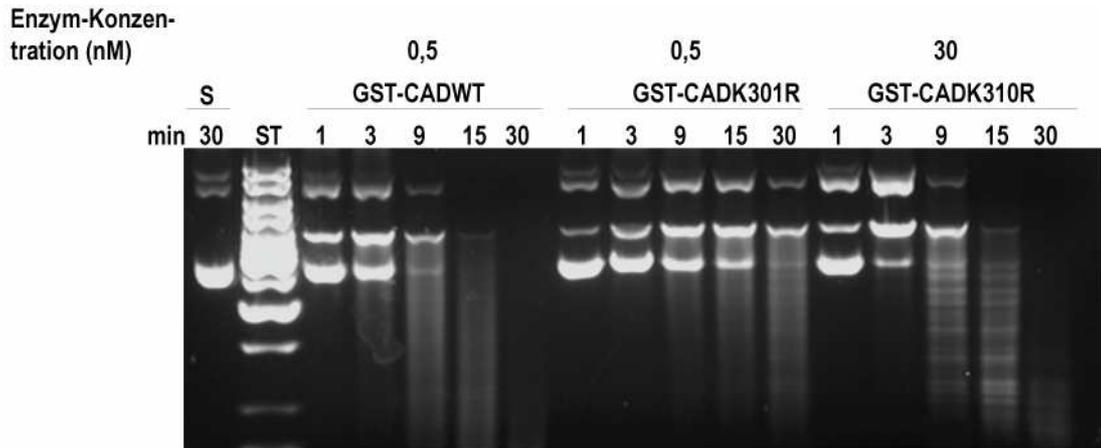


Abb. 3-6: Kinetik der DNA-Spaltung durch CAD-Mutanten

Die relative Aktivität von CAD-Mutanten im Vergleich mit der WT-Nuklease wurde in Kinetiken bestimmt. Proben des Spaltansatzes wurden nach 1, 3, 9, 15 und 30 min entnommen und auf Agarosegele analysiert. Aus der zeitlichen Abnahme von scPlasmid-DNA läßt sich eine Anfangssteigung berechnen, die im Verhältnis zum WT die Aktivität der Varianten wiedergibt. Exemplarisch sind hier die Verläufe von Kinetiken der Varianten K301R und K310R neben der WT-Nuklease gezeigt. Zu erkennen ist die Bildung eines Fragmentmusters bei der Varianten K310R.

3.3.4.3 DNA-Bindung

Zur Ermittlung der DNA-Bindung von CAD-Varianten wurden Versuche mit aktivierter DNase an DNA-Cellulose durchgeführt (s. 2.6.9.3). Alle GST-CAD-Varianten binden DNA-Cellulose wie der WT, die Kontrolle (GST) nicht (s. Abb. 3-7 u. Tabelle 3-1; Korn *et al.*, 2002). Nach der Entwicklung eines Reinigungsschemas zur Entfernung von chromosomaler *E. coli* DNA aus der Proteinpräparation (s. 2.5.5 u. 3.1.3.5), wurde der sensitivere DNA-Shift-Assay für weitere DNA-Bindungsstudien verwendet (s. 2.6.9.1 u. 3.5.2).

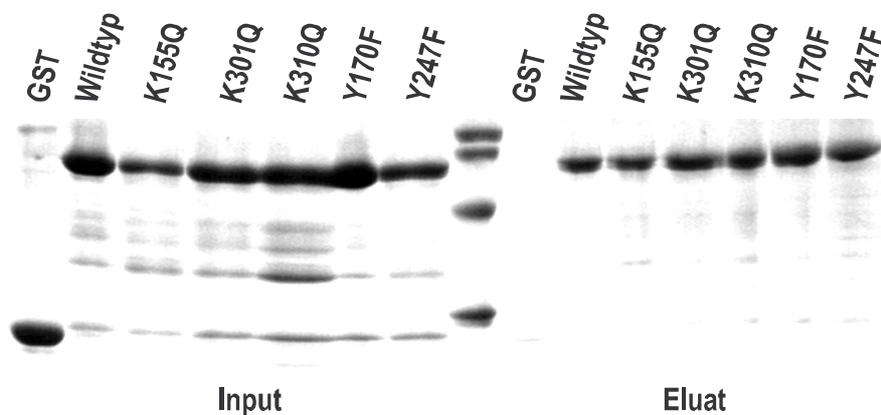


Abb. 3-7: DNA-Bindung von GST-CADVarianten

Exemplarisch für alle Varianten wurde die DNA-Cellulose-Bindung der CAD-Varianten K155Q, K301Q, K310Q, Y170F und Y247F, die gleich der der Wildtyp-Nuklease ist, analysiert. Die Negativkontrolle GST bindet nicht.

3.3.4.4 Oligomerenstatus

Gelfiltrationsuntersuchungen zur Bestimmung des Oligomerenstatus von Wildtyp-CAD und der CAD-Varianten H127N, H242N, H242E, H242R, H263N, H263D, H263R, H304N, H308N, H308D, H308R, H313N, H313D, H313R, K155Q, K301Q, K310Q, Y170F und Y247F wurden mit einer Superdex-200 HR10/30 Säule, equilibriert mit 20 mM Hepes-NaOH, pH 8.0, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, an einer Merck Hitachi HPLC-Anlage bei einer Flußrate von 0.5 ml/min durchgeführt. 15 µg aktivierte GSTmCAD-Nuklease wurden aufgetragen und in Fraktionen à 1 ml eluiert. Da die Elutionsprofile aller getesteten Varianten mit Ausnahme der Variante H242N dem des WT entsprachen, ist von einer gleich gear- teten Oligomerisierung dieser Varianten auszugehen (Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Zur weiteren Überprüfung der Oligomerisierung wurden Fraktionen von H308N (H313R), die ca. 10 (109) % Restaktivität aufweist (s. **Tabelle 3-1**), und der Wildtyp-Nuklease (WT) auf Aktivität untersucht. Die größte Aktivität zeigte der WT wie auch die Varianten H308N (H313R; s. **Abb. 3-8**) bei ca. 800 kDa. Außerdem waren minore Aktivitäten für die WT-Nuklease bei einem Molekulargewicht von etwa 1.3 MDa und einer dem Dimer entsprechenden Größe von 130 kDa zu beobachten (s. **Abb. 3-8**). Auf Proteinebene wurden 700 µl der WT- und H308N-Fraktionen nach TCA-Fällung über SDS-PAGE analysiert und kein Unter- schied in den Verteilungsprofilen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Diese Proteinverteilungen korrelierten mit den Aktivitätsverteilungen (Daten nicht gezeigt). Zusammengefaßt lassen diese Versuche den Schluß zu, dass die Oligomerisierung durch die Mutationen mit der Aus- nahme der Variante H242N, deren Oligomerisierung gestört ist, nicht beeinträchtigt wird. Der Oligomerenstatus der Nuklease-Varianten wird später, auch für H242N, noch einmal in der Diskussion thematisiert (s. 4.).

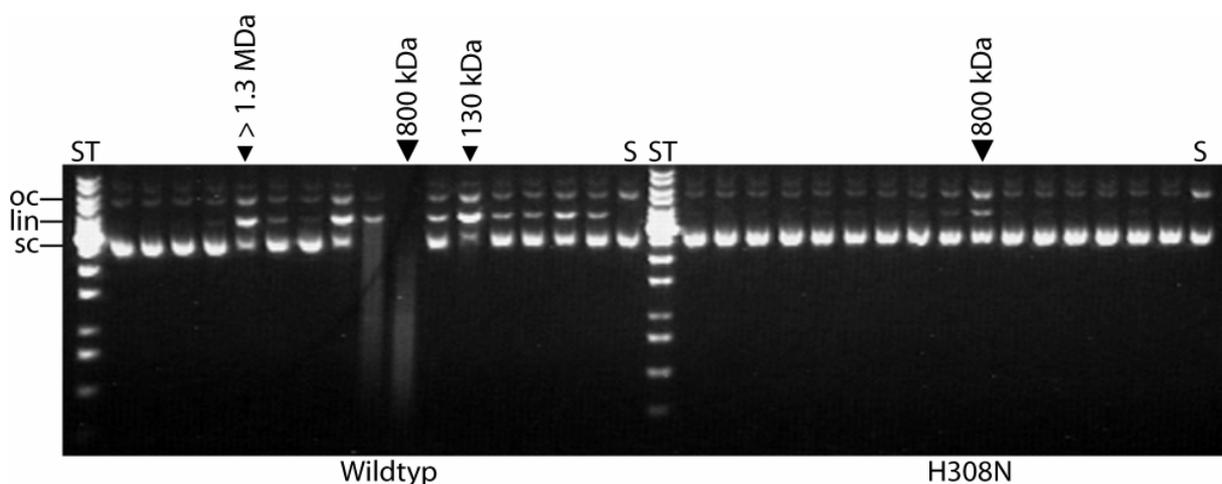


Abb. 8: Oligomerenstatus von GST-CADWT und von GST-CADVarianten

Die Ermittlung des Oligomerenstatus von aktiviertem GST-CADWT und aktivierten GST-CADVarianten, d. h. allen Histidin-Varianten nach Arginin, Asparagin, Aspartat und Glutamat, den Lysin-Varianten nach Glutamin und den Tyrosin-Varianten nach Phenylalanin, erfolgte durch Gel-filtrationsläufe. 15 µg Nuklease wurden mit einer Superdex-200 HR 10/30 Säule und einer Flußrate von 0.5 ml/min in Fraktionen à 1 ml eluiert. Mit einigen Varianten, wie die hier beispielhaft gezeigte H308N, und der Wildtyp-Nuklease wurden Aktivitätstests durchgeführt. Aus den Fraktionen wurden 15 µl entnommen und mit pBSVDEX (20 ng/µl) in einem Puffer mit 12 mM MES/HCl, pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % Glyzerin, 0.01 % CHAPS und 5 mM MgCl₂ für 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf 0.8 %-iger TBE-Agarose ist für GST-CADWT der größte Aktivitätspeak in der 800 kDa Fraktion zu finden, in der ein CAD-Oligomer ca. 12 Monomere umfaßt. Kleinere Aktivitätspeaks wurden in der > 1.3 MDa Ausschlußvolumenfraktion und bei 130 kDa, d. h. der Größe eines Dimers, beobachtet. Für die Variante H308N ist ein Aktivitätspeak in einer 800 kDa entsprechenden Fraktion zu finden, so dass der Oligomerisierungsstatus der Variante mit der Wildtyp-Nuklease identisch sein sollte. (S = pBSVDEX, ST = 1 kB Standard, oc = open circle Plasmid, lin = linearisiertes Plasmid, sc = supercoiled Plasmid).

3.3.4.5 Eigenschaften von CAD-Varianten mit Austausch konservierter Aminosäurereste in der C-terminalen katalytischen Domäne von CAD

Einen Überblick über die durch Mutationsstudien im Laufe dieser Arbeit, aber auch in anderen Arbeiten gewonnenen Daten zur Charakterisierung des aktiven Zentrums der Nuklease zeigt **Tabelle 3-1**. Die Ergebnisse zur Untersuchung des Oligomerenstatus von Mutanten (s. **3.3.4.4**) sind hier nicht aufgeführt.

Tabelle 3-1: Eigenschaften von CAD-Varianten mit Austausch konservierter Aminosäurereste in der C-terminalen katalytischen Domäne von CAD

Ergebnisse

Position	Substitution	ICAD-L-Bindung ¹	rel. Akt. (%) ²	DNA-Bindung ³	Bemerkung
Wildtyp		+	100	wt	
Lys155	Gln	+	n.d.c.	wt	
	Arg	+	~1.0	n.d.	
Lys301	Gln	+	1.4	wt	
	Arg	+	68.3	wt	
Lys310	Gln	+	2.3	wt	
	Arg	+	2.3	wt	Fragmentmuster
Tyr170	Phe	+	107.0	wt	Fragmentmuster
Tyr247	Phe	+	1.2	wt	
	Ser	+	<1.0	n.d.	
Arg151^u	Ala	+	n.d.c.	wt	
Arg166	Ala	+	n.d.c.	wt	
Arg168	Ala	+	n.d.c.	wt	
Arg212	Ala	+	n.d.c.	wt	
Arg250	Ala	+	8.2	wt	
Arg269	Ala	+	0.5	wt	Fragmentmuster
His127	Asn ⁴	+	25.8	n.d. ⁵	
His242	Asn ⁴	+	6.3	n.d. ⁵	Fragmentmuster
	Glu	+	<1.0	wt	
	Arg	+	<1.0	wt	
	Cys	+	<1.0	n.d.	
His263	Asn ⁴	+	0.7	n.d. ⁵	
	Asp	+	<1.0	wt	
	Arg	+	<1.0	wt	
His304	Asn ⁴	+	14.5	n.d. ⁵	
	Cys	+	<1.0	n.d.	Mn ²⁺ -, Co ²⁺ -Aktivierung
His308	Asn ⁴	+	9.3	n.d. ⁵	Fragmentmuster
	Asp	+	~1-2	wt	Restaktivität bei pH 5.0
His313	Arg	+	<1.0	wt	
	Asn ⁴	+	1.3	n.d. ⁵	
	Asp	+	<1.0	wt	
	Arg	+	109.0	wt	Fragmentmuster
	Lys	+	<1.0	n.d.	Mn ²⁺ -Aktivierung

¹ICAD-L-Bindung gemessen durch Co-Reinigung von hICAD-L ohne *tag* mit GST-CAD; ²Bestimmt durch die Abnahme von supercoiled-Plasmid-DNA in Spaltexperimenten; ³Bindung von aktiviertem GST-CAD an DNA-Cellulose; ⁴Die Eigenschaften dieser Varianten wurden in Meiss *et al.*, 2001 beschrieben; ⁵Sakahi-ra *et al.*, 2001 demonstrierten DNA-Bindung bei Alanin-Austauschen an gekennzeichneten Positionen in muriner CAD. Mit Ausnahme von H242A binden alle anderen Varianten an DNA-Cellulose ähnlich wie Wildtyp-CAD; n.d. = nicht bestimmt; n.d.c. = keine detektierbare Spaltung; wt = Wildtyp-artig; u = *uvrA*-Homologie-Region

3.3.5 Identifizierung der für den Spaltmechanismus essentiellen Histidinreste His263 und His308

Als wichtigstes Ergebnis der chemischen Modifizierungsexperimente (s. 3.3) und der Mutationsstudien, die in dieser und anderen Arbeiten durchgeführt wurden, wurde die katalytische Relevanz von Histidinresten in DFF40(CAD) ermittelt (s. **Tabelle 3-1**; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Die Zuordnung von His263 als allgemeine Base bei der Spaltung der Phosphodiesterbindung erfolgte aufgrund der in Aktivitätsstudien beobachteten großen Effekte mit Varianten, in denen His263 ausgetauscht wurde (s. **Tabelle 3-1**; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Für His308 wurde ebenfalls eine Beteiligung an der DNA-Spaltung durch die

Nuklease herausgefunden. Diese beruhte auf Resultaten aus Aktivitätstests mit an dieser Position substituierten Varianten (s. **Tabelle 3-1**). Vor allem die in einer anderen Arbeit beobachtete Restaktivität von 5% bei pH 5 für die Variante H308D im Gegensatz zu den Varianten H242D, H263D und H313D ohne Aktivität bei diesem pH (s. **Tabelle 3-1**), führte zu der Spekulation über die Funktion von His308 als allgemeine Säure (Korn *et al.*, 2002). Die Zuordnung der Reste His263 und His308 zu Funktionen im katalytischen Mechanismus erfolgte in Abwesenheit struktureller Informationen über das aktive Zentrum der Nuklease.

3.3.6 $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Modell

3.3.6.1 Sequenzhomologien von CAD und H-N-H Nukleasen

Aufgrund der katalytischen Relevanz von Histidinen für CAD, vor allem für His263 und His308 (Sakahira *et al.*, 2001, Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002), wurde ein Alignment von CAD mit nukleinsäurespaltenden Colicinen veröffentlicht (Walker *et al.*, 2002). Gemäß der Sequenzhomologien, verdeutlicht in einem manuellen Alignment, entsprechen His263, Asn299 und His308 in CAD, den katalytisch relevanten Aminosäureresten His103, Asn118 und His127 aus der DNase-Domäne des Colicins E9. Diese Zuordnung von CAD zu der Superfamilie der H-N-H- oder auch $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen erfolgte jedoch ohne experimentelle Beweise und blieb somit zunächst hochspekulativ (Walker *et al.*, 2002). Andererseits könnten diese Sequenzähnlichkeiten bedeuten, dass CAD und ColE9 DNase über eine gemeinsame Struktur des aktiven Zentrums verfügen und einen ähnlichen Mechanismus der Phosphodiester-spaltung teilen, da die Colicin-DNase zusammen mit *Serratia*-Nuklease, I-*PpoI* und T4 Endonuklease VII zu der H-N-H- oder auch $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease-Superfamilie gehören. Diese Mitglieder haben eine gemeinsame Struktur des aktiven Zentrums (s. **Abb. 3-9**) und einen ähnlichen katalytischen Mechanismus (Friedhoff *et al.*, 1999, Kuhlmann *et al.*, 1999, Aravind *et al.*, 2000, Raaijmakers *et al.*, 2001). Eine Überprüfung der These, dass CAD zu den $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen gehört, erfolgte durch Mutationsstudien auf der Basis eines erweiterten Alignments in einer anderen Arbeit. CAD aus neun Spezies wurde mit den aktiven Zentren von Mitgliedern der H-N-H oder auch $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease-Superfamilie verglichen (Scholz *et al.*, 2003). Bei diesen Nukleasen handelt es sich um das Colicin E9 aus *E. coli* (ColE9), die strukturspezifische T4 Endonuklease VII, die zucker- und basenunspezifische *Serratia*-Nuklease und die Homing-Endonuklease I-*PpoI*. Sie weisen als gemeinsames Strukturelement das $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motiv, d. h. zwei β -Faltblätter und eine α -Helix, die oft zwei katalytisch relevante Histidine und ein Asparagin (deshalb auch

(Raaijmakers *et al.*, 1999, 2001). In den anschließenden Mutationsstudien wurden aufgrund dieses Alignments die Reste Asn260, Asp262, Asn299 durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht und in DNA-Spaltexperimenten charakterisiert. Zusammen mit der chemischen Modifizierung von Aminosäureresten wurde für diese Reste eine essentielle Bedeutung für die DNA-Spaltung festgestellt. Dies ist ein starker Hinweis auf Ähnlichkeiten des aktiven Zentrums und des katalytischen Mechanismus von CAD und Mitgliedern der $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease-Familie (Scholz *et al.*, 2003).

3.3.6.2 Entwicklung des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Modells

Auf der Basis der in Alignments und Mutationsstudien gewonnenen Daten und der vorhandenen Strukturen der aktiven Zentren von Mitgliedern dieser Familie, T4 Endonuklease VII, I-PpoI, *Serratia*-Nuklease und ColE9 DNase erfolgte die Modellierung des katalytischen Zentrums von CAD. Das Modell zeigt die gemeinsamen Merkmale des $\beta\beta\alpha$ -Me Kerns von bekannten $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen mit einer Insertion, die als Extension von kurzen helikalen Strukturen präsent ist (s. **Abb. 3-10**, Modell in weiß-grau). Diese Struktur zeigt einen gut gepackten hydrophoben Kern, eine hydrophile Oberfläche und ist gut gefaltet (VERIFY3D). Zusätzlich sind einige hydrophobe Reste auf der Oberfläche des gemeinsamen $\beta\beta\alpha$ -Me-Segments exponiert, was auf diese Region als Teil einer größeren globulären Struktur in dem nativen Protein hinweist, als dies bei anderen $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen zu beobachten ist. Außerhalb des aktiven Zentrums sind die Strukturen dieser Nukleasen, soweit bekannt, untereinander nicht homolog und sondern sehr verschieden. Eine Ausnahme bilden dabei nur die nahe verwandten DNasen ColE7 und ColE9. Die Superposition des Modells, das in Kooperation mit Professor J. M. Bujnizki (IIMCB Warschau) entstand (**Abb. 3-10** in grau-weiß; Scholz *et al.*, 2003), mit der später gelösten Kristallstruktur der Nuklease (**Abb. 3-10** in gelb; Woo *et al.*, 2004) zeigen weitestgehende Übereinstimmung. Beide Strukturen weisen die für $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen eher untypische, große α -helikale Insertion zwischen den beiden β -Faltblättern auf. Im Unterschied zu der Kristallstruktur, die nach den Faltblättern nur einen halben α -helikalen Turn zeigt, ist in dem Modell eine etwas längere α -Helix zu erkennen. Die an dem Spaltmechanismus beteiligten Reste His263, Asp262 und His308 sind in der Modell/Struktur-Superposition hervorgehoben (s. **Abb. 3-10**). Den beiden Resten Asn260 und Asn299 wurde eine strukturelle Bedeutung für die Konformation des aktiven Zentrums zugeordnet. (s. **Abb 3-11 A**; Scholz *et al.*, 2003).

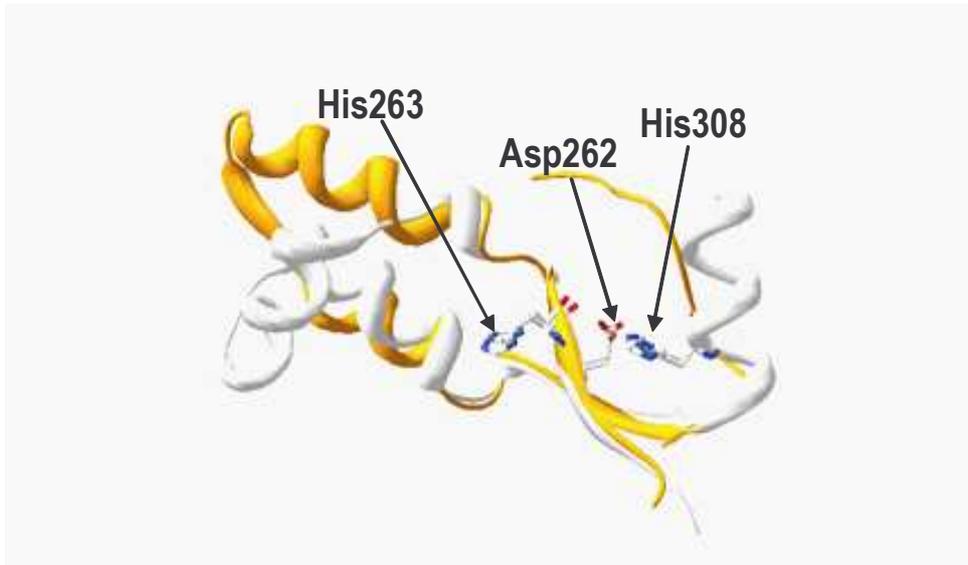


Abb. 3-10: Superposition von Modell und Struktur des aktiven Zentrums von CAD

Die Übereinanderlagerung des modellierten aktiven Zentrums von CAD (weiß/grau) mit der Struktur (gelb) zeigt eine hohe Übereinstimmung. Die beiden β -Faltblätter des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs wurden sehr gut modelliert, ebenso die für $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen unübliche Insertion zwischen den beiden Faltblättern. Ein Unterschied weist das Modell in der α -Helix als Teil des $\beta\beta\alpha$ -Motivs auf, da an ihre Stelle in der Struktur ein halber α -helikaler Turn tritt. Die am Spaltmechanismus beteiligten Reste H263, Asp 262 und His308 sind hervorgehoben.

3.3.6.3 Mechanismus der Phosphodiester-spaltung

Mit den Strukturinformationen aus der Modellierung des aktiven Zentrum von CAD (s. 3.3.6.2) wurden die durch Mutagenesestudien und chemische Modifizierung gewonnenen Daten (s. 3.3.4.5 u. 3.3) für eine Zuordnung von Resten zu Funktionen im Mechanismus der Katalyse genutzt (s. Abb. 3-11). So ist His263 die allgemeine Base, die dem Wasser ein Proton für den nukleophilen Angriff auf die zu spaltende Phosphordiesterbindung abstrahiert. His308 ist wahrscheinlich der wichtigste Rest für die Koordinierung des Metallions, wie His127 in ColE9 oder Asn62 in T4 Endonuklease VII. Auf der Basis des Alignments, in dem Asp262 in CAD zu His102 in ColE9 und zu Asp 40 in T4 Endonuklease VII korrespondiert (Raaijmakers *et al.*, 2001, Pommer *et al.*, 2001), und der Mutationsstudien (Scholz *et al.*, 2003) wurde für den Rest Asp262, wie für die korrespondierenden Reste in ColE9 und T4 Endonuklease VII ermittelt, eine Beteiligung an der Koordinierung des Metallions vorgeschlagen (Scholz *et al.*, 2003). Dies ist bei CAD Mg^{2+} , aus dessen äußerer Hydrathülle vermutlich das Wasser stammt, das als allgemeine Säure nach erfolgter Spaltung die Abgangsgruppe protoniert. Die Koordinierung des Metallions durch Asp262 und His308 wurde durch die Kristallstrukturdaten bestätigt (Woo *et al.*, 2004).

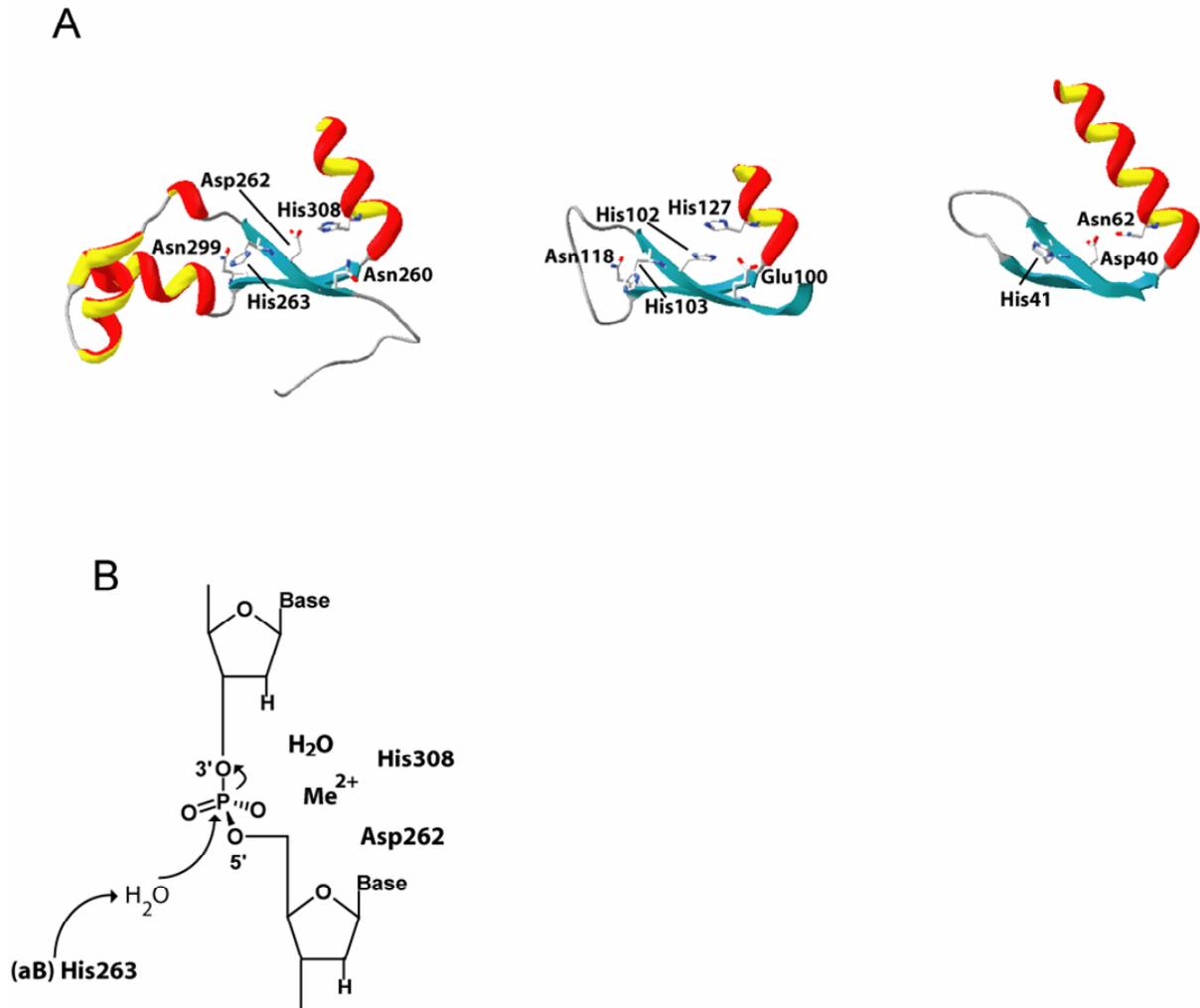


Abb. 3-11: Strukturmodell des aktiven Zentrums und Mechanismus der Phosphodiestererspaltung durch die Capase-aktivierte DNase

A Strukturmodell des aktiven Zentrums, dem $\beta\alpha$ -Me-finger-Motiv, von CAD im Vergleich zu den aktiven Zentren von T4 Endonuklease VII und ColE9. Die für die Struktur des aktiven Zentrums wichtigen und die an der Katalyse beteiligten Reste sind hervorgehoben. Die in T4 Endonuklease VII und ColE9 homologen, katalytisch relevanten Reste wurden auch in CAD gefunden.

B In CAD fungiert His 263 als allgemeine Base und abstrahiert dem Wasser für den nukleophilen Angriff ein Proton. Nach erfolgter Phosphodiestererspaltung wird das 3'-O der Abgangsgruppe durch ein Wassermolekül als allgemeine Säure protoniert. Dieses stammt vermutlich aus der äußeren Hydrathülle von Mg^{2+} , das durch die beiden Aminosäurereste His308 und Asp262 koordiniert wird. Die Koordinierung des Metallions durch zwei korrespondierende Reste wurde auch bei ColE9 mit His102 und His127 in der Ni^{2+} -enthaltenden Struktur und in der Struktur von T4 Endonuklease VII mit Asp40 und Asn62 gesehen.

3.3.7 Funktionen weiterer konservierter Histidine

Für His242 wurde in dieser Arbeit eine strukturelle Rolle ermittelt (s. 3.3.4.4, Abb. 3-8; Meiss *et al.*, 2001), die durch andere Arbeiten bestätigt wurde (Sakahira *et al.*, 2001, Meiss *et al.*, 2001, Woo *et al.*, 20004). His313, im aktiven Zentrum lokalisiert (Scholz *et al.*, 2003, Woo *et al.*, 2004), könnte an der DNA-Bindung und/oder der Prozessivität der Nuklease beteiligt sein (s. Tabelle 3-1; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Die Funktionen von His127 und His304

(s. **Tabelle 3-1**; Sakahira *et al.*, 2001, Meiss *et al.*, 2001) werden in der Diskussion neben denen von His242 und His313 thematisiert (s. **4**).

3.3.8 Funktionen von Lysinen und Tyrosinen

Außer für Histidine wurde in dieser Arbeit durch die Alignment-gesteuerte ortsgerichtete Mutagenese (s. **3.3.4**) zusammen mit der chemischen Modifizierung (s. **3.3**) eine funktionelle Relevanz für die in CAD vollständig konservierten Lysin- (Lys155, Lys301, Lys310) und Tyrosinreste (Tyr170 und Tyr247) festgestellt (s. **Tabelle 3-1**; Korn *et al.*, 2002). Die Funktion von Lys155 ist wahrscheinlich die der Stabilisierung der Helix- $\alpha 4$ (s. **3.5.5**) die an der DNA-Bindung über die große Furche beteiligt ist (s. **3.5.5**; Woo *et al.*, 2004). Für Lys310, im aktiven Zentrum der Nuklease lokalisiert, wäre die Funktion der DNA-Bindung, aber auch der Stabilisierung des pentakovalenten Übergangszustands, denkbar. Für Lys301, im aktiven Zentrum lokalisiert (Woo *et al.*, 2004), und Tyr170, in der Nähe der allgemeinen Base His263 lokalisiert, und Tyr247 sind ebenfalls DNA-bindende Funktionen denkbar (Korn *et al.*, 2002). Die Funktionen der konservierten Lysin- und Tyrosinreste werden in der Diskussion aufgegriffen (s. **4**).

3.3.9 Funktionen von Argininen

Funktionell relevant sind auch die untersuchten Argininreste Arg151, Arg166, Arg168, Arg212, Arg250 und Arg269. Nach den Ergebnissen der Mutagenesestudien (s. **Tabelle 3-1**), der Lokalisation einiger dieser Reste (Woo *et al.*, 2004) und neuerer Untersuchungen (G. Meiss, unveröffentlicht) gibt es unter diesen konservierten Resten gute Kandidaten für die DNA-Bindung. Dies wird in der Diskussion ausführlich thematisiert (s. **4**), ebenso wie die Beteiligung von Arg250 an der Dimerisierung der Nuklease (Woo *et al.*, 2004).

3.4 ICAD-S (DFF35)

Im Laufe dieser Arbeit wurde die kürzere ICAD-Isoform ICAD-S (DFF35) mit CAD (DFF40) in *E. coli* exprimiert, gereinigt und auf chaperone Eigenschaften sowie Nukleasebindung und Inhibition untersucht. Als Referenz diente DFF45.

3.4.1 Herstellung von CAD/ICAD-S-Komplex

Um über die chaperone Aktivität von ICAD-S quantitative Aussagen treffen zu können, die große Proteinmengen erfordern, wurde ein bakterielles Expressionssystem zur Produktion des CAD/ICAD-S Komplexes entwickelt. Mit dem in Materialien und Methoden beschriebenen Zweiplasmidsystem pLK-HisFlag-ICAD-S/pGEX2T-CADWT (s. 2.2.3) war es möglich, die Expression von ICAD-S und GST-CAD unabhängig voneinander zu steuern. Damit war die Möglichkeit gegeben, das potentielle Chaperon ICAD-S in ausreichenden Mengen vorzulegen, damit sich die anschließend exprimierte Nuklease daran korrekt falten kann und dadurch ihre nukleolytische Aktivität erhält.

3.4.1.1 Systemkonstruktion

3.4.1.2 Expressionsstrategie

Zur Expression von GST-CAD/ICAD-S wurden TGE900-Zellen (s. 2.2.2) verwendet. Die Zellen wurden mit pLK-HisFlag-ICAD-S und pGEX2T-CADWT (s. 2.2.3) transformiert (s.2.2.5.1) und in LB-Medium (s. 2.2.1) kultiviert. Bei einer Zelldichte von 0.5 OD^{600} erfolgte die Expression von ICAD-S mit pLK-HisFlag-ICAD-S unter Kontrolle des λ_{PL} -Promotors durch einen Temperaturshift von 28 auf 42° C für 45 min (s. 2.5.1.3). Anschließend wurde die Expression der Nuklease mit pGEX2T-CADWT unter Kontrolle des *tac*-Promotors durch Zugabe von IPTG für 45 min induziert (s. 2.5.1.2). Die Expression beider Gene wurde bei 28 °C ü. N. fortgeführt. Eine Kinetik der Expression findet sich nachfolgend (s. **Abb. 3-12**).

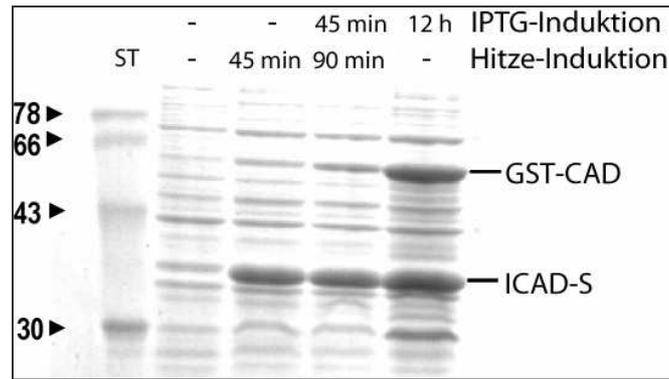


Abb. 3-12: Kinetik der Expression von GST-CAD/ICAD-S Komplex

Die Expression von ICAD-S mit pLK-HisFlag-ICAD-S wurde bei 42 °C induziert und nach 90 min bei 28 °C ü. N. fortgeführt. Nach Vorlegen des Inhibitors für 45 min erfolgte durch IPTG-Induktion die Expression von GST-CAD mit pGEX2T-CADWT erst bei 42 °C für 45 min und dann ü. N. bei 28 °C.

3.4.1.3 Reinigung der Proteine

Der lösliche Komplex mit ICAD-S wurde anschließend mittels Affinitätschromatographie über den N-terminalen GST-Fusionsanteil der Nuklease gereinigt (s. 2.5.4.2) und mit SDS-PAGE analysiert (s. Abb. 3-13). Anschließend wurden die Proteine zur Entfernung von reduziertem Glutathion gegen einen Puffer mit 20 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 10 mM DTT und 0.01 % Chaps dialysiert. Mit gleicher Expressions- (s. 3.4.1.2) und Reinigungsstrategie wurde unter Verwendung von pLK-His-DFF45 (s. 2.2.3) auch GST-CAD/DFF45 (ICAD-L) hergestellt (s. Abb. 3-13), das die Referenz DFF45 für die Charakterisierung von ICAD-S lieferte.

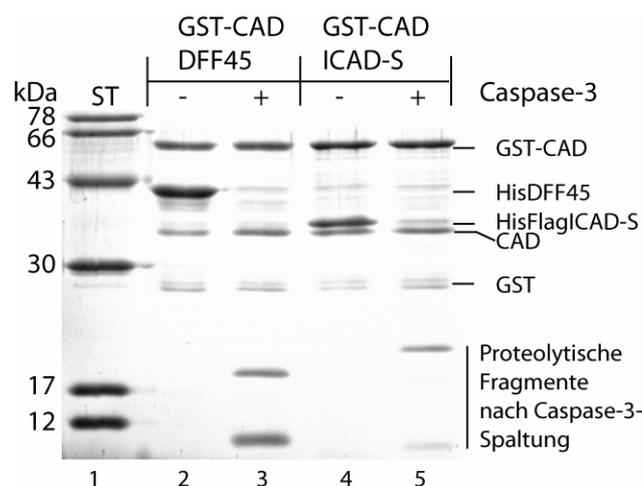


Abb. 3-13: Affinitätschromatographische Reinigung von DFF mit DFF45 (GST-CAD/DFF45) und ICAD-S (GST-CAD/ICAD-S) vor und nach Caspase-3 Aktivierung

Mit Glutathion-Sepharose erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung von DFF mit den beiden Isoformen des Inhibitors DFF45 (ICAD-L), (Spur 2) und ICAD-S (DFF35), (Spur 4) über den

GST-Fusionsanteil von DFF40 (CAD). Nach Caspase-3 Aktivierung der Nuklease aus den Komplexen sind die Spaltfragmente der Inhibitoren mittels SDS-PAGE nachzuweisen (Spur 3 u. 5).

3.4.2 Biochemische Charakterisierung von CAD/ICAD-S

3.4.2.1 Interaktion mit CAD (DFF40)

Schon die Co-Reinigung von GST-CAD mit ICAD-S dokumentiert die Interaktion dieser beiden Proteine (s. Abb. 3-13), die auch bei GST-CAD und DFF45 zu beobachten ist (s. Abb. 3-13).

3.4.2.2 Untersuchung auf chaperone Eigenschaften

Zur Bestimmung der chaperonen Aktivität von ICAD-S wurde GST-CAD aus den Komplexen mit ICAD-S und DFF45 durch Caspase-3 freigesetzt und in Aktivitätsassays (s. 2.6.5) eingesetzt. Auf Agarosegelen konnte die nukleolytische Aktivität von CAD aus dem Komplex mit ICAD-S nachgewiesen werden (s. Abb. 3-14 A Spur 4), was auf eine chaperone Funktion dieser Isoform hinweist. Die Nuklease aus dem Komplex mit DFF45 ist jedoch viel aktiver (s. Abb. 3-14 A Spur 2) und somit ist diese längere Isoform das effektivere Chaperon. In Kinetiken der Aktivität mit GST-CAD, freigesetzt aus den Komplexen mit ICAD-S bzw. DFF45, wurden aus der Abnahme von scPlasmid-DNA (s. Abb. 3-14 B) Anfangssteigungen berechnet, die die relative chaperone Aktivität von ICAD-S auf 1/40 von der der längeren Isoform DFF45 (ICAD-L) ermittelten (s. Abb. 3-14 B).

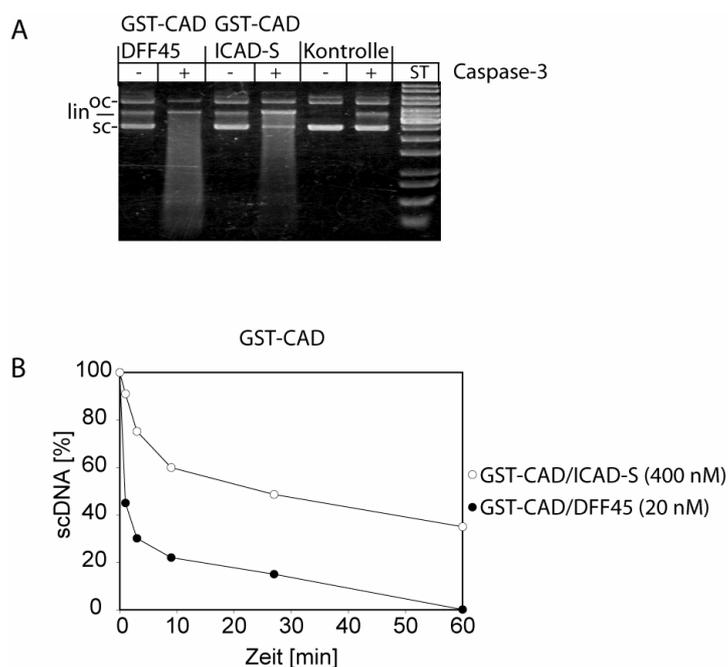


Abb. 3-14: Nachweis der chaperonen Eigenschaft von ICAD-S für CAD (DFF40)

A In Aktivitätstests wurde die Aktivität von CAD ermittelt, das einerseits mit DFF45 und andererseits mit ICAD-S exprimiert wurde. Die Nuklease, freigesetzt aus dem Komplex mit ICAD-S, ist nukleolytisch aktiv (Spur **4**), wodurch eine chaperone Funktion von ICAD-S für CAD belegt ist. Diese ist gegenüber der chaperonen Aktivität von DFF45 allerdings schwächer (Spur **2**). Die Inhibitorfunktion der beiden Isoformen wurde in Aktivitätstests mit DFF-Komplex nachgewiesen. Die Inhibition von CAD, sowohl im Komplex mit ICAD-S (DFF35) (Spur **3**) als auch mit DFF45 (ICAD-L) (Spur **1**), ist auf Agarosegelen zu erkennen und zeigt mit beiden Inhibitoren keine Unterschiede.

B Zur Quantifizierung der chaperonen Aktivität von ICAD-S wurden Kinetiken der nukleolytischen Aktivität von GST-CAD, aus dem Komplex mit ICAD-S (DFF35) und DFF45 (ICAD-L) freigesetzt, mit scPlasmid-DNA durchgeführt. Durch die Abnahme des scPlasmids wurde die Aktivität der Nuklease bestimmt. Diese Aktivität spiegelt die chaperone Funktion der Inhibitoren wider, die für ICAD-S (DFF35) auf 1/40 von DFF45 (ICAD-L) bestimmt wurde. GST-CAD in Gegenwart von ICAD-S (DFF35) produziert (offene Kreise), GST-CAD in Gegenwart von DFF45 (ICAD-L) produziert (ausgefüllte Kreise).

3.4.2.3 Inhibition der Nuklease durch ICAD-S

In Aktivitätsassays eingesetzter GST-CAD/ICAD-S-Komplex zeigt genauso wie der GST-CAD/DFF45-Komplex keine DNA-Spaltung ohne Aktivierung durch Caspase-3 (s. **Abb. 3-14** Spur **3**). Später in der Arbeitsgruppe durchgeführte Inhibitionsversuche lassen sogar vermuten, dass die kurzen Isoformen besser als die langen Isoformen inhibieren (Daten nicht gezeigt; Korn und Scholz *et al.*, 2005).

3.5 DNA-Bindung von DFF

3.5.1 Die Bedeutung der DNA-Bindung von DFF

Der Nachweis der DNA-Bindung ist bei unspezifischen Nukleasen und DNase/Inhibitor-Komplexen sehr ungewöhnlich. Im Laufe dieser Arbeit konnte mit DFF sowohl für den Komplex als auch für die aktivierte Nuklease DFF40 (CAD) DNA-Bindung gezeigt werden (s. **3.5.2**). DNA-Bindung von DFF stellt einen neuen, bislang unbekanntem Mechanismus der Nukleaseinhibition dar, bei dem zwar die DNA-Spaltung verhindert, aber die DNA-Bindung zugelassen wird (s. **3.5.4 - 3.5.6**). Außerdem wurde eine Stimulation der Aktivität von DFF40 (CAD) durch Aktivierung aus einem DNA-gebundenen DFF-Komplex mit Plasmid-DNA und auch mit isolierten Kernen festgestellt (s. **3.5.7**) (Korn und Scholz *et al.*, 2005). Diese Tatsache und die beobachtete Assoziation von DFF mit Chromatin (Korn und Scholz *et al.*, 2005) implizieren einen Mechanismus, bei dem die Aktivierung von DFF während der Apoptose im Zellkern in DNA-gebundener Form stattfinden kann (s. **4.1.2 u. 4.1.3**).

3.5.2 Präparation der Komplexe für DNA-Bindungsexperimente

Für die im Folgenden beschriebenen DNA-Bindungsstudien wurden affinitätschromatographisch gereinigte His-DFF (His-CAD/DFFF45) (s. 3.1.3.4) und GST-DFF (GST-CAD/DFFF45) (s. 3.3.3.3) -Komplexe sowie thrombinbehandelter GST-DFF (s. 2.5.6) nach zusätzlicher Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie (s. 2.5.5 u. 3.1.3.5) eingesetzt.

3.5.3 Nachweismethoden

Diese reinen Proteinpräparationen (s. 3.5.2) wurden zur Überprüfung der DNA-Bindung in *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (s. 2.6.9.1), Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (s. 2.6.9.2) und *Photocrosslink*-Versuchen (s. 2.6.9.4) eingesetzt.

3.5.4 Bindung von DFF und freier Nuklease an DNA-Substrate verschiedener Größe

His-DFF (s. Abb. 3-15, A), wie beschrieben präpariert (s. 3.5.2), und die daraus freigesetzte Nuklease (s. 2.6.2) wurden auf DNA-Bindung mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (s. 2.6.9.1) und *Photocrosslink*-Experimenten (s. 2.6.9.4) untersucht. Sowohl DFF als auch die freie Nuklease DFF40 (CAD), eingesetzt in einer Konzentration von 5 μM , induzieren deutliche Shifts von scPlasmid-DNA (ca. 500 x geringer konzentriert als DFF/DFF40), was per Elektrophorese in 0.8 % -igen Agarosegelen analysiert werden konnte (s. Abb. 3-15 B, Spur 2 u. 4). Dabei ist zu beobachten, dass die Komplexe mit DFF40 (CAD) in den Taschen „festhängen“ (s. Abb. 3-15 B, Spur 4). Aufgrund der Oligomerisierung der Nuklease, nach ihrer Freisetzung aus dem Komplex, bilden sich vermutlich hochmolekulare DNA-Nuklease-Komplexe aus, die aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sind, in die Gelmatrix einzuwandern. Der manchmal zu beobachtende „Schmier“ im Falle von DFF40 (CAD) -DNA-Komplexen weist auf eine unter den experimentellen Bedingungen im Vergleich zu DFF weniger stabile DNA-Bindung hin (Daten nicht gezeigt). Nach Mg^{2+} -Zugabe wird die DNA gespalten und es ist keine DNA-Bindung mehr in den Gelretardationsexperimenten nachweisbar (s. Abb. 3-15 B, Spur 8). Neben scPlasmiden sind auch PCR-Produkte unterschiedlicher Länge Substrate für DFF. Die Analyse von Shiftansätzen (s. 2.6.9.1) auf 6 % -igen nichtdenaturierenden Acrylamidgelen zeigt DFF-DNA-Komplexe mit PCR-Produkten der Länge 822 bp, 578 bp, 376 bp und 130 bp, die jedoch aufgrund ihrer Größe nur wenig in die Gelmatrix einwandern (s. Abb. 3-15 C). Die Bindung von DFF an Oligonukleotide wurde mit Hilfe von *Photocrosslink*-Experimenten untersucht (s. 2.6.9.4). Als Substrat diente ein 39 bp großes Oli-

godesoxyribonukleotid mit drei zentralen 5-Iododesoxyuridinen in einem Strang als UV-induzierbarer *Cross-Linker*. Mit ^{32}P wurde die DNA 5'-terminal markiert. Das Autoradiogramm, mit SDS-PAGE erzeugt, zeigt die Bindung von DFF und aktivierter Nuklease an die DNA (s. **Abb. 3-15 D**). Eingesetzt wurden die jeweiligen Bindungspartner in äquimolarer Konzentration ($5\ \mu\text{M}$). DFF hat Präferenzen für die Bindung größerer Nukleinsäuren ($> 130\ \text{bp}$) (s. **Abb. 3-15, B - D**).

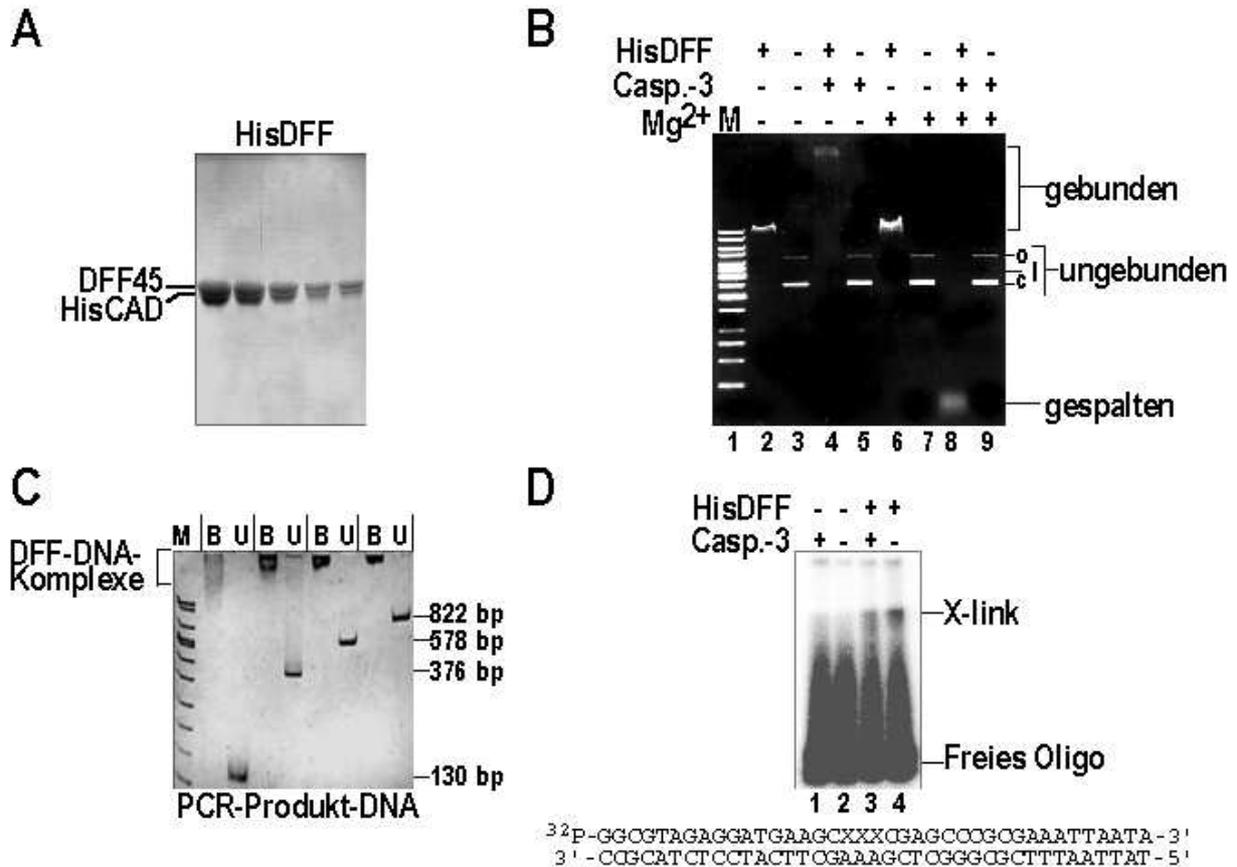


Abb. 3-15: DNA-Bindung von DFF mit Substraten verschiedener Größe

A Rekombinanter His-DFF, der wie beschrieben exprimiert, affinitätschromatographisch und zusätzlich durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt wurde (s. 3.1.3.2 - 3.1.3.5), wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

B His-DFF sowie die daraus aktivierte Nuklease induzieren Shifts von scPlasmid-pBSVDEX (s. 2.2.3) in 0.8 % -igen Agarosegelen. Nach Mg^{2+} -Zugabe ist dagegen Spaltung durch die aktivierte Nuklease zu erkennen.

C DFF bindet PCR-Produkte der gekennzeichneten Länge mit Präferenzen für längere Substrate. Im Falle der Analyse über PAGE mit 6 %-igen Gelen ist nur ein geringes Einlaufen der DNA-DFF-Komplexe zu erreichen, was auf sehr hochmolekularen Komplex oder Aggregate hinweist.

D DFF und die freie Nuklease binden in Cross-Link Experimenten an ein 39 bp großes Oligodesoxyribonukleotid mit drei zentralen 5-Iododesoxyuridinen in einem der Stränge (Autoradiogramm nach SDS-PAGE der *Photocrosslink*-Ansätze).

3.5.5 Die Nukleaseuntereinheit vermittelt die DNA-Bindung von DFF

Zur Identifizierung der DNA-bindenden Untereinheit in DFF wurden GST-DFF, die aus diesem Komplex durch Caspase-3 Spaltung freigesetzte Nuklease GST-CAD, His-DFF45 und zur Kontrolle auch GST präpariert (s. **Abb. 3-16 B**) und in Shift-Assays (s. **2.6.9.1**) eingesetzt. Ebenfalls auf dem SDS-Gel erkennbar und in Shift-Assays eingesetzt wurde eine GST-DFF-Variante (GST-DFFN-H263N) mit einer katalytisch inaktiven Nukleaseuntereinheit (GST-CAD-H263N) und die aus diesem Komplex freigesetzte Nuklease (GST-CADH263N) (s. **Abb. 3-16 B**). H263 ist Teil eines β -Faltblattes des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs im aktiven Zentrum der Nuklease (s. **Abb. 3-16 A**) und als allgemeine Base an dem Mechanismus der DNA-Spaltung beteiligt. Diese Mutante ist aufgrund des Austauschs H263N katalytisch inaktiv und wurde im Komplex und in freigesetzter Form auf DNA-Bindungsfähigkeit getestet. Während der Wildtyp-DFF-Komplex sowie die daraus freigesetzte DNase auf 0.8 % -igen Agarosegelelen stabile Shifts mit pBSVDEX (s. **2.2.3**) induzieren (s. **Abb. 3-16 B**, Spur **3 u. 4**), sind DFF45 und GST nicht in der Lage, DNA-Shifts zu erzeugen (s. **Abb. 3-16 B**, Spur **7 u. 8**). Dies legt nahe, dass die nukleolytische Untereinheit in DFF für die DNA-Bindung verantwortlich ist. DFF mit der inaktiven Nukleasevariante (GST-DFF_{N-H263N}) sowie die freie Nuklease-Variante selbst führen zu nahezu identischen DNA-Shifts wie der Wildtyp (s. **Abb. 3-16 B**, Spur **5 u. 6**). Der Austausch von His nach Asn blieb für den DNA-Bindung von DFF und freier Nuklease ohne Folgen. Nach Mg^{2+} -Zugabe kommt es bei der aktivierten WT-Nuklease zur DNA-Spaltung (s. **Abb. 3-16 B**, Spur **13**), während die freigesetzte inaktive Variante, für die der Austausch den Verlust der allgemeinen Base im Mechanismus der DNA-Spaltung bedeutet, auch nach Zugabe von Mg^{2+} die DNA stabil bindet und deren Mobilität im Agarosegel herabsetzt (s. **Abb. 3-16 B**, Spur **15**). Weitere Hinweise auf die DNA-bindende Untereinheit von DFF sollte die DFF-Variante DFF_{N-K155Q} liefern. In der Nuklease-Untereinheit dieses Komplexes wurde Lys155 durch Gln ersetzt. Die Struktur der Nuklease zeigt, dass Lys155 in der Helix- $\alpha 4$ lokalisiert ist. Diese längste α -Helix in CAD paßt gut in die große Furche der DNA (s. **Abb. 3-16 A**, Modell nach Woo *et al.*, 2004) und könnte somit ein DNA-bindendes Zentrum jenseits des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs, des eigentlichen aktiven Zentrums, bilden. Demnach ist für K155 eine Funktion bei der DNA-Bindung oder der Stabilisierung dieser Helix zu vermuten. Der Austausch K155Q könnte diese möglichen Funktionen beeinträchtigen. In den hierzu durchgeführten Experimenten wurden DFF_{N-K155Q}, DFF_{N-H263N} und WT-DFF durch Abspaltung des GST-Fusionsanteils der Nukleasen mit Thrombin aus den mit GST fusionierten Komplexen (s. **2.5.6**) erhalten und in Shift-Assays eingesetzt (s. **2.6.9.1**) (s. **Abb. 3-16 C**). Der GST-

Fusionsanteil wurde abgespalten, um auszuschließen, dass die zuvor beobachtete DNA-Bindung durch ihn beeinflusst wird. Wie schon für GST-DFF-Komplexe gezeigt (s. **Abb. 3-16 B**, Spur 3 u. 5), schieben auch DFF_{N-H263N} und DFF die DNA (s. **Abb. 3-16 C**, Spur 2 u. 3). DFF_{N-K155Q} ist dagegen nicht in der Lage, die DNA zu schieben, was dafür sprechen könnte, dass Lys155 in der Tat zu einem zweiten, nicht katalytischen DNA-bindenden Zentrum gehört, das durch den vorgenommenen Aminosäureaustausch eine Störung erfährt. Diese Vermutung wird im Diskussionsteil aufgegriffen (s. 4).

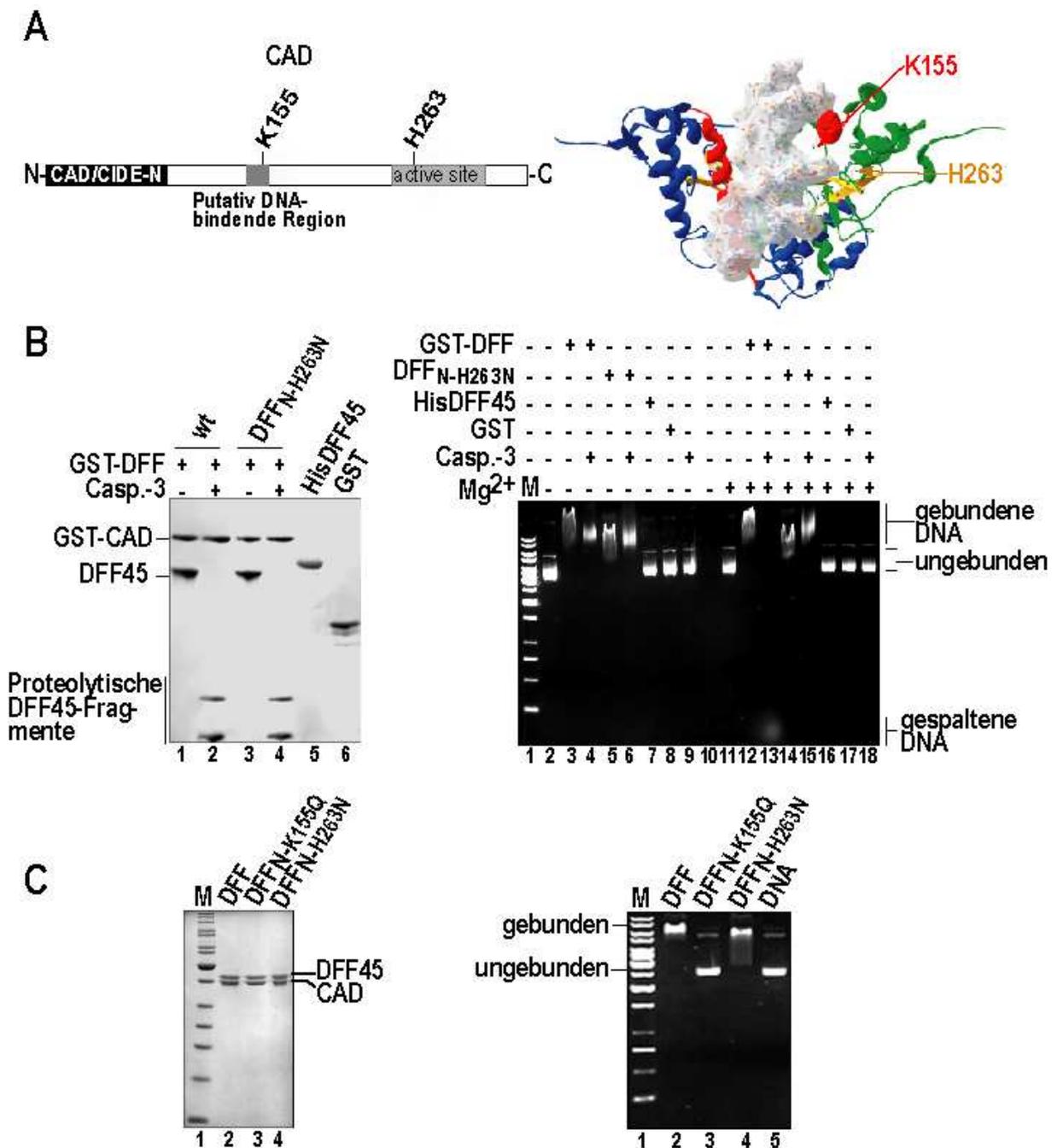


Abb. 3-16: DNA-Bindung von DFF und der daraus aktivierten Nuklease DFF40

A In der linken Figur wird schematisch die Lokalisation der Positionen von Lys155 in einer putativen DNA bindenden Region und His263 im aktiven Zentrum von CAD dargestellt. Die rechte Figur zeigt ein Modell der DNA-Bindung von CAD, das aus der bekannten Nuklease-Struktur (Woo *et al.*, 2004) erstellt wurde (Dr. G. Meiss). Die Darstellung des CAD-Dimers erfolgt in grün-blau, die der DNA in grau/weiß. Zwei Reste sind hervorgehoben: Lys155 ist in der mit rot gekennzeichneten Helix- $\alpha 4$ lokalisiert, die in die große Furche der DNA paßt. His263 ist Teil des aktiven Zentrums ($\beta\beta$ -Me-finger-Motiv), das vermutlich über die kleine Furche mit der DNA interagiert und diese dann spaltet.

B In der linken Figur (Coomassie-gefärbtes SDS-Gel) sind GST-DFF-Komplexe mit Wildtyp-Nuklease und der Variante H263N vor und nach Caspase-3-Spaltung des Inhibitors, sowie His-DFF45 und GST zu erkennen. Die rechte Figur zeigt Shiftansätze mit scPlasmid pBSVDEX und den genannten Proteinen auf einem 0.8 % -igen Agarosegel. Wildtyp DFF und die daraus aktivierte Nuklease induzieren stabile Shifts der Plasmid-DNA (Spur 3 u. 4) ähnlich wie DFF_{N-H263N} vor und nach Freisetzung der Nuklease (Spur 5 u. 6). Nach Zugabe von Mg²⁺ erfolgt DNA-Spaltung von aktiviertem DFF (Spur 13) und DNA-Bindung der freigesetzten, katalytisch inaktiven Nuklease-Variante H263N (Spur 15). His-DFF45 ist mit und ohne Mg²⁺ nicht in der Lage einen stabilen DNA-Shift zu erzeugen (Spur 7 u. 16), wodurch ein Hinweis gegeben ist, dass die DNA-Bindung von DFF über die Nuklease erfolgt. Zu erwähnen bleibt die GST-Kontrolle, die sich wie der Inhibitor verhält (Spur 8 u. 17). **C** In der linken Figur (Coomassie-gefärbtes SDS-Gel) sind die Komplexe DFF, DFF_{N-H263N} und DFF_{N-K155Q} dargestellt, die in DNA-Shiftexperimenten eingesetzt wurden. Die Analyse auf einem 0.8 % -igen Agarosegel, rechte Figur, ergab für DFF und DFF_{N-H263N} einen stabilen Shift (Spur 2 u. 4). Der Komplex mit der Nuklease-Variante K155Q dagegen shiftet die DNA nicht (Spur 3), was ein weiterer starker Hinweis auf DFF40 (CAD) als DNA-bindende Untereinheit von DFF ist.

3.5.6 Elektronenmikroskopische Dokumentation der DNA-Bindung von DFF und aktivierter Nuklease

In Kooperation mit Dr. R. Lurz, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, entstanden mit Transmissions-Elektronenmikroskopie (s. 2.6.9.2) Aufnahmen der Bindung von DFF und DFF40 (CAD) an scPlasmid pBSVDEX (s. 2.2.3). Der molare Überschuss von DFF (bis 300 ng eingesetzt) zu DNA (30 ng eingesetzt) betrug 30:1 - 300:1. Zu erkennen ist die konzentrationsabhängige, unspezifische Bindung von DFF an scPlasmid-DNA bei molaren Verhältnissen (DFF zu DNA) von 30:1 - 300:1, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Mg²⁺ (s. Abb. 3-17 A). Bei hohen DFF-Konzentrationen, die den molaren Verhältnissen von 150 - 300:1 entsprechen, ist eine Aggregation dieses Komplexes auf der DNA nachzuweisen (s. Abb. 3-17 A). Diese Aggregate binden mehrere Plasmidmoleküle (s. Abb. 3-17 A). Caspase-3 aktivierte DFF40 (CAD) -Nuklease bindet ebenfalls unspezifisch DNA, nach Mg²⁺-Zugabe wird diese allerdings wie in Gelshiftexperimenten in kurze lineare Fragmente gespalten (s. Abb. 3-17 B). Die Kontrolle, Caspase-3, bindet keine DNA und spaltet sie auch nicht in Gegenwart von Mg²⁺ (s. Abb. 3-17 B). Die konzentrationsabhängige Bindung von DFF an DNA ist auch bei Gelshiftexperimenten (s. 2.6.9.1) zu sehen. Die Induktion von Shifts erfolgt erst bei einer DFF-Konzentration von 0.5 μ M, entsprechend einem DFF-Überschuss von 50:1 (s. Abb. 3-17 A). Die Konzentrationsverhältnisse von DFF zu scPlasmid-DNA von 500:1 bei 5 μ M DFF im Gelshift sind den Bedingungen der elektronenmikroskopischen Analyse mit 300:1 und 300 nM DFF sehr ähnlich (s. Abb. 3-17 A).

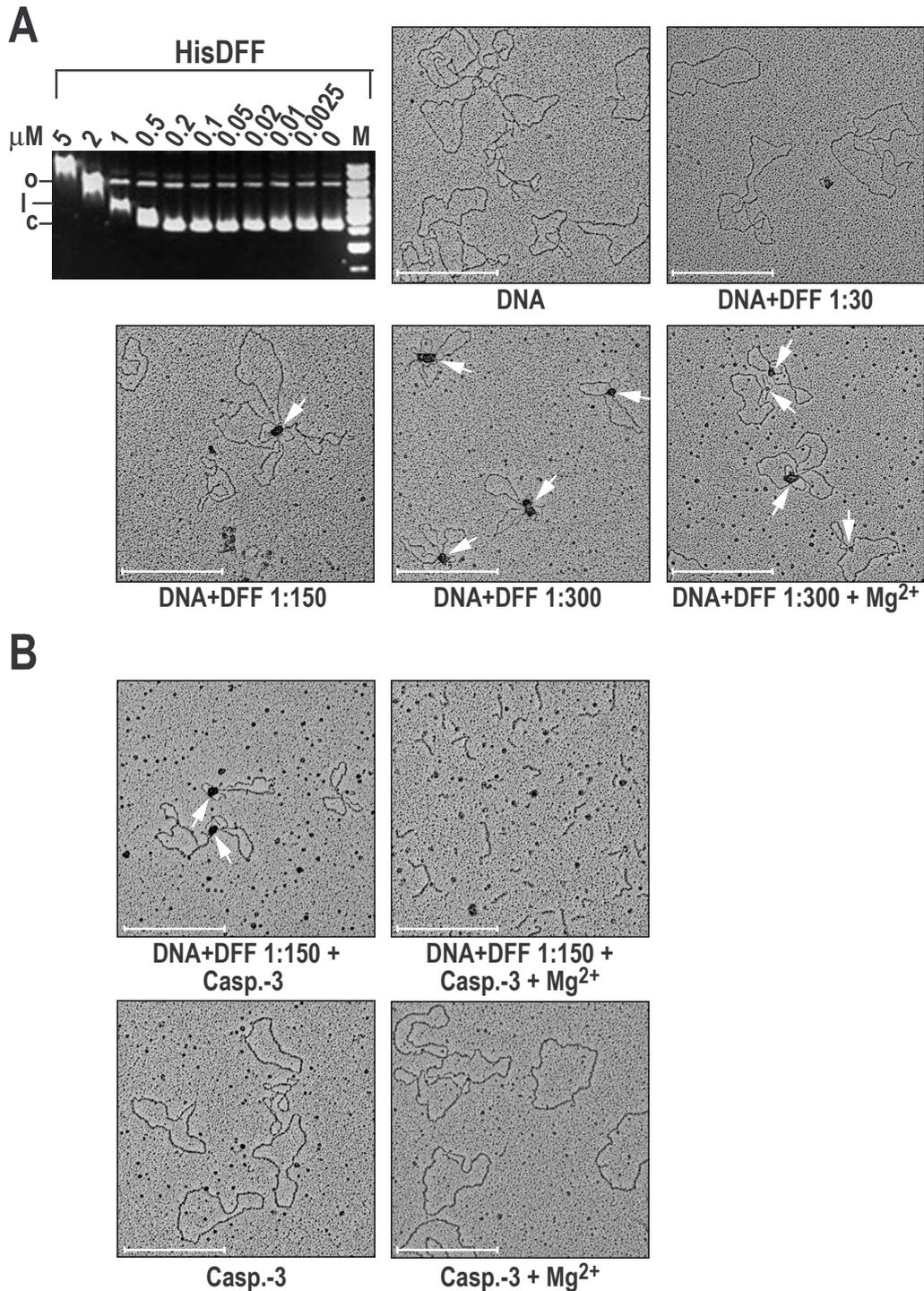


Abb 3-17: Transmissionselektronenmikroskopische Dokumentation der DNA-Bindung von DFF
A Agarosegelelektrophorese zur Dokumentation der konzentrationsabhängigen Erzeugung von Plasmid-DNA-Shifts durch DFF und elektronenmikroskopische Aufnahmen von DFF-Aggregaten an Plasmid DNA. Oben links: Analyse von Plasmid-DNA-Shifts in 0.8% -igen Agarosegelen. Oben rechts und folgende: DFF bindet bei ansteigendem molarem Überschuss über DNA von 30:1 - 300:1, auch in Anwesenheit von Mg²⁺ (Bild unten rechts) DNA. In hoher Konzentration eingesetzter DFF bildet dabei Aggregate, die mit mehreren Molekülen Plasmid-DNA assoziiert sind (hervorgehoben anhand weißer Pfeile). Die Bedingungen in den Shiftansätzen (DFF in 500 -fachem Überschuss bei einer Konzentration von 5 μM) und in den Ansätzen zur Elektronenmikroskopie (DFF in 300 -fachem

Überschuss bei einer Konzentration von 0.3 μM) sind vergleichbar. Der weiße Balken umfasst eine Distanz von 500 nm.

B Elektronenmikroskopische Aufnahmen der scPlasmid-DNA-Bindung von freier Nuklease (CAD) nach Caspase-3-Aktivierung. Gezeigt wird oben links die Bindung von CAD, an Plasmid-DNA (150-facher Überschuss über DNA). In Anwesenheit von Mg^{2+} wird die DNA bei gleichen molaren Verhältnissen durch die aktivierte Nuklease in kurze lineare Fragmente gespalten (oben rechts). Die Kontrolle Caspase-3 bildet keine Komplexe mit der DNA (unten links) und spaltet sie auch nicht in Gegenwart von Mg^{2+} (unten rechts). Der weiße Balken umfasst eine Distanz von 500 nm.

3.5.7 Stimulation der Nukleaseaktivität durch DNA-Bindung von DFF vor oder während DFF40-(CAD) Aktivierung

Zur Überprüfung, ob durch DNA-Bindung von DFF vor oder während der Aktivierung dieses Komplexes mit Caspase-3 eine Stimulation der nukleolytischen Aktivität der freigesetzten Nuklease zu verzeichnen ist, wurden *Time-order-of-addition*-Experimente durchgeführt. Die genaue Durchführung dieser Experimente wird im Methodenteil ausführlich beschrieben (s. 2.6.7). Es wurden drei Ansätze mit unterschiedlicher Reihenfolge für die Ereignisse der DNA-Bindung, der DFF-Aktivierung und der DNA-Spaltung durch die freigesetzte Nuklease pipettiert. Die agarosegelelektrophoretische Analyse (s. 2.6) dieser Ansätze (s. **Abb. 3-18**) ergab für die Aktivität von DFF40 (CAD) in einem Ansatz **1**, indem DFF zuerst mit DNA inkubiert und dann durch Caspase-3 aktiviert wurde, eine stärkere Substratspaltung, als dies für den Ansatz **2** zu beobachten war. In diesem wurde DFF zuerst mit Caspase-3 aktiviert und dann mit DNA inkubiert. Die Analyse des Ansatzes **3**, in dem die Aktivierung durch Caspase-3 und die Inkubation mit DNA gleichzeitig stattfand, ergab eine ähnliche Aktivität von DFF40 (CAD), wie für Ansatz **1** beobachtet. Die quantitative Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten belegt diese Beobachtung (s. **Abb. 3-18**).

Diese Untersuchungen mit DFF, durchgeführt an isolierten Kernen, ergaben das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse mit Plasmid-DNA und mit isolierten Kernen legen eine Aktivierung von DFF in DNA-gebundener Form nahe. Zur Kontrolle, ob die Inkubation der freigesetzten Nuklease bei 37 °C zu Stabilitätsproblemen und somit zu der geringen Aktivität von DFF40 in Ansatz **2** führt (s. **Abb. 3-18**), wurde DFF aktiviert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 0 min, 15 min und 30 min wurden Aliquots entnommen und auf Nukleaseaktivität in einem Hyperchromizitätsassay mit Lachssperma-DNA untersucht. Eine zeitabhängige Abnahme der Aktivität wurde nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt). In einer weiteren Kontrolle wurde ermittelt, dass die Proteolyserate des Inhibitors DFF45 im Verlauf der Spaltung mit Caspase-3 in dem Ansatz **2** und in den beiden anderen Ansätzen gleich ist (Daten nicht gezeigt), wodurch gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von DFF von der DNA-Bindung nicht beeinflusst wird.

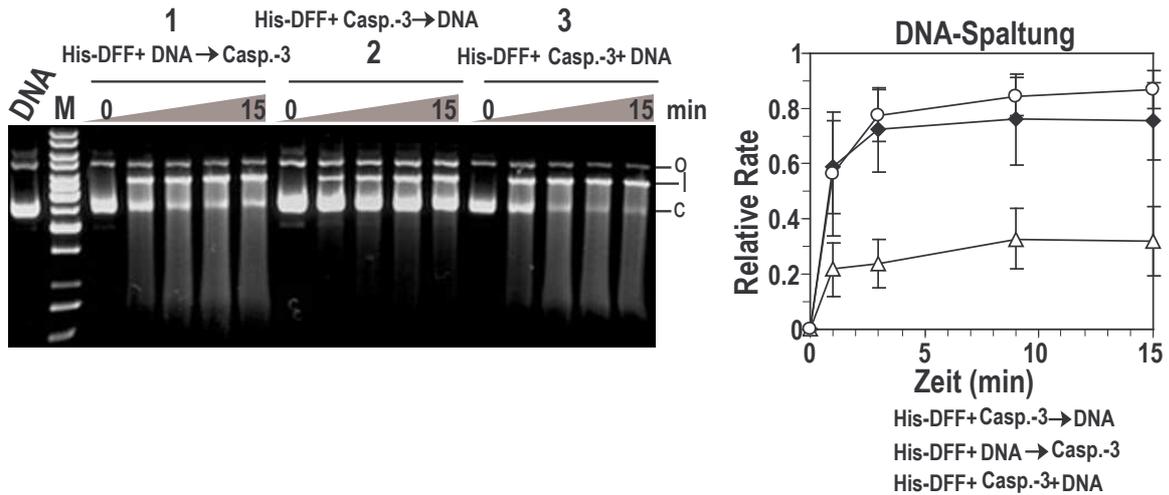


Abb. 3-18: Steigerung der Nuklease-Aktivität durch DNA-Bindung von DFF vor oder während der Aktivierung durch Caspase-3 in *time-order-of-addition*-Experimenten

Die Agarosegel-Analyse von *time-order-of-addition*-Experimenten zeigt DNA-Spaltkinetiken mit der Nuklease, die aus einem DFF-Komplex mit DNA-Bindung vor = **2**, nach = **1** oder während = **3** der Aktivierung durch Caspase-3 resultiert. Die Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigt die Stimulation der DFF40-Aktivität durch Aktivierung aus DFF in DNA-gebundener Form.

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines effektiven Expressionssystems für DFF

Zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung von DFF musste zu Beginn dieser Arbeit zunächst ein effektives Expressionssystem etabliert werden, das es erlaubt, die beiden Untereinheiten dieses heterodimeren Komplexes in hoher Konzentration und Reinheit zu produzieren. Im Falle von DFF zeigten sich Zweiplasmidsysteme den bicistronischen Expressionssystemen überlegen. Mit einem der in dieser Arbeit verwendeten Systeme wurde zudem die Möglichkeit geschaffen, die beiden Untereinheiten von DFF zeitlich unabhängig voneinander in *E. coli* zu koexprimieren. Dies erlaubt die Vorlage des für die Faltung von DFF40(CAD) obligaten Chaperon/Inhibitors DFF45/35 ICAD-L (-S) in *E. coli* Zellen und imitiert somit weitestgehend die Verhältnisse in Säugerzellen, in denen die inhibitorische Untereinheit des DFF Komplexes in der Regel im Überschuss vorliegt.

Ein weiteres Problem lag in der Entfernung kontaminierender hochpolymerer DNA aus Zelllysaten insbesondere dann, wenn große Mengen an DFF im 10-L Maßstab in Fermentern produziert wurde. Zur Überwindung dieses Problems wurde dem Zelllysat DNase I oder *Serratia*-Nuklease zugesetzt. Die Spaltung der hochmolekularen DNA durch diese DNasen, führte einerseits dazu, dass die Adsorption des DFF-Komplexes an der Ni-NTA-Matrix verbessert wurde und die sich anschließende Anionenaustauschchromatographie, bei der die Nukleasen nachweislich quantitativ entfernt wurden, problemlos verlief. Die Ausbeuten eines solchen Expressions- und Reinigungssystems für DFF lagen bei etwa 50 mg/10-L *E. coli* Kultur.

4.2 Charakterisierung des aktiven Zentrums

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Aminosäureresten, die für die katalytische Aktivität der apoptotischen Nuklease CAD (DFF40) essentiell sind. Als Resultat eines Alignments homologer Nukleasen von fünf verschiedenen Spezies, Maus, Ratte, Mensch, Zebrafisch und Taufliège, wurden sechs konservierte Histidine in der C-terminalen katalytischen Domäne dieser Nukleasen identifiziert (Meiss *et al.*, 2001). Davon waren nach der Nummerierung von muriner Nuklease His242, His263, His304 und His308 völlig und His127 und His313 teilweise konserviert. His127 entspricht Ser126 in der Zebrafisch-Nuklease und His313

dem Rest Arg418 in der Drosophila-Sequenz. Histidine sind bekannt für ihre Lokalisation in aktiven Zentren mehrerer unspezifischer Nukleasen, z. B. DNase I (Suck *et al.*, 1984), *Serratia*-Nuklease (Miller *et al.*, 1994) und Colicin E9 DNase (Kleanthous *et al.*, 1999), wo sie als allgemeine Säure oder Base im Mechanismus der Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen fungieren. Chemische Modifizierungsexperimente deuteten auf die Wichtigkeit von Histidinen für die Aktivität von CAD hin (Meiss *et al.*, 2001). Um herauszufinden, welche der konservierten Histidinreste für die katalytische Funktion von Bedeutung sind, wurden die Reste His127, His242, His263, His304, His308 und His 313 in CAD gegen Asparagin und einige von ihnen auch gegen Aspartat, Glutamat und Arginin ausgetauscht und die entstandenden Varianten auf ihre Eigenschaften im Vergleich zur Wildtyp-Nuklease untersucht. Die Ergebnisse dieser Mutationsuntersuchungen ergaben ebenfalls eine essentielle Beteiligung von Histidinen an der Katalyse der Phosphodiesterspaltung (s. **Tabelle 3-1**; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse wurden auch in anderen Arbeiten gefunden, (Sakahira *et al.*, 2001), worauf Nagata und Mitarbeiter eine Zugehörigkeit von CAD zu einer DNase I-artigen Familie vorschlug (Sakahira *et al.*, 2001, Nagata *et al.*, 2003). Aufgrund eigener Vorschläge für die Funktionen von His263 als allgemeine Base und His308 als allgemeine Säure (s. 3.3.5; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002) erfolgte ein manuelles Alignment von CAD-Spezies mit ColE9 DNase, einem Mitglied der H-N-H oder auch $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease-Superfamilie (Walker *et al.*, 2002). Auf der Basis dieses Alignments wurde der Vorschlag gemacht, dass die Reste des H-N-H Motivs von Colicin E9, die allgemeine Base His103, das strukturell bedeutsame Asn118 und der metallbindende Rest His127, ihre Entsprechungen mit His263, Asn299 und His308 in CAD haben und deshalb CAD ein Mitglied der $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen ist, ohne dafür experimentelle Beweise vorzulegen (Walker *et al.*, 2002). Diese Sequenzähnlichkeiten könnten bedeuten, dass CAD und die Mitglieder der der H-N-H- oder auch $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen-Superfamilie, zu der auch ColE9 DNase gehört, über eine gemeinsame Struktur des aktiven Zentrums verfügen und einen ähnlichen Mechanismus der Phosphodiesterspaltung aufweisen. Zur Überprüfung der These, dass CAD ein Mitglied der $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease Familie ist, erfolgte eine Ausweitung des Alignments. Ein Vergleich mit den aktiven Zentren von Mitgliedern dieser Familie ergab Sequenzähnlichkeit von CAD-Proteinen zu ColE9 DNase und T4 Endonuklease VII an kritischen Positionen für Aminosäurereste, die wahrscheinlich als allgemeine Base und als mögliche Metallionenbinder fungieren und diese Proteinfamilien als Mitglieder einer gemeinsamen Familie auszeichnen. Aufgrund von Sequenzähnlichkeit im Bereich von Resten, die für die richtige Konformation des aktiven Zentrums und der Struktur in ColE9 wichtig sind, Glu100 und Asn118, oder die

an der Cofaktor-Bindung von ColE9 (His102) und T4 Endonuklease VII (Asp40) beteiligt sind, wurden in Mutationsstudien von muriner CAD diese Reste ausgetauscht. Asn260 und Asn299 mit strukturellen Funktionen, sowie Asp262 zur Metallionenkoordinierung wurden als essentiell für die Spaltaktivität der Nuklease ermittelt und lieferten einen starken Hinweis auf Ähnlichkeiten der Struktur des aktiven Zentrums sowie im Mechanismus der DNA-Spaltung von CAD mit Mitgliedern der H-N-H oder auch $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease-Superfamilie (Scholz *et al.*, 2003). Auf der Basis der Ergebnisse erfolgte eine Modellierung des aktiven Zentrums von CAD. Das Modell weist eine α -helikale Insertion zwischen den zwei β -Faltblättern des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs auf, erinnert aber sonst stark an die gemeinsamen Merkmale des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs bekannter $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen. Die Ergebnisse der Mutationsstudien (Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002) und die Sequenzähnlichkeiten von CAD zu Mitgliedern der $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nuklease-Superfamilie (Walker *et al.*, 2002, Scholz *et al.*, 2003), ColE9 DNase und T4 Endonuklease VII, identifizierten His263 als allgemeine Base. Schwieriger war die Identifizierung der allgemeinen Säure. Die Protonierung der Abgangsgruppe könnte im Prinzip direkt durch His308 oder Asp262 erfolgen, oder wie für *Serratia*-Nuklease und *I-PpoI*, weiteren Mitgliedern dieser Superfamilie, gefolgert, durch ein Wassermolekül aus der Hydrathülle des zweiwertigen Metallions, das von diesen Resten gebunden wird (Friedhoff *et al.*, 1996, Kolmes *et al.*, 1996, Galburt *et al.*, 1999). Ebenso könnte das zweiwertige Metallion den pentakovalenten Übergangszustand bei der Spaltreaktion stabilisieren, wie dies für ColE7 und *I-PpoI* vorgeschlagen wurde (Mannino *et al.*, 1999, Sui *et al.*, 2002). In Colicin E9 kann Ni^{2+} als zweiwertiger Cofaktor durch die beiden Histidinreste His102 und His127 gebunden werden (Pommer *et al.*, 2001), Ca^{2+} (als Mg^{2+} -Analog) wird von Asp40 und Asn62 in T4 Endonuklease VII koordiniert (Raaijmakers *et al.*, 2001). Die Sequenzähnlichkeiten von CAD-Proteinen zu T4 Endonuklease VII und Colicin E9 weisen auf die Koordinierung des zweiwertigen Metallions Mg^{2+} in CAD durch zwei korrespondierende Resten hin. Die Homologien dieser Reste (Asp262 entspricht Asp40 in der Phagen-nuklease und His102 in ColE9, His308 entspricht Asn 62 in der Phagennuklease und His127 in Colicin E9) weisen darauf hin, dass das aktive Zentrum von CAD Merkmale der aktiven Zentren von Colicin E9 und T4 Endonuklease VII aufweist. Der Vorschlag, dass His308 und Asp 262 das Metallion koordinieren, aus dessen äußerer Hülle ein Wassermolekül als allgemeine Säure die Abgangsgruppe protoniert (Scholz *et al.*, 2003), wurde durch die Kristallstruktur der Nuklease bestätigt (Woo *et al.*, 2004). Durch Alignments, Mutationsstudien und chemische Modifizierung konnte die apoptotische Nuklease als neues Mitglied der $\beta\beta\alpha$ -Me-

finger-Nuklease-Superfamilie zugeordnet werden (Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002, Scholz *et al.*, 2003).

4.3 Funktionen weiterer Histidine

Die Funktion von His313, in einem Cluster mit His263, His308 und Lys310, um das das Metallionen koordinierende Asp262 im aktiven Zentrum lokalisiert (Woo *et al.*, 2004), ist möglicherweise an der DNA- oder der Metallionenbindung beteiligt. Der nicht völlig konservierte Rest, der seine Entsprechung in Arg418 der Drosophila-Nuklease hat, zeigte bei seinem Austausch nach Arginin in der Varianten H313R eine Aktivität von 109 % und die Bildung eines Spaltmusters mit Fragmenten definierter Größe, das in der Wildtyp-Nuklease nicht auftritt (s. **Tabelle 3-1**; Korn *et al.*, 2002). Für His242 wurde eine strukturelle Funktion festgestellt. Experimente zur Bestimmung des Oligomerenstatus ergaben für die Variante H242N eine Störung der Oligomerisierung (s. **3.3.4.4**; Meiss *et al.*, 2001). CD-Untersuchungen offenbarten eine Störung der Sekundärstruktur für diese Variante (Meiss *et al.*, 2001). Der Austausch H242A führt zu einer inaktiven Variante, die auch keine DNA-Bindung zeigt (Sakahira *et al.*, 2001). Die CAD-Kristallstruktur zeigt CAD als Dimer und offenbart, dass His242 neben den Cysteinen C229, C238 und C307 an der Koordination des Zn²⁺-Ions beteiligt ist (Woo *et al.*, 2004). Durch die Zn²⁺-Koordination werden die Faltblätter β 1 und β 2 und der Anfang des C-terminalen Loops zusammengehalten, die im Dimerisierungsinterface der Nuklease lokalisiert sind. Nach Verhinderung der Zn²⁺-Bindung der Nuklease durch Zugabe des Zn²⁺-Chelators *o*-Phenanthrolin präzipitiert der aktivierte Wildtyp ähnlich wie CADH242A nach Caspase3-Aktivierung. Ohne bzw. bei gestörter Zn²⁺-Bindung wird wahrscheinlich die Dimerisierung der Nuklease verhindert und die Nuklease destabilisiert (Woo *et al.*, 2004). Die Kristallstruktur ergab für den Rest His242 mit der Wasserstoffbrückenbindung zu Glu251 die einzige Wasserstoffbrücke zwischen zwei CAD-Untereinheiten (Woo *et al.*, 2004). Vor dem Erhalt der Kristallstruktur von CAD wurde in Gelfiltrationsexperimenten der Oligomerenstatus von humaner DFF40-Nuklease mit einer Größe von ≥ 1.3 MDa bestimmt (Liu *et al.*, 1999). In eigenen Untersuchungen mit muriner CAD-DNase wurde ebenfalls eine Nukleaseaktivität bei einer oligomeren Größe von 1.3 MDa ermittelt (s. **Abb. 3-8**; Meiss *et al.*, 2001). Diese bildet eine minore Aktivität, ebenso wie die, die bei der Größe eines Dimers zu finden ist. Die größte Aktivität liefert eine Fraktion, in der die Nuklease eine oligomere Größe von ca. 800 kDa, ca. 12 Monomeren entsprechend, umfasst. Die Übereinstimmung mit anderen Arbeiten zeigt auch, dass die Fusion der Nukleasen in dieser Arbeit mit GST, das selbst ein Dimer bildet, keinen Einfluß auf den Oligomerenstatus der apoptotischen Nuklease hat. Im Unterschied zu

eigenen Ergebnissen zeigt die Kristallstruktur die Nuklease nur als Dimer, wobei jedoch anzumerken ist, dass die N-terminale Domäne der Nuklease in dieser Struktur nicht erfasst ist (Woo *et al.* 2004). Nicht auszuschließen ist, dass die dimerisierte Nuklease wohlmöglich mit Hilfe dieser N-terminalen Domäne Oligomere bildet. Für His127N wurde eine relativ hohe Restaktivität mit ca. 25 % des Wildtyps festgestellt (s. **Tabelle 3-1**, Meiss *et al.*, 2001). Der Rest His127, der in Zebrafisch-CAD nicht konserviert ist (s. **Abb. 3-4**), ist in der CAD-Struktur erkennbar in einem Dimerisierungsinterface lokalisiert. Er wird aber nicht in Verbindung mit Dimerisierungs-Interaktionen in Verbindung gebracht (Woo *et al.*, 2004), so dass die Funktion dieses Restes unklar bleibt. His304 ist, im aktiven Zentrum lokalisiert, möglicherweise an der DNA-Bindung beteiligt. 15 % Restaktivität der Varianten H304N (s. **Tabelle 3-1**, Meiss *et al.*, 2001) suggerieren dies. Alle in dieser Arbeit untersuchten Reste, die mit DNA-Bindung in Verbindung gebracht wurden, binden in einem semiquantitativen DNA-Cellulose-Bindungsassay an DNA-Cellulose wie der Wildtyp (s. **Tabelle 3-1**, Korn *et al.*, 2002). Grundsätzlich sind diese Varianten nach den Ergebnissen aus dem DNA-Cellulose-Bidungsassay daher nicht in ihrer DNA-Bindungsfähigkeit eingeschränkt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass von ihnen einige an der DNA-Bindung beteiligt sind und dass ein einzelner Austausch dieser Reste zu einer Verminderung der katalytischen Aktivität führt (s. **Tabelle 3-1**; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). In Nukleasen sind mehrere Reste an der DNA-Bindung beteiligt, oft durch die Bildung elektrostatischer Interaktionen zwischen positiv geladenen Seitenketten und den negativ geladenem Phosphodiesterückgrat, oder *stacking* Interaktionen zwischen aromatischen Seitenketten und den Basen des Nukleinsäuresubstrats. Die Substitution eines einzelnen dieser Reste kann wegen ungenauer Positionierung zu einer Verminderung der katalytischen Aktivität der Nuklease führen, muß aber die DNA-Bindung nicht merklich reduzieren.

4.4 Die Funktionen von Tyrosinen und Lysin

In vielen verschiedenen Nukleasen sind Lysine Teil des aktiven Zentrums des Enzyms (Garforth *et al.*, 1999, Bolt *et al.*, 2000, Declais *et al.*, 2001), wo sie vielfältige Funktionen, wie die Beteiligung an der Positionierung der spaltbaren Phosphodiesterbindung über Interaktionen zu dem negativen Phosphatrückgrat, die Stabilisierung des pentakovalenten Übergangszustands und auch das Aktivieren des Wassermoleküls für den nukleophilen Angriff, übernehmen. Beispielsweise haben die meisten TypII Restriktionsenzyme in ihren aktiven Zentren, dem PD...D/EXK-Motiv, einen Lysinrest, der hauptsächlich das Wassermolekül für den nukleophilen Angriff positioniert und den Übergangszustand stabilisiert (Pingoud und Jeltsch

2001). Die C-terminal lokalisierten und zwischen fünf CAD-Spezies, d. h. Maus, Ratte, Mensch Zebrafisch und Taufliede, voll konservierten Lysinreste Lys155, Lys301, Lys310 sind funktionell relevant, eine Beteiligung an dem katalytischen Mechanismus wurde aber bisher nicht nachgewiesen (s. **Tabelle 3-1**; Korn *et al.*, 2002). Die Reste Lys155, Lys301 und Lys310 sind vermutlich an der DNA-Bindung, möglicherweise an der Substrat-Positionierung, beteiligt. Lys155 ist in der Helix- α 4 lokalisiert, die über Interaktionen zur großen Furche an der DNA-Bindung beteiligt sein soll (Woo *et al.*, 2004). Eine Lys155-enthaltende Sequenz zeigt außerdem Homologien zu einem UvrA-DNA-Bindemotiv (G. Meiss, unveröffentlicht). Lys155 hat möglicherweise eine strukturelle Funktion für die Stabilisierung der DNA-bindenden Helix- α 4. Die Variante CADK155Q im Komplex mit DFF45 zeigt keine DNA-Bindung, was durch eine strukturelle Störung der Helix- α 4 verursacht sein könnte (s. **Abb. 3-16A, C**; Korn, Scholz *et al.*, 2004). Lys310, wie erwähnt in einem Cluster mit His263, His308 und His313 um das Metallionen koordinierende Asp262 im aktiven Zentrum lokalisiert, ist nach neueren Untersuchungen in DNA-Bindungsexperimenten vermutlich für die DNA-Bindung im aktiven Zentrum wichtig (G. Meiss, unveröffentlicht). Das aktive Zentrum mit dem $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motiv bindet die DNA über die kleine Furche. Die beobachteten starken Effekte in Aktivitätsstudien (s. **Tabelle 3-1**; Korn *et al.*, 2002) könnten die DNA-bindende Funktion von Lys310 unterstützen, aber auch ein Indiz dafür sein, dass dieser Rest auch aufgrund seiner Lokalisation im aktiven Zentrum (Woo *et al.*, 2004) den pentakovalenten Übergangszustand stabilisiert. Die Rolle von Lys301 blieb nach den Mutagenesestudien unklar. In einem β -Faltblatt des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs lokalisiert, hat dieser Rest möglicherweise auch eine DNA-bindende Funktion. Die Variante K301R zeigt noch 68 % der WT-Nuklease-Aktivität (s. **Tabelle 3-1**), so dass die Funktion des Lysins zu einem großen Teil von einem Arginin übernommen werden kann. Nach den Ergebnissen einer anderen Untersuchung werden funktionelle Lysinreste durch DNA vor chemischer Modifizierung geschützt, was auch auf eine Beteiligung zumindest einer dieser Reste an der DNA-Bindung hindeutet (Korn *et al.*, 2002). Von früheren strukturellen und Mutageneseuntersuchungen ist bekannt, dass konservierte Lysinreste, d. h. Lys12, Lys21 und Lys35, in der N-terminalen regulatorischen Domäne von CAD an der Interaktion zu der N-terminalen Domäne von DFF45 beteiligt sind. Während einzelne Mutationen dieser Reste ohne Auswirkung blieben, waren Doppel- und Tripelmutanten proportional stärker beeinflusst, die letzteren zeigten fast keine nukleolytische Aktivität und waren nicht in der Lage, den Inhibitor zu binden (Inohara *et al.*, 1999, Otomo *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse ergeben sich aus der fehlenden Bindung zu dem Chaperon und Inhibitor DFF45 und nicht aus der Wegnahme von katalytisch relevanten Aminosäureresten.

Ob die Lysinreste Lys155, Lys301 und Lys310 auch an der Inhibition der Nuklease durch Bindung des Inhibitors DFF45 beteiligt sind, worauf die Ergebnisse chemischer Modifizierungsexperimente mit CAD (DFF40) hindeuten (Korn *et al.*, 2002), bleibt fraglich. Anzumerken bleibt noch, dass alle untersuchten Histidin-, Lysin-, Tyrosin- und Argininreste in den CAD (DFF40) -Varianten keine Einschränkung in ihren Interaktionen zu DFF45 (ICAD-L) zeigten und als stabile heterodimere Komplexe gereinigt werden konnten (s. **Tabelle 3-1**).

Tyrosinreste sind oft Teil der aktiven Zentren von Nukleasen, wo sie an der DNA-Bindung durch Bildung von *stacking* Interaktionen mit einer Base oder Wechselwirkung mit einem Zucker der Nukleinsäure beteiligt sind. Beispielsweise hat Tyr76 eine Schlüsselfunktion in der DNA-Bindung von DNase I. Der Rest, der Teil eines kleinen Loops ist, der die kleine Furche der DNA ausfüllt, tritt in Wechselwirkung mit einer Desoxyribose und ist daher für die Kopplung von DNA-Erkennung und -Spaltung durch DNase I wichtig (Weston *et al.*, 1992, Doherty *et al.*, 1995, Warren *et al.*, 1997, Pan *et al.*, 1998). In der *Serratia*-Nuklease wird durch den Austausch von Tyr76 die Aktivität nur mit Phenylalanin erhalten, vermutlich weil der Rest an einer *stacking* Interaktion mit einer Base der Nukleinsäure beteiligt ist (Miller *et al.*, 1994, Friedhoff *et al.*, 1996, Meiss *et al.*, 1999). Die in CAD voll konservierten Tyrosinreste Tyr170 und Tyr247 sind funktionell relevant. Die Funktion von Tyr247 könnte, durch die weitgehend inaktive Variante Y247F nahegelegt (s. **Tabelle 3-1**), für eine Beteiligung an der DNA-Bindung verantwortlich sein. Dieser Rest könnte zusammen mit Lys301 und Lys310 durch die Positionierung der DNA einen wertvollen Beitrag zur Substratbindung liefern. Tyr170 ist in der Nähe der allgemeinen Base His263 des aktiven Zentrums lokalisiert (Woo *et al.*, 2004) und dort möglicherweise an der DNA-Bindung und der Prozessivität der Nuklease beteiligt (Korn *et al.*, 2002). Die Variante Y170F zeigte eine Aktivität von 107 % der Wildtyp-Nuklease, kann aber, durch das Auftreten von Spaltmustern (s. **Tabelle 3-1**; Korn *et al.*, 2002) zu vermuten, die DNA für eine Spaltung nicht mehr richtig positionieren.

4.5 Funktionen konservierter Argininreste

Durch ein Alignment fünf verschiedener Spezies wurden in der C-terminalen katalytischen Domäne von CAD auch sechs konservierte Argininreste gefunden und ihre Funktion in Mutationsstudien untersucht. In Varianten mit Austausch nach Alanin wurde für die untersuchten Reste Arg151, Arg166, Arg168, Arg212, Arg250 und Arg269 eine funktionelle Relevanz ermittelt (s. **Tabelle 3-1**). Arg151, Arg166 und Arg168 entstammen einer Sequenz mit Homologien zu einem DNA-bindenden Motiv in UvrA. Arg151 ist unmittelbar vor, Arg166 und Arg168 sind in der Helix- α 4 lokalisiert, die die DNA über die große Furche binden soll (Woo

et al., 2004). Die niedrige Aktivität der Varianten R151A, R166A und 168A (s. **Tabelle 3-1**) könnte auf eine Beteiligung an der DNA-Bindung hinweisen. Neuere Ergebnisse mit der Variante R151A, die DNA in Shiftexperimenten schlechter bindet als der Wildtyp (G. Meiss, unveröffentlicht), weisen ebenso auf eine DNA-bindende Funktion für Arg151 hin. Arg269, in der α -helikalen Insertion zwischen den beiden β -Faltblättern des $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motivs lokalisiert, könnte ebenfalls nach neuesten Ergebnissen in DNA-Shiftexperimenten an der DNA-Bindung beteiligt sein (Meiss *et al.*, unveröffentlicht) Eine niedrige Spaltaktivität einhergehend mit der Bildung von Fragmentmustern bei der Variante R269A (s. **Tabelle 3-1**) könnte ebenfalls auf eine Beteiligung an der DNA-Bindung im aktiven Zentrum und/oder der Prozessivität des Enzyms hinweisen. Die Funktionen der beiden anderen Argininreste Arg212 und Arg250, die in keiner offensichtlich DNA-bindenden Region lokalisiert sind, bleiben unklar. Einen Hinweis auf eine Beteiligung des Restes Arg250 an einer Interaktion zu einer anderen CAD-Untereinheit, d. h. also möglicherweise an der Dimerisierung der Nuklease, liefert die Kristallstruktur. Dort ist die Lokalisierung dieses Restes im Dimerisierungsinterface erkannt sowie eine Beteiligung dieses Restes an Interaktionen zwischen CAD-ermittelt worden (Woo *et al.*, 2004).

4.6 Charakterisierung von ICAD-S

4.6.1 ICAD-S weist im Vergleich zu DFF45 eine etwa 50-fach niedrigere Faltungshelferaktivität auf

Wird CAD alleine beispielsweise in Sf9- oder auch *E. coli* oder Säugerzellen exprimiert, ist es unlöslich. *In vitro*-Transkription und -Translation der Nuklease führt ebenfalls zu keinem funktionellen Protein (Sakahira *et al.*, 1999). Die Expression von CAD in Gegenwart der langen Isoform DFF45 (ICAD-L), die in dieser Arbeit mit Zwei-Plasmid-Expressionsystemen in *E. coli*-Zellen erfolgte, liefert eine, nach ihrer Freisetzung durch Caspase-3 aus den präparierten His-DFF- oder GST-DFF-Komplexen, funktionelle Nuklease (s. 3.1.1.4 u. 3.3.3.2). Im Laufe dieser Arbeit konnte durch Anwendung eines Zweiplasmidsystems mit dem die inhibitorische Untereinheit des DFF-Komplexes zuerst exprimiert wurde, gezeigt werden, dass auch ICAD-S eine Faltungshelferaktivität aufweist. Diese ist zwar um mindestens eine Größenordnung geringer als die der langen Isoform, aber dennoch gegeben. Da sich die kurzen und die langen Isoformen von ICAD nur durch die C-terminalen Domänen (ca. 70 Aminosäurereste) unterscheiden, ist anzunehmen, dass diese die Faltungshelfer-

aktivität zwar erhöhen, die gemeinsamen Domänen der ICAD-Isoformen aber schon eine basale Faltungshelferaktivität aufweisen. Da ICAD-S in einigen Geweben, z.B. neuronalem Gewebe, die dominierende Isoform ist, ist anzunehmen, dass die Funktion von ICAD-S mehr als die eines inhibitorischen *back-up* Systems zur Inhibition irrtümlich aktivierter Nuklease ist.

4.7 DNA-Bindung

4.7.1 Ein bisher unbekannter Mechanismus der Nukleaseinhibition am Beispiel von DFF

Andere unspezifische Nukleasen wie EndoG, DNase I oder Cole7 binden DNA nur schwach, und der einzige, in biochemischen Untersuchungen nachgewiesene stabile DNA-Komplex mit einer unspezifischen Nuklease existiert von Cole9, allerdings mit einer inaktiven Variante und in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen (Garinot-Schneider *et al.*, 1996). Der Mechanismus der Inhibition von DFF40 (CAD) durch die inhibitorischen Untereinheiten unterscheidet sich von dem anderer unspezifischer, ebenfalls durch Proteine inhibierte Nukleasen wie Barnase/Barstar, RNaseA/RI sowie Cole7/ImE7 und Cole9/ImE9 (Hartley, R. W., 2001, Buckle *et al.*, 1994, Raines, R. T., 1998, Kobe and Deisenhofer 1996). Im Falle dieser Nukleasen verhindern die Inhibitoren die Substratbindung der Nukleasen, z. B. über Veränderungen der Oberflächenladung im Bereich des aktiven Zentrums, wie bei den beiden Colicin-Nukleasen, und dadurch die Spaltung der DNA (Hsia *et al.*, 2004, Kleanthous und Walker, 2001, Kleanthous *et al.*, 1999, Ko *et al.*, 1999). Für DFF40 (CAD), wie die beiden Colicin-Nukleasen zur H-N-H Nuklease-Superfamilie gehörend, existiert ein neuer, nicht vermuteter Mechanismus der Inhibition durch DFF45 (ICAD-L) bzw. DFF35 (ICAD-S), der DNA-Spaltung zwar verhindert, DNA-Bindung aber erlaubt. Eine detaillierte Beschreibung hierfür ist ohne Kristallstruktur von DFF nicht möglich. Eine Möglichkeit aber dies zu realisieren, sind zwei voneinander unabhängige Zentren, von denen eines eine nicht katalytische DNA-Bindung eingeht, und das andere, DNA-spaltende Zentrum, durch den Inhibitor blockiert ist. Weiterhin wäre es denkbar, dass an einem Ort im aktiven Zentrum erst DNA-Bindung mit Blockierung der Katalyse durch den Inhibitor gefolgt von der DNA-Spaltung nach Aktivierung der Nuklease stattfände. Das durch die Kristallstruktur ermittelte DFF40 (CAD)-Dimer mit dem aktiven Zentrum am Boden einer tiefen Furche erlaubt im Prinzip die nichtkatalytische DNA-Bindung gefolgt von der DNA-Spaltung in einem zweistufigen Prozess (Woo *et*

al., 2004). Da ein solches tiefgelegenes aktives Zentrum in einem DFF-Komplex nicht gebildet wird - in diesem ist die Nuklease monomer- (Woo *et al.*, 2004), ist für die beobachtete DNA-Bindung des heterodimeren DFF-Komplexes monomereres DFF40 (CAD) ausreichend. Aus der CAD-Struktur ist ableitbar, dass das katalytische Zentrum der Nuklease, das $\beta\beta\alpha$ -Meffinger-Motiv, die DNA über die kleine Furche attackiert (Woo *et al.*, 2004, Hsia *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2003, Cheng *et al.*, 2002). Weiterhin zeigt die Modellierung der DNA mit der CAD-Struktur eine vermutete Bindung von DFF40 (CAD) über die Helix- $\alpha 4$ zur großen Furche der Nukleinsäure (Woo *et al.*, 2004). In DFF verläuft die nichtkatalytische DNA-Bindung der Nuklease demnach wahrscheinlich über diese Helix- $\alpha 4$, während das aktive Zentrum durch den Inhibitor blockiert ist.

4.7.2 DFF-Aktivierung in DNA-gebundener Form

Die Aktivierung von DFF befreit DFF40 von der Blockade des aktiven Zentrums durch den Inhibitor. Die Nuklease dimerisiert und initiiert mit den Aminosäuren des $\beta\beta\alpha$ -Metallfinger-Motivs Spaltung in der kleinen Furche der DNA. Das aktive Zentrum am Boden eines tiefen Spaltes, der durch die beiden DFF40 (CAD) -Monomere gebildet wird, erfordert den Zugang der zu spaltenden Linker-DNA des Chromatins an diese Stelle. Dadurch ist es der Nuklease einerseits möglich, zwischen Linker-Region und Nukleosom zu unterscheiden (Woo *et al.*, 2004), andererseits ist zu klären, wie das Substrat dieses Zentrum erreichen kann. Die mit Plasmid-DNA und isolierten Kernen durchgeführte Aktivierung aus DFF in DNA-gebundener Form stimuliert die Aktivität der freigesetzten Nuklease DFF40 (CAD). Dabei könnten die DFF-DNA-Komplexe den Zugang der DNA zu dem wie beschrieben schwerzugänglichen aktiven Zentrum der Nuklease erleichtern, da die Dimerisierung von DFF40 (CAD) in Gegenwart der gebundenen DNA erfolgen kann. Dieses Modell liefert eine Erklärung für die Stimulation der Aktivität von DFF40 (CAD) bei ihrer Aktivierung aus DFF während oder nach DNA-Bindung. Die gefundene Assoziation von DFF an Chromatin in Hela-Zellen (Dissertation SRS, Korn und Scholz *et al.*, 2005) suggeriert eine mögliche Aktivierung von DFF in apoptotischen Zellen in DNA-gebundener Form. Eigene Daten zeigen *in vitro* DNA-Bindung von DFF an Plasmid-DNA (s. **Abb. 3-15** u. **Abb. 3-16**) und die Stimulation der Nuklease-Aktivität durch Aktivierung von DFF in DNA-gebundener Form (s. **Abb. 4-1**), letzteres auch mit isolierten Kernen (Korn und Scholz *et al.*, 2005). Diese Stimulation der Aktivität von DFF40 (CAD) könnte an der Erleichterung des Zugangs der DNA zu dem aktiven Zentrum der Nuklease liegen. So könnte auch *in vivo* DFF-Bindung in der Linker-Region der DNA in Zellen durch die Nähe der Nuklease zum Substrat bei ihrer Aktivierung zu einer Be-

schleunigung der DNA-Fragmentierung während der Apoptose führen. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten verbunden mit den Ergebnissen der erwähnten anderen Arbeiten (s. o.) zeigen DFF als einziges Beispiel eines DNA-bindenden DNase/Inhibitor-Komplexes.

4.7.3 Modell der DFF-Aktivierung

In einem Modell der Aktivierung von DFF in DNA-gebundener Form (s. **Abb. 4-1**) erfolgt die DNA-Bindung des heterodimeren Komplex über ein nichtkatalytisches DNA-bindendes Zentrum von DFF40 (CAD). Der Freisetzung der Nuklease aus dem Komplex mit Caspase-3 folgt ihre Dimerisierung in Gegenwart der gebundenen DNA, was vermutlich dem Substrat den Zugang zu dem aktiven Zentrum, erleichtert. Der Ort der DNA-Spaltung befindet sich nach der Freisetzung vom Inhibitor und Dimerisierung am Boden eines tiefen Spalts.

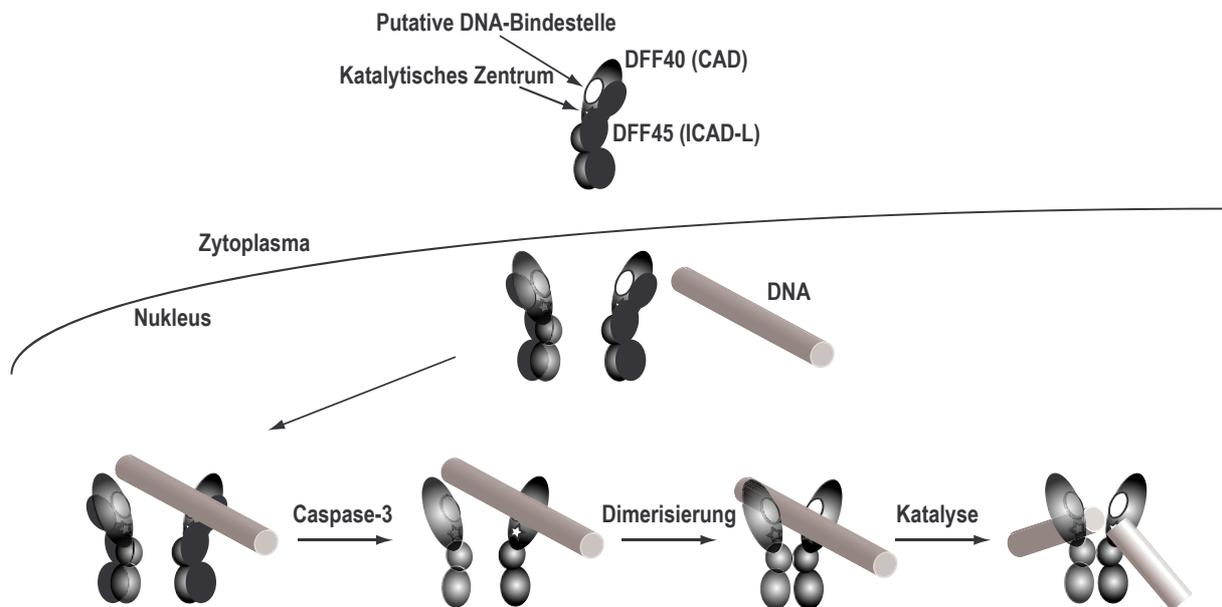


Abb. 4-1: Modell zur Aktivierung von DFF in DNA-gebundener Form

Die in manchen Zelltypen vorzufindende Lokalisation von DFF im Zellkern erlaubt prinzipiell eine Bindung dieses Komplexes an chromosomale DNA. Nach eigenen Daten bindet der heterodimere Komplex DNA über die Nukleaseuntereinheit, wodurch nach Aktivierung von DFF40 (CAD) der Zugang der DNA zu dem aktiven Zentrum der Nuklease erleichtert wird. Eine Möglichkeit, dieses Zentrums am Boden eines tiefen Spalts in einem DFF40 (CAD) -Dimer zu erreichen, wäre die Dimerisierung der Nuklease in Gegenwart der DNA.

4.7.4 Nichtkatalytische DNA-Bindung von DFF40 (CAD) in DFF unter Beteiligung des aktiven Zentrums

CADK155Q/DFF45 bindet keine DNA (s. **Abb. 3-16 C**), was vermutlich an der strukturellen Bedeutung des Restes Lys155 in CAD für die DNA-Bindung liegt. Dieser Rest stabilisiert

möglicherweise die α 4-Helix, die mit der DNA über die große Furche interagiert (s. **Abb. 3-16 A**; Woo *et al.*, 2004). Die Nuklease-Variante K155Q ist aus dem DFF-Komplex nicht mehr zu aktivieren, möglicherweise weil die Helix- α 4 nach dem Einfügen der Mutation ihre Struktur verändert (s. **Abb. 3-16 A**). Wie man der Kristallstruktur der Nuklease ebenfalls entnehmen kann, ist das $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motiv des aktiven Zentrums der Nuklease in der Lage, mit der DNA über die kleine Furche zu interagieren und dort die zu spaltende Phosphodiesterbindung zu attackieren (Woo *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition von DFF40 (CAD) durch DFF45 (ICAD-L) wie auch die in dieser Arbeit erwähnten DNA-Bindungsstudien mit DFF_{N-R269A} und DFF_{N-K310Q} (s. **4.3** u. **4.4**) weisen in Ergänzung zu dem vorgestellten Modell (s. **Abb. 4-1**; Korn, Scholz *et al.*, 2004) auf eine Beteiligung des aktiven Zentrums an einer nichtkatalytischen DNA-Bindung in DFF hin (G. Meiss, unveröffentlicht). Für diese Art der DNA-Bindung sind außer den Resten Arg269 und Lys310 aufgrund ihrer funktionellen Relevanz (s. **Tabelle 3-1**; Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002) und ihrer Lokalisation (Scholz *et al.*, 2003, Woo *et al.*, 2004) auch Lys301, Lys310 Arg269, Y170F, His304 und His313 in Betracht zu ziehen. Die Gründe für eine mögliche Beteiligung dieser Reste an der DNA-Bindung sind schon an anderer Stelle hinreichend diskutiert worden (s. **4.2 - 4.4**). Die Helix- α 4 und das $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Motiv, für die eine Beteiligung an der DNA-Bindung über zwei getrennte Zentren vorgeschlagen wird (Woo *et al.*, 2004, Korn und Scholz *et al.*, 2004), könnten theoretisch auch ein gemeinsames überlappendes DNA-bindendes Interface bilden. So oder so stellt sich bei der Einbeziehung des aktiven Zentrums der Nuklease an einer nichtkatalytischen DNA-Bindung von DFF die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Inhibition von DFF40 (CAD) durch DFF45 (ICAD-L) bzw. DFF35 (ICAD-S). Weitere Untersuchungen sollen der Frage nachgehen, wie die Chaperone/Inhibitoren DFF40 (CAD) korrekt falten, was ihre spätere Aktivität bedingt, und dennoch gleichzeitig die Nuklease in einem inaktiven Zustand halten. Dies könnte prinzipiell über eine Konformationsänderung der Nuklease erfolgen, die für ihre Aktivierung aus dem DFF-Komplex rückgängig gemacht werden müsste.

Ausblick

Die Funktionen von Argininen sollten unter Verwendung des in dieser Arbeit entwickelten Expressions- und Reinigungsschemas (s. 3.1.3) weiter untersucht werden. Die hier angewendete Reinigungsstrategie (s. 3.4.4.1 u. 2) führt zu einer sehr reinen Präparation des rekombinanten DFF-Komplexes, was die Durchführung bestimmter biochemischer Untersuchungen erst ermöglicht. So konnte die DNA-Bindung von CAD (DFF40) in aktivierter Form und im Komplex mit ICAD (DFF45) mit dem Shift-Assay (s. 2.6.9.1) nachgewiesen werden (s. 3.5.4 - 3.5.5). Vermutlich wird es auch möglich sein, die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäurereste zu identifizieren. CAD (DFF40) -Mutanten mit Austausch potenziell DNA-bindender Aminosäuren wie Arginine, Lysine oder auch aromatische Aminosäuren sind im Komplex mit DFF45 und in aktivierter Form in Shift-Assays auf DNA-Bindung zu untersuchen. Möglicherweise läßt sich hierdurch auch klären, ob tatsächlich getrennte Zentren für die DNA-Bindung von DFF40 (CAD) zuständig sind, oder ob Aminosäurereste aus verschiedenen Bereichen ein gemeinsames DNA-bindendes Interface bilden.

Den Mechanismus der Inhibition durch DFF45 (ICAD-L) bzw. DFF35 (ICAD-S) zu ermitteln sollte ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen sein. Gelingt dies, birgt dies möglicherweise Ansätze für die Erklärung der DNA-Bindung des DFF-Komplexes bei gleichzeitiger Inhibition der nukleolytischen Aktivität von DFF40 (CAD) durch die beiden Inhibitoren.

Die Isotherme-Titrations-Kalorimetrie (ITC), mit der Bindungskonstanten (KB) bestimmt, Stöchiometrien ermittelt oder thermodynamische Parameter wie Entropie (ΔS) oder Enthalpie (ΔH) bei Reaktionen untersucht werden, könnte zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Bindung von DFF an DNA eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wird ein Expressions- und Reinigungssystem für DFF vorgestellt. Mit dem Zwei-Plasmid-Expressions-System pACET-DFF45/pET-DUET-His-CAD wurde DFF rekombinant in hohen Mengen in *E. coli* produziert. Der affinitätschromatographischen Reinigung über Ni-NTA-Agarose folgte ein zweiter Reinigungsschritt zur Entfernung von Proteinkontaminationen und chromosomaler Bakterien-DNA über Anionenaustauschchromatographie. Über Ultrafiltrationseinheiten konzentriert wurde aus 10 l Fermentern ca. 50 mg DFF präpariert. Dieser Komplex wurde für biochemische Studien, z. B. der Untersuchung der DNA-Bindung von DFF, und auch in strukturellen Untersuchungen eingesetzt.

Ein Ziel dieser Arbeit lag in der biochemischen Charakterisierung des aktiven Zentrums von DFF40 (CAD). Zur Identifizierung katalytisch relevanter Aminosäurereste trug die ortsgerichtete Mutagenese bei. Für Histidinreste und Lysinreste konnte in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Relevanz ermittelt werden, was durch chemische Modifizierungsexperimente unterstützt wurde (Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Eine eindeutige funktionelle Zuordnung gelang für His263 als allgemeine Base im Mechanismus der Phosphodiestererspaltung. Für His308 wurde über eine Rolle als allgemeine Säure spekuliert (Meiss *et al.*, 2001, Korn *et al.*, 2002). Die tatsächliche Funktion als wichtigster Rest für die Koordination des zweiwertigen Metallions Mg^{2+} konnte für His308 nach einem Alignment mit ColE9 DNase und T4 Endonuklease VII und weiteren Mutationsanalysen später nach dem Erhalt von Strukturinformationen zugeordnet werden. Mit diesen Informationen, experimentell bewiesen, konnte CAD der Superfamilie der $\beta\beta\alpha$ -Me-finger-Nukleasen zugeordnet werden, ein Modell des aktiven Zentrums der Nuklease aufgestellt und der Mechanismus der Phosphodiestererspaltung dargestellt werden (Scholz *et al.*, 2003).

Mit dem getrennt induzierbaren Expressionssystem pLK-HisFlag-ICAD-S/pGEX2T-CADWT war eine getrennte Induktion der Expression der beiden Gene ICAD-S und GST-CADWT in *E. coli* zu erreichen. Der Komplex aus GST-CAD/ICAD-S wurde anschließend affinitätschromatographisch gereinigt und zur Untersuchung der chaperonen Aktivität von ICAD-S eingesetzt. Die aus diesem Komplex mittels Caspase-3 freigesetzte Nuklease zeigte in DNA-Spaltexperimenten eine nukleolytische Aktivität, wodurch die chaperone Eigenschaft von ICAD-S nachgewiesen werden konnte. Gegenüber ICAD-L ist die chaperone Aktivität der kürzeren Splicevariante allerdings etwa 50 mal weniger effektiv (Scholz *et al.*, 2002).

Der Nachweis der DNA-Bindung ist bei unspezifischen Nukleasen und DNase/Inhibitor-Komplexen sehr ungewöhnlich. Im Laufe dieser Arbeit konnte mit DFF sowohl für den Kom-

Zusammenfassung

plex als auch für die aktivierte Nuklease DFF40 (CAD) DNA-Bindung gezeigt werden. DNA-Bindung von DFF stellt einen neuen, bislang unbekanntem Mechanismus der Nukleaseinhibition dar, bei dem zwar die DNA-Spaltung verhindert, aber die DNA-Bindung zugelassen wird. Außerdem wurde eine Stimulation der Aktivität von DFF40 (CAD) durch Aktivierung aus einem DNA-gebundenen DFF-Komplex mit Plasmid-DNA und auch mit isolierten Kernen festgestellt. Diese Tatsache und die beobachtete Assoziation von DFF mit Chromatin implizieren einen Mechanismus, bei dem die Aktivierung von DFF während der Apoptose im Zellkern in DNA-gebundener Form stattfinden kann (Korn und Scholz *et al.*, 2005).

7 Literaturverzeichnis

Alimonti, J. B., Shi, L., Baijal, P. K. & Greenberg, A. H. (2001) Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 276, 6974-82.

Aravind, L., Makarova, Kira S., Koonin, Eugene V. (2000) Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories *Nucleic Acids Research*, 28, 3417-3432

Ausubel et al. (1987-1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons.

Been, M. D. (1993) *Nucleases that are RNA*, eds. Linn, S. M., R. S. Lloyd, R. J. Roberts, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.

Boehringer Mannheim (Lichtinghagen, R., Glaubitz, R.) (1995) A competitive polymerase chain reaction assay for reliable identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33, 87-93.

Bolt, E. L., Sharples, G. J. and Lloyd, R. G. (2000) Analysis of conserved basic residues associated with DNA binding (Arg69) and catalysis (Lys76) by the RusA holliday junction resolvase. *J. Mol. Biol.* 304, 165–176

Brown, R. S., Dewan, J. C. & Klug, A. (1985) Crystallographic and biochemical investigation of the lead(II)-catalyzed hydrolysis of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry* 24, 4785-801.

Buckle, A. M., Schreiber, G., and Fersht, A. R. (1994) Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution. *Biochemistry* 33, 8878-8889.

Chen, D. et al. (2000) 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. *J Biol Chem* 275, 38508-17.

Cheng, Y. S., Hsia, K. C., Doudeva, L. G., Chak, K. F. and Yuan, H. S. (2002) 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.

Chung, C. T. et al. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-5.

Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L. H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P., Lecocq, J. P. (1984) High-level production of biologically active human alpha 1-antitrypsin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 669-73.

Curtin, J. F., Cotter, T. G. (2003) Defects in death-inducing signalling complex formation prevent JNK activation and Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* Nov 17, 1950-7.

Declais, A. C., Hadden, J., Phillips, S. E. and Lilley, D. M. (2001) The active site of the junction-resolving enzyme T7 endonuclease I. *J. Mol. Biol.* 307, 1145–1158.

Doherty, A. J., Worrall, A. F. & Connolly, B. A. (1995) The roles of arginine 41 and tyrosine 76 in the coupling of DNA recognition to phosphodiester bond cleavage by DNase I: a study using site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* 251, 366-77.

Durrieu, F. et al. (2000) DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* 10, 923-6.

Enari, M. et al. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Friedhoff P, Franke I, Meiss G, Wende W, Krause KL, Pingoud A. (1999) A similar active site for non-specific and specific endonucleases. *Nat Struct Biol.* Feb;6, 112-3.

Friedhoff, P. et al. (1996) Analysis of the mechanism of the Serratia nuclease using site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 24, 2632-9.

Fukushima, K. et al. (2002) Solution structure of the DFF-C domain of DFF45/ICAD. A structural basis for the regulation of apoptotic DNA fragmentation. *J Mol Biol* 321, 317-27.

Galburt, E. A., Chevalier, B., Tang, W., Jurica, M. S., Flick, K. E., Monnat, R. J. Jr, Stoddard, B. L. (1999) A novel endonuclease mechanism directly visualized for I-PpoI. *Nat Struct Biol.* Dec 6, 1096-9.

Garforth, S. J., Ceska, T. A., Suck, D. and Sayers, J. R. (1999) Mutagenesis of conserved lysine residues in bacteriophage T5 5'-3' exonuclease suggests separate mechanisms of endo- and exonucleolytic cleavage. *Proc. Natl Acad. Sci.* 96, 38-43.

Garinot-Schneider, C., Pommer, A. J., Moore, G. R., Kleantous, C., and James, R. (1996) Identification of Putative Active-site Residues in the DNase Domain of Colicin E9 by Random Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 260, 731-742.

Green, D. R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* Jul 7, 1-4.

Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-911.

Gu, J. et al. (1999) Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *J Biol Chem* 274, 20759-62.

Haigis, M. C., Kurten, E. L. and Raines, R. T. (2003) Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res.* 31, 1024-1032.

Halenbeck, R. et al. (1998) CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 8, 537-40.

Hartley, R. W. (2001) Barnase-barstar interaction. *Methods Enzymol.* 341, 599-611.

Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H. & Ley, T. J. (1994) Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-87.

Hsia, K. C., Chak, K. F., Liang, P. H., Cheng, Y. S., Ku, W. Y., Yuan, H. S. (2004) DNA binding and degradation by the HNH protein ColE7. *Structure (Camb)* 12, 205-14.

Hsia, K. C., Li, C. L., Yuan, H. S. (2005) Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense. *Curr Opin Struct Biol.* 1, 126-34.

Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Benedict, M. A., Nunez, G. (1999) Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem.* 274, 270-4.

Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Nunez, G. (1998) CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *Embo J* 17, 2526-33.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* Jul 26, 233-43.

Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kirsch, R. D. and Joly, E. (1998) An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 1848-1850.

Kleanthous, C. et al. (1999) Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nat Struct Biol* 6, 243-52.

Kleanthous, C. and Walker, D. (2001) Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends Biochem. Sci.* 26, 624-631.

Ko, T. P., Liao, C. C., Ku, W. Y., Chak, K. F., and Yuan, H. S. (1999) The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein. *Structure Fold Des.* 7, 91-102.

Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1996) Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* 264, 1028-1043.

Kolmes, B., Franke, I., Friedhoff, P. & Pingoud, A. (1996) Analysis of the reaction mechanism of the non-specific endonuclease of *Serratia marcescens* using an artificial minimal substrate. *FEBS Lett* 397, 343-6.

Korn, C., Meiss, G., Gast, F., Gimadutdinow, O., Urbanke, C., Pingoud, A. (2000) Genetic engineering of *Escherichia coli* to produce a 1:1 complex of the *Anabaena* sp. PCC 7120 nuclease NucA and its inhibitor NuiA. *Gene* 253, 221-9.

Korn, C., Scholz, S. R., Gimadutdinow, O., Lurz, R., Pingoud, A., Meiss, G. (2005) 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. *J Biol Chem.* 280, 6005-15.

Korn, C., Scholz, S. R., Gimadutdinow, O., Pingoud, A. & Meiss, G. (2002) Involvement of conserved histidine, lysine and tyrosine residues in the mechanism of DNA cleavage by the caspase-3 activated DNase CAD. *Nucleic Acids Res* 30, 1325-32.

Kuhlmann, U. C., Moore, G. R., James, R., Kleanthous, C., Hemmings, A. M. (1999) Structural parsimony in endonuclease active sites: should the number of homing endonuclease families be redefined? *FEBS Lett.* Dec 10; 463, 1-2.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Lechardeur, D. et al. (2000) Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol* 150, 321-34.

Lechardeur, D., Xu, M., Lukacs, G. L. (2004) Contrasting nuclear dynamics of the caspase-activated DNase (CAD) in dividing and apoptotic cells. *J Cell Biol.* 167, 851-62.

Li, C. L., Hor, L. I., Chang, Z. F., Tsai, L. C., Yang, W. Z., and Yuan, H. S. (2003) DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J.* 22, 4014-4025.

Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-9.

Liu, X. et al. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8461-6.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-84.

Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W. & Wang, X. (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* 274, 13836-40.

Masuoka, J., Shiraishi, T., Ichinose, M., Mineta, T. & Tabuchi, K. (2001) Expression of ICAD-I and ICAD-S in human brain tumor and its cleavage upon activation of apoptosis by anti-Fas antibody. *Jpn J Cancer Res* 92, 806-12.

Matsuo, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Watanabe, K. & Okada, N. (1995) Highly specific and efficient cleavage of squid tRNA(Lys) catalyzed by magnesium ions. *J Biol Chem* 270, 10097-104.

McCarty, J. S., Toh, S. Y. & Li, P. (1999) Multiple domains of DFF45 bind synergistically to DFF40: roles of caspase cleavage and sequestration of activator domain of DFF40. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 181-5.

McCarty, J. S., Toh, S. Y. & Li, P. (1999) Study of DFF45 in its role of chaperone and inhibitor: two independent inhibitory domains of DFF40 nuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 176-80.

McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S. (2000) An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 14, 549-558.

McIlroy, D., Sakahira, H., Talanian, R. V. & Nagata, S. (1999) Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* 18, 4401-8.

McPherson, R. A. (1995) Evolution of polymerase chain reaction to a quantitative laboratory tool. *Clin Chem.* 41, 1065-7.

Meiss, G., Bottcher, U., Korn, C., Gimadutdinow, O., Pingoud, A. (2000) Vectors for dual expression of target genes in bacterial and mammalian cells. *Biotechniques* 29, 476-8, 480.

Meiss, G., Scholz, S. R., Korn, C., Gimadutdinow, O. & Pingoud, A. (2001) Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD. *Nucleic Acids Res* 29, 3901-9.

Miller, M. D., Tanner, J., Alpaugh, M., Benedik, M. J. & Krause, K. L. (1994) 2.1 A structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nat Struct Biol* 1, 461-8.

Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H., Nagata, S. (1998) Molecular cloning and characterization of human caspase-activated Dnase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 9123-8.

- Mullis, K. B. et al. (1994) *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65.
- Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation (2000) *Exp Cell Res* 256, 12-8.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. & Fukuyama, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-16.
- Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H. G., Möröy, T. (2000). Features of systemic lupus erythematosus in DNase-1 deficient mice. *Nature Gen* 25, 177-181.
- Otomo, T., Sakahira, H., Uegaki, K., Nagata, S. & Yamazaki, T. (2000) Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD. *Nat Struct Biol* 7, 658-62.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2425.
- Pan, C. Q., Ulmer, J. S., Herzka, A. and Lazarus, R. A. (1998) Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci.* 7, 628–636
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 29, 3705-27.
- Pingoud, A. (2004) *Restriction Endonucleases*, eds. Gross, H., Springer, Berlin.
- Pommer, A. J., Cal, S., Keeble, A. H., Walker, D., Evans, S. J., Kuhlmann, U. C., Cooper, A., Connolly, B. A., Hemmings, A. M., Moore, G. R., James, R., Kleanthous, C. (2001) Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9. *J Mol Biol.* Dec 7; 735-49.
- Raaijmakers H, Vix O, Toro I, Golz S, Kemper B, Suck D. (1999) X-ray structure of T4 endonuclease VII: a DNA junction resolvase with a novel fold and unusual domain-swapped dimer architecture. *EMBO J.* 18, 1447-58.

Raaijmakers, H., Toro, I., Birkenbihl, R., Kemper, B., Suck, D. (2001) Conformational flexibility in T4 endonuclease VII revealed by crystallography: implications for substrate binding and cleavage. *J Mol Biol.* 308, 311-23.

Raines, R. T. (1998) Ribonuclease A. *Chem. Rev.* 98, 1045-1066.

Reidl, S. J., Shi, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.

Saenger, W. (1991) Structure and catalytic function of nucleases. *Curr. Op. Struct. Biol.* 1, 130-138.

Sakahira, H. & Nagata, S. (2002) Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 277, 3364-70.

Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-9.

Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. (1999) Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L, and ICAD-S. *J Biol Chem* 274, 15740-4.

Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1999) Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L and ICAD-S. *J Biol Chem.* 274, 15740-4.

Sakahira, H., Iwamatsu, A., Nagata, S. (2000) Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 275, 8091-6.

Sakahira, H., Takemura, Y., Nagata, S. (2001) Enzymatic active site of caspase-activated DNase (CAD) and its inhibition by inhibitor of CAD. *Arch Biochem Biophys* 388, 91-9.

Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.

Samejima, K. & Earnshaw, W. C. (1998) ICAD/DFP regulator of apoptotic nuclease is nuclear. *Exp Cell Res* 243, 453-9.

Samejima, K. & Earnshaw, W. C. (2000) Differential localization of ICAD-L and ICAD-S in cells due to removal of a C-terminal NLS from ICAD-L by alternative splicing. *Exp Cell Res* 255, 314-20.

Savill, J., Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. Oct 12, 784-8.

Scholz, S. R. et al. (2002) The effect of ICAD-S on the formation and intracellular distribution of a nucleolytically active caspase-activated DNase. *Nucleic Acids Res* 30, 3045-51.

Scholz, S. R. et al. (2003) Experimental evidence for a beta beta alpha-Me-finger nuclease motif to represent the active site of the caspase-activated DNase. *Biochemistry* 42, 9288-94

Schulze-Osthoff, K., Krammer, P. H., Droge, W. (1994) Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J*. Oct 3, 4587-96.

Sharif-Askari, E. et al. (2001) Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *Embo J* 20, 3101-13.

Slepenkov, S.V., Patchen, B., Peterson, K. M., Witt, S. N. (2003) Importance of the D and E helices of the molecular chaperone DnaK for ATP binding and substrate release. *Biochemistry* 42, 5867-76.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.

Suck D, Oefner C, Kabsch W. (1984) Three-dimensional structure of bovine pancreatic DNase I at 2.5 Å resolution. *EMBO J*. Oct 3, 2423-30.

Suck, D. (1992) Nuclease structure and catalytic function. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2, 84-92.

Suck, D., Oefner, C. (1986) Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature* 321, 620-5.

Sui, M. J., Tsai, L. C., Hsia, K. C., Doudeva, L. G., Ku, W. Y., Han, G. W., Yuan, H.S. (2002) Metal ions and phosphate binding in the H-N-H motif: crystal structures of the nuclease domain of ColE7/Im7 in complex with a phosphate ion and different divalent metal ions. *Protein Sci.* Dec 11, 2947-57.

Symons, R. H. (1992) Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem* 61, 641-71.

Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X. & Ley, T. J. (2000) DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12, 621-32.

Thompson, C. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Uegaki, K. et al. (2000) Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J Mol Biol* 297, 1121-8.

Vlassov, V. V., Zuber, G., Felden, B., Behr, J. P. & Giege, R. (1995) Cleavage of tRNA with imidazole and spermine imidazole constructs: a new approach for probing RNA structure. *Nucleic Acids Res* 23, 3161-7.

Walker, D. C. et al. (2002) 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, 3225-34.

Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6, 3543-57.

Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.

Warren, M. A., Evans, S. J. & Connolly, B. A. (1997) Effects of non-conservative changes to tyrosine 76, a key DNA binding residue of DNase I, on phosphodiester bond cleavage and DNA hydrolysis selectivity. *Protein Eng* 10, 279-83.

Weston, S. A., Lahm, A. & Suck, D. (1992) X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 226, 1237-56.

Widlak, P. & Garrard, W. T. (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*. 2005 Feb 18 [Epub ahead of print].

Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R. B. & Garrard, W. T. (2003) Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 278, 26915-22.

Widlak, P., Li, P., Wang, X., Garrard, W. T. (2000) Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem* 275, 8226-32.

Wolf, B. B., Schuler, M., Echeverri, F. & Green, D. R. (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* 274, 30651-6.

Woo, E. J. et al. (2004) Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell* 14, 531-9.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., Kuroda, Y. (2001) Mutation of DNase I in people with systemic lupus erythematosus. *Nature Genet* 28, 313-314.

Yokoyama, H. et al. (2000) A novel activation mechanism of caspase-activated DNase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275, 12978-86.

Zhang, J. et al. (1998) Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 12480-5.

Zhang, J. Wang, X. Bove, K. E. Xu, M. (1999) DNA fragmentation factor 45-deficient cells are more resistant to apoptosis and exhibit different dying morphology than wild-type control cells. J Biol Chem 274, 37450-37454.

Zhu, X. Zhao, X. Burkholder, W. F. Gragerov, A. Ogata, C. M., Gottesman, M. E., Hendrickson, W. A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. Science 272, 1606-14.