

Untersuchungen zur Struktur und Funktion des DNA-Fragmentierungsfaktors DFF

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB08

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Stefanie Reh

geboren am 02.05.1980 in Sinsheim

Gießen, 2009

Für meine Mama

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie (FB08) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von September 2005 bis November 2009 unter Leitung von PD Dr. Gregor Meiss angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters
Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Erstgutachter: PD Dr. Gregor Meiss
Institut für Biochemie, FB08
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58-62, 35392 Gießen

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

Tag der Promotion: 15.01.2010

Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Stefanie Reh

Gießen, den 25.11.2009

I. Publikationen

1. Reh, S., Korn, C., Gimadutdinow, O. & Meiss, G.
“Structural Basis for Stable DNA Complex Formation by the Caspase-activated DNase”
J Biol Chem **280**, 41707-15 (2005)
2. Reh, S., Hölting, L., Gimadutdinow, O. & Meiss, G.
“The Chaperone Target Region of the Caspase-activated DNase”
(in Vorbereitung)

II. Teilnahme an Fachkonferenzen

1. Asia Link-Summer School; Hangzhou (China):

Human Resources Development in Study of Nucleic Acids

24.-29. August 2007

Präsentation der eigenen Forschungsergebnisse als Poster und Vortrag

“DNA-binding and dimer formation by the DNA fragmentation factor (DFF)”

III. Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud bedanken, dass ich meine Promotion an seinem Institut durchführen durfte. Danke für die Unterstützung und die vielen Anregungen, sowie für einen schönen und interessanten Kongress in China.

Bei Herrn PD Dr. Gregor Meiß möchte ich mich zunächst für die Übernahme des Referates bedanken, sowie für die langjährige Unterstützung, Hilfe, Motivation, die vielen Antworten, aber auch für die Geduld. Vielen Dank für die letzten Jahre!

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

Wibke, auch wenn Du schon einige Zeit nicht mehr da bist, danke ich Dir für die gemeinsame Zeit, in der wir neben dem guten Zusammenarbeiten auch viel gelacht haben. Du wurdest zu einer echten Freundin und ich hoffe, dass wir auch noch in Zukunft, wenn Du Mama bist, in Kontakt bleiben werden!

Bei Paddy bedanke ich mich für die vielen Antworten auf so viele Fragen, natürlich für DIE Formel, die vielen Gesprächen in unsren gemeinsamen „Pausen“ und den ganzen Spaß auch über die Uni hinaus!

Daniel, Du bist ein guter Zuhörer, hast immer gute Laune und mit Deiner liebenswerten Art schaffst Du eine sehr angenehme Atmosphäre hier. Ich danke Dir für die tolle Zeit, die wir gemeinsam während der Arbeit aber auch in der Freizeit verbracht haben!

Jana, Dir möchte ich für die weibliche Unterstützung und den Spaß in unserem Kabuff danken, sowie die vielen Gespräche (vor allem in letzter Zeit), die mir gut getan haben. Viel Erfolg und Spaß in Kiel!

Vielen Dank an Marika, die mit ihrer doch manchmal vorlauten Art immer wieder für viel Spaß hier im Labor gesorgt hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an Heike, die immer und überall hilft, wo sie nur kann und die mir geholfen hat, doch ein wenig Ordnung ins Labor zu bringen.

Allen Diplomanden der DFF-Gruppe Steffi T. (freu mich auf´s Kino;), Vicky, Inn, Bene, Alex, Jochen, Chrissi danke ich für die schöne Zusammenarbeit und meinen Praktikanten Lisa, Thimo und Vicky für die hilfreiche Unterstützung!

Katja, wir haben in den letzten Jahren viel zusammen erlebt, gelacht, gezickt, diskutiert und ehrlich gesagt, hätte ich manche Tage hier ohne Dich nur schwer überstanden. Danke, dass Du mir immer eine Freundin warst und bist!

Ines F., Dir danke ich für den gemeinsamen und unterhaltsamen Weg zur Arbeit, für die vielen Gespräche und natürlich auch für die gemeinsame Zeit im Labor und außerhalb!

Benno und Tom, Euch beiden danke ich für den Spaß und Witz, den wir immer beim Essen hatten. Benno, Dir ein dickes Dankeschön für das schnelle Korrekturlesen und auch für den Spaß beim gemeinsamen Singen!

Dem gesamten Institut sowie allen Besuchern und Ehemaligen (Ina, Ute, Oleg, Martina, Iwa) danke ich für ein tolles Arbeitsklima und die schönen und lustigen Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern.

Den Mädels aus der Genetik, Katharina und Dorte, aber auch Sonja und Leni danke ich dafür, dass ich mich jeden Tag in eurer Zellkultur vergnügen durfte, für die vielen netten Gespräche und natürlich für´s Medium-Warmstellen!

Meinen F4-Mädels danke ich für die tolle Zeit, auch wenn ihr über ganz Deutschland verteilt seid! Vor allem aber bedanke ich mich bei Mona, die mit mir in den letzten 10 Jahren schon während des Studiums, aber auch während der Promotion Höhen und Tiefen gemeinsam durchlebt hat und mir bei so vielen Dingen mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank dafür!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen drei Lieben, Mama, Georg und Jonas bedanken, die mich immer unterstützt haben und immer für mich da sind!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Apoptose	1
1.1.1 Der rezeptorvermittelte Signalweg der Apoptose.....	2
1.1.2 Apoptotische DNA-Fragmentierung.....	4
1.2 Der DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF)	5
1.2.1 Die apoptotische Nuklease (CAD/DFF40).....	6
1.2.2 Der Inhibitor der apoptotischen Nuklease DFF40/CAD.....	8
1.2.2.1 Die Chaperonfunktion von ICAD/DFF45	9
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Materialien.....	13
2.1.1 Geräte	13
2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien.....	14
2.1.3 Kits	15
2.1.4 Enzyme und Marker.....	15
2.1.5 Antikörper.....	16
2.2 Mikrobiologische Arbeiten.....	17
2.2.1 Nährmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	17
2.2.2 <i>E. coli</i> -Stämme.....	17
2.2.3 Plasmidvektoren	18
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen.....	20
2.2.4.1 Bereitung TSS-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	20
2.2.4.2 Bereitung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
2.2.5.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen	21
2.2.5.2 Transformation elektrokompeter Zellen	22
2.2.6 Glycerinkulturen von <i>E. coli</i>	22
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.3.1 Elektrophorese.....	23

2.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese	23
2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.3.1.3 Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.1.4 Western Blot	24
2.3.2 Plasmid-DNA-Isolation	26
2.3.2.1 Ethanol-Fällung	26
2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	26
2.3.4 Klonierung und Modifikation von DNA	27
2.3.4.1 Spaltung mit Restriktionsenzymen	27
2.3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.3.5 PCR	27
2.3.5.1 PCR-Standardbedingungen	28
2.3.5.2 Mutagenese-PCR	28
2.4 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	29
2.4.1 Expressionssysteme	29
2.4.2 Expression der Proteine im präparativen Maßstab	30
2.4.3 Reinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	30
2.4.3.1 Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie	30
2.4.3.2 Anionenaustauschchromatographie	31
2.5 Expression und Reinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zelllinien	31
2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	31
2.5.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen	32
2.5.2.1 Transfektion mit TransFast™ Transfection Reagent	33
2.5.3 Ernte und Aufschluss eukaryotischer Zellen	33
2.5.4 Expression und Reinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen	33
2.6 Charakterisierung von Proteinen	33
2.6.1 Bestimmung der Konzentration von Proteinen	34
2.6.1.1 Rekombinante Proteine aus <i>E. coli</i>	34
2.6.1.2 Rekombinante Proteine aus eukaryotischen Zellen (Bradford-Assay)	34
2.6.2 Nuklease-Aktivitätsassay	34
2.6.3 DNA-Bindungsassay	35
2.6.4 Koimmunopräzipitationsversuche	35

2.6.5 Forcierte Heterodimerisierung	36
2.6.6 Proteasomaler Abbau	37
2.6.6.1 Mikroskopische Analyse des proteasomalen Abbaus von DD-CAD/DFF45 koexprimiert mit EGFP-DFF45/CAD in CHO-Zellen	37
2.6.6.2 Zellkern-Färbung transfizierter Zellen	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Charakterisierung einer möglichen <i>chaperone target region</i> (CTR) von CAD	39
3.1.1. Vorhersage einer intrinsisch ungefalteten Region in CAD (DFF40).....	39
3.1.2 Auswahl und Klonierung der CTR-Konstrukte.....	41
3.1.3 Expression der CTR-Varianten in <i>E. coli</i>	42
3.1.4 Reinigung der CTR-Varianten	43
3.1.4.1 Affinitätschromatographie.....	43
3.1.4.2 Anionenaustauschchromatographie.....	44
3.1.5 Aktivierungsassay der DFF-Komplexe	45
3.1.6 Nuklease-Aktivitätsassay.....	46
3.1.7 DNA-Bindungsassay.....	46
3.1.8 Nachweis der Nuklease mittels Western Blot.....	47
3.2 Oligomerenstatus der Untereinheiten im DFF-Komplex	49
3.2.1 Klonierung der DFF-Untereinheiten zum Nachweis oligomerer DFF-Komplexe.....	49
3.2.2 Koimmunopräzipitationsversuch.....	49
3.2.3 Dimerisierung von DFF45-Protomeren.....	50
3.3 Forcierte Heterodimerisierung von CAD-Protomeren.....	52
3.3.1 Auswahl und Klonierung der CAD-Varianten	54
3.3.2 Expression und Reinigung verschiedener CAD-Varianten.....	54
3.3.3 Doppel-Affinitätsreinigung der CAD-wt-Heterodimere.....	55
3.3.4 Nuklease-Aktivitätsassay mit FLAG/Strep-Konstrukten	56
3.3.5 Untersuchung der FLAG/HA-Konstrukte bezüglich forcierter Heterodimerisierung durch AP2197	57
3.3.6 Generierung von CAD-Heterodimeren aus verschiedenen fusionierten CAD-Varianten.....	57
3.3.7 Nuklease-Aktivitätsassay.....	59
3.4 Induzierter proteasomaler Abbau von CAD.....	60

3.4.1 Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-DFF45 koexprimiert mit CAD in HEK293T-Zellen	61
3.4.2 Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-CAD bzw. DD-DFF45 koexprimiert mit DFF45 bzw. CAD in HEK293T-Zellen	62
3.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-CAD/-DFF45 koexprimiert mit EGFP-DFF45/-CAD in CHO-Zellen	63
4. Diskussion	66
4.1 Charakterisierung einer möglichen <i>chaperone target region</i> (CTR) in CAD	66
4.1.1 Expression und Reinigung von CAD/DFF45-Komplexen	67
4.1.1.1 Stabilität der CAD/DFF45-Komplexe	67
4.1.2 Nuklease-Aktivität der CTR-Varianten	69
4.1.3 DNA-Bindungsverhalten der CTR-Varianten	70
4.2 Generierung künstlicher CAD-Heterodimere	71
4.2.1 Koimmunoprecipitationsversuche	72
4.3 Forcierte Heterodimerisierung von CAD-Protomeren	74
4.3.1 Expression und Reinigung der CAD-wt-Varianten	74
4.3.2 Doppel-Affinitätsreinigung	75
4.3.3 Nuklease-Aktivitätsassay	75
4.3.4 Dimerisierungsversuch der neu generierten Konstrukte	76
4.3.5 Forcierte CAD-Heterodimere	76
4.3.6 Nuklease-Aktivitätsassay	77
4.4 Der induzierte proteasomale Abbau von DD-DFF-Komplexen	78
4.4.1 Induzierter proteasomaler Abbau von CAD/DD-DFF45	79
4.4.2 Proteasomaler Abbau von DD-CAD/DFF45 und CAD/DD-DFF45	80
4.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-DFF-Komplexen	81
4.5 Ausblick	82
5. Zusammenfassung	84
6. Anhang	86
6.1 Abkürzungsverzeichnis	86
6.2 Pufferverzeichnis	88
7. Literaturverzeichnis	90

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein fundamentaler Mechanismus in lebenden Organismen, der erstmals von John Foxton Ross Kerr im Jahre 1965 beschrieben wurde. Aufgrund seiner Ergebnisse aus Gewebestudien war es ihm möglich, Apoptose von der Nekrose unterscheiden zu können¹. Im Jahre 1972 folgte eine Publikation im *British Journal of Cancer*, in der auch zum ersten Mal der Begriff Apoptose verwendet wurde². Diese Bezeichnung stammt aus dem Griechischen (απόπτωσης) und leitet sich ab von *apo* „weg“ und *ptosis* „Fall“ und beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst.

Apoptose ist ein Prozess, der für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase essentiell ist^{3,4}. Dieser Reaktionsweg steht unter der Kontrolle eines evolutionär konservierten, genetisch veränderten Programms, das in sterbenden Zellen aktiviert wird^{3,5,6}. Apoptose findet nur statt, wenn durch bestimmte Signale vermittelt wird, dass eine Zelle beschädigt ist oder nicht länger gebraucht wird. Somit wird eine Ansammlung von beschädigten und ungewollten Zellen in einem Organismus verhindert⁷. Beispielsweise wird schon während der Embryonalentwicklung die Apoptose benötigt, um für eine erfolgreiche Organogenese und die Entstehung der verschiedenen Gewebe zu sorgen⁸.

Das Sterben der Zelle durch Apoptose ist geprägt durch morphologische Charakteristika. Zu Beginn schrumpft die Zelle, da die Aktinfilamente des Cytoskeletts von Cysteinproteasen, sog. Caspasen gespalten werden. Es folgen die Chromatinkondensation (*pyknosis*) und die endonukleolytische Spaltung der DNA, worauf sich der Zellkern auflöst, was auch als *karyorrhexis* bezeichnet wird^{2,9-12}. Es kommt zu *membrane blebbing* und letztendlich zur Abschnürung sog. *apoptotic bodies* (s. Abb. 1.1). Apoptotische Zellen oder deren Fragmente werden schnell durch Phagozytose von benachbarten Zellen oder Makrophagen aufgenommen, um so im umgebenden Gewebe Entzündungsprozesse zu verhindern.

Apoptose kann sowohl in Gegenwart von Inhibitoren der RNA- oder Proteinsynthese¹³ als auch in Zellen, deren Nukleus entfernt wurde, ausgelöst werden¹⁴. Demzufolge sind alle apoptotischen Komponenten in lebenden Zellen vorhanden und müssen nur durch Stimuli aktiviert werden.

Es können Störungen in der Regulation der Apoptose vorliegen und dadurch Zellen, die sterben sollen, überleben und solche, die überleben sollen, sterben. Diese Störungen werden mit einer Reihe von Krankheitsbildern beim Menschen in Verbindung gebracht. Eine zu niedrige Apoptoserate kann z.B. zu Krebs führen. Diese Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, apoptoseauslösende Signale zu empfangen oder zu verarbeiten und sich somit selbst zu zerstören. Dies führt zur Proliferation entarteter Zellen. Übermäßige Apoptose

charakterisiert die Krankheitsbilder von AIDS und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson.

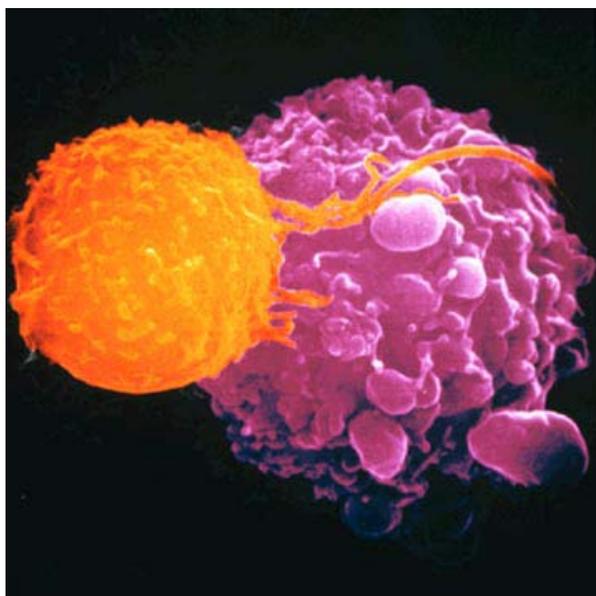


Abb. 1.1: Spätes apoptotisches Stadium einer Zelle. Von der apoptotischen Zelle (magenta) schnüren sich kleine *apoptotic bodies* ab, die von weißen Blutzellen (orange) entsorgt werden, um im umgebenden Gewebe Entzündungsprozesse zu verhindern (aus: www.sciencemuseum.org.uk).

Neben der Apoptose gibt es noch weitere Formen des Zelltodes, z.B. die Nekrose. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse, z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanische Verletzungen, zugrunde. Diese führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Durch Schädigung der Plasmamembran kommt es zum Platzen der Zelle, wodurch Stoffe aus dem Cytoplasma freigesetzt werden, die letztlich eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Ein Beispiel für die Nekrose ist der Sonnenbrand.

1.1.1 Der rezeptorvermittelte Signalweg der Apoptose

Die beiden wichtigsten apoptotischen Signalwege sind der Todesrezeptor-Signalweg (extrinsisch) (s. Abb. 1.2 A) und der mitochondriale Signalweg (intrinsisch) (s. Abb. 1.2 B)^{15,16}. Es gibt viele verschiedene Faktoren, die Apoptose auslösen. Dazu zählen Todesfaktoren wie FasL (Fas Ligand), TNF (*tumor necrosis factor*) und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing factor*), genotoxische Mittel wie Anti-Krebs-Medikamente und γ -Strahlung, sowie oxidativer Stress. Im Folgenden wird der Signalweg ausgehend von FasL beschrieben.

Fas ist ein Typl-Membranprotein und gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. FasL, ein TyplI-Membranprotein der TNF-Familie, besteht aus drei Untereinheiten und wird u.a. in aktivierten T-Zellen exprimiert. Durch die Bindung von FasL an die extrazelluläre Domäne des Fas-Rezeptors erfolgt dessen Trimerisierung in der Membran, wodurch die intrazelluläre Domäne (auch als *death domain* bezeichnet) das Todessignal weiterleitet. Diese *death domain* rekrutiert Procaspase-8 durch ein FADD (*Fas-associated death domain*) Adaptermolekül und veranlasst somit die Bildung des DISC (*death-inducing signalling complex*) an der Plasmamembran. Die nun aktivierte Caspase-8 kann auf zwei verschiedene Weisen Procaspase-3 aktivieren. Zum einen kann eine direkte Spaltung und Aktivierung von Procaspase-3 erfolgen, zum anderen geschieht dies indirekt über den mitochondrialen Signalweg¹⁷. Dabei spaltet Caspase-8 Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, das die Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran hervorruft. Dadurch wird Cytochrom c freigesetzt, das zusammen mit Apaf-1 (*apoptosis-activating factor 1*) und dATP (oder ATP) Caspase-9 aktiviert, die wiederum Caspase-3 aktiviert.

Caspase-3 zählt neben Caspase-6 und -7 zu den Effektorcaspasen, die letztendlich für den apoptotischen Tod der Zelle verantwortlich sind. Durch sie werden zum einen sekundäre Zielproteine wie die Nuklease CAD/DFF40 (*Caspase-activated DNase/DNA-Fragmentierungsfaktor 40*) aktiviert (s. 1.2) und zum anderen beteiligen sich die Effektorcaspasen, durch den Abbau von Lamin in der Zellmembran und Aktin im Zytoskelett, selbst aktiv am Abbau der Zelle.

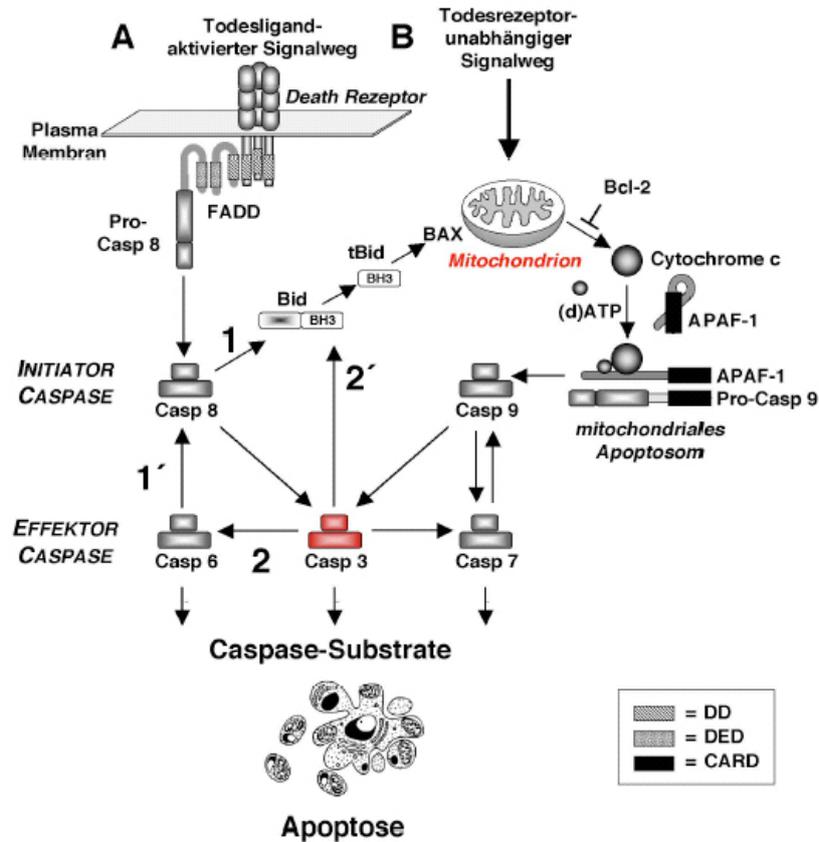


Abb. 1.2: Extrinsischer (A) und intrinsischer (B) Signalweg der Apoptose. Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch Bindung von Liganden an membranintegrierte *death receptors* vermittelt. Durch Bildung des DISC im Inneren der Zelle wird Procaspase-8 rekrutiert und aktiviert, die Effektor-Caspase-3 aktivieren kann. Durch den intrinsischen Apoptoseweg entstehen Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, durch die Cytochrom c ins Cytoplasma entlassen wird. Durch Interaktion von Cytochrom c, APAF-1 und Procaspase-9 entsteht das Apoptosom, welches die Aktivierung von Caspase-9 vermittelt. Caspase-3 ist ein Substrat von Caspase-9, so dass an diesem Punkt beide Signalwege vereint werden. Eine Verbindung von extrinsischem und intrinsischem Signalweg entsteht durch die Spaltung von Bid und der von tBid vermittelten Aktivierung von Bax, welches die *mitochondrial permeability transition pores* bildet¹⁸.

1.1.2 Apoptotische DNA-Fragmentierung

Ein im späten Stadium der Apoptose auftretendes Merkmal ist die DNA-Fragmentierung. Die erste Beobachtung der Entstehung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 200 bp bzw. einem Vielfachen von 200 bp machte Albert Wyllie in den achtziger Jahren bei Untersuchungen von Dexamethason-ausgelöster Apoptose in Ratten-Thymuszellen. Die Entstehung der sogenannten „DNA-ladder“ ist auf die im Zuge der Apoptose erfolgte Aktivierung von Endonukleasen zurückzuführen, welche die chromosomale DNA internukleosomal spalten. Apoptotische Nukleasen lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Neben den sogenannten zellautonomen (*cell autonomous*) Nukleasen, die die DNA der Zelle im Verlauf der Apoptose im Zellkern spalten, existieren Nukleasen zur kompletten Spaltung des Chromatins, die in Lysosomen kompartimentiert sind oder in den extrazellulären Raum

entlassen werden. Die Aufgabe dieser sogenannten „*waste management*“ Nukleasen liegt in der kompletten Beseitigung von Chromatin-Fragmenten sterbender Zellen, die beispielsweise vom Immunsystem getötet wurden, durch Phagozyten. DNase I und DNase II sind die prominentesten Nukleasen dieser Gruppe und sind für die Entwicklung von Säugern essentiell¹⁹.

Zu den zellautonomen apoptotischen Nukleasen zählt die mitochondriale Endonuklease G (EndoG), die im Zuge der Apoptose durch die mitochondrialen Poren ins Cytoplasma entlassen wird und in den Nukleus gelangt¹¹. Des Weiteren sind DNase γ und Mitglieder der Cyclophilin Proteinfamilie zu nennen, im Besonderen Cyclophilin E, dessen Beteiligung an apoptotischer DNA-Degradierung in *C. elegans* und Säugern, in Kooperation mit AIF (*apoptosis inducing factor*), gezeigt werden konnte^{19,20}.

Die wichtigste zellautonome apoptotische Nuklease ist CAD/DFF40 (*Caspase-activated DNase/DNA-Fragmentierungsfaktor 40*)²¹. Eine genaue Beschreibung dieser Nuklease sowie deren Inhibitor ICAD-L/DFF45 (*inhibitor of CAD large isoform/DNA-Fragmentierungsfaktor 45*) wird im nachfolgenden Kapitel vorgenommen.

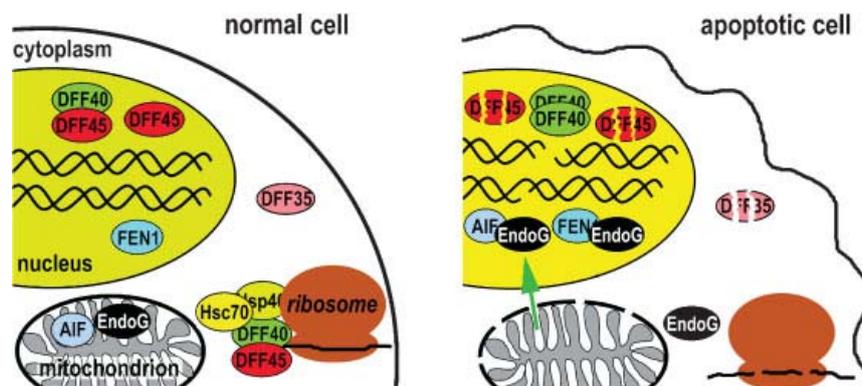


Abb. 1.3: Intrazelluläre Lokalisation apoptotischer Nukleasen und weiterer apoptotischer Faktoren, die in die DNA-Fragmentierung involviert sind, gezeigt in einer gesunden Zelle (links) sowie in einer apoptotischen Zelle (rechts)²².

1.2 Der DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF)

Der Prozess der DNA-Fragmentierung spielt in der Apoptose eine sehr wichtige Rolle und wird durch den DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF) eingeleitet. DFF ist ein heterodimerer Komplex bestehend aus der 40 kDa großen Nuklease DFF40 (DNA-Fragmentierungsfaktor 40, s. 1.2.1) und deren Inhibitor DFF45 (DNA-Fragmentierungsfaktor 45, s. 1.2.2) mit einer apparenten Größe von 45 kDa^{23,24}. Diese Bezeichnungen werden für die humanen Untereinheiten des DFF-Komplexes verwendet, wohingegen die murinen Orthologen von

DFF als CAD (*Caspase-activated DNase*) und ICAD-L (*inhibitor of CAD large isoform*) benannt werden.

Während der Biosynthese von CAD (DFF40) fungiert ICAD-L (DFF45) als spezifisches Chaperon für die Bildung einer katalytisch kompetenten Nuklease^{25,26}. Wenn dieser Komplex gebildet worden ist, kann die inhibitorische Untereinheit durch Caspase-3 gespalten werden und somit von der Nuklease dissoziieren²⁷⁻³⁰. Die dadurch aktivierte Nuklease ist nun in der Lage, nukleosomale DNA abzubauen³¹.

DFF findet man in latent aktiver Form im Zellkern wachsender, nicht-apoptotischer Zellen und nicht wie von Nagata beschrieben im Cytosol¹² (s. Abb. 1.3). Sowohl CAD (DFF40) als auch ICAD-L (DFF45) zeigen am C-Terminus ein NLS (*nuclear localisation signal*), das zur Komplex-Ansammlung im Kern beiträgt³². Durch Korn *et al.* konnte gezeigt werden, dass CAD (DFF40) im Komplex mit ICAD-L (DFF45) im Zellkern zwar DNA binden kann, es aber zu keiner DNA-Fragmentierung kommt³³. Ein weiterer Versuch zeigte, dass die Enzymaktivität von CAD (DFF40) höher war, wenn der Komplex zuvor mit DNA inkubiert wurde. Somit kann man davon ausgehen, dass DFF zunächst an DNA bindet und dann CAD (DFF40) durch Caspase-3 aktiviert wird, was schließlich zum Abbau der DNA führt.

Neben ICAD-L (DFF45) wurden verschiedene andere Proteine identifiziert, welche der Regulation des DFF-Komplexes dienen. Diese Proteine können in drei funktionelle Gruppen unterteilt werden: 1. Faktoren, welche eine korrekte Faltung und die Lokalisation der Nuklease steuern (z.B. Hsc70, Hsp40, Importin α/β). Der DFF-Komplex bindet bspw. über seine C-terminalen Kernlokalisierungssignale (NLS) an das Heterodimer Importin α/β und wird dadurch in den Zellkern importiert. 2. Aktivatoren der Nuklease wie z.B. das Histon H1. Dieses bindet über seine C-terminale Domäne an CAD (DFF40) und trägt somit durch die Stimulation der DNA-Bindung zur Aktivierung der Nuklease bei³⁴. 3. Inhibitoren der Nuklease wie z.B. Nukleophosmin/B23. Das Onkoprotein Nukleophosmin/B23, welches durch PI3P (Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat) aktiviert wird und mit diesem einen Komplex eingeht, bindet an CAD (DFF40) und inhibiert die Aktivität der Nuklease³⁵. Der heterodimere DFF-Komplex wird jedoch nicht gebunden.

1.2.1 Die apoptotische Nuklease (CAD/DFF40)

Der DNA-Fragmentierungsfaktor 40 kDa (DFF40) oder auch CAD (*Caspase-activated DNase*) genannt, ist eine sequenz-unspezifische doppelstrang-spezifische Endonuklease, die für die Spaltung nukleosomaler Linker-DNA und nachfolgender Chromatinkondensation während der Apoptose verantwortlich ist^{36,37}. Das CAD-Molekül aus der Maus besteht aus 344 AS und ist in drei Domänen gegliedert (s. Abb. 1.4 A).

Die regulatorische C1-Domäne umfasst die N-terminalen AS 1-85 und stellt eine CIDE (*cell death inducing DFF like effector*)-N-Domäne dar, die in vielen CIDE-Proteinen zu finden ist,

ebenso in ICAD-L (DFF45)³⁸. Die CIDE-N-Domäne von ICAD-L (DFF45) lagert sich an die CIDE-N-Domäne von CAD (DFF40) an und bewirkt somit die kotranslationale Komplexbildung. Domäne C2 umfasst die AS 86-131, wird aus drei α -Helices gebildet und ist wichtig für die Dimerisierung der Nuklease. Domäne C3 (AS 132-328) besteht aus fünf α -Helices, vier kurzen β -Strängen und einem langen C-terminalen *loop*, dem ein NLS (*nuclear localisation signal*) folgt.

Durch die Spaltung der inhibitorischen Untereinheit des DFF-Heterodimers durch Caspase-3 dissoziiert diese vom CAD (DFF40)-Protomer und es erfolgt eine Dimerisierung zweier Protomere in ein Homodimer. Die Kristallstruktur des aktiven Homodimers³⁶ (s. Abb. 1.4 B) zeigt eine tiefe Spalte, die von zwei C3-Domänen gebildet wird. Am Boden dieser Spalte befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms, ein $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv. Der Aufbau dieser Spalte, der an die Klingen einer Schere erinnert, ermöglicht dem Enzym die Unterscheidung zwischen kompakter DNA und den zu spaltenden DNA Linker-Regionen³⁶, da aus sterischen Gründen nur internukleosomale DNA gebunden werden kann.

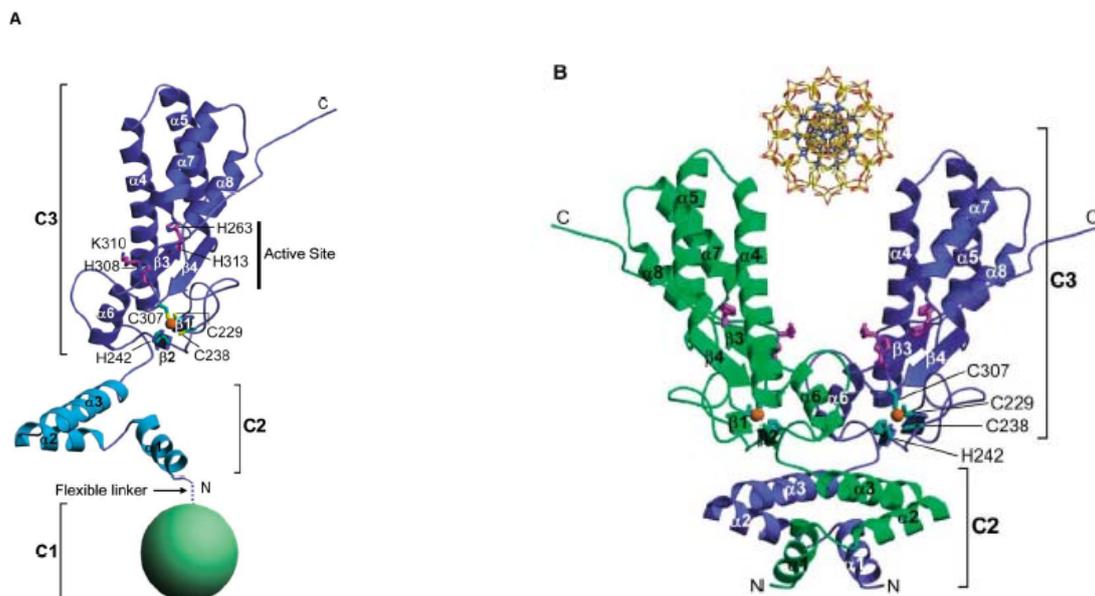


Abb. 1.4: Kristallstruktur von CAD. A Protomerstruktur von CAD. Da die C1-Domäne im Kristall keine regelmäßige Struktur bildet, ist sie als grüne Kugel dargestellt. Das aktive Zentrum befindet sich in der C3-Domäne. B Dimerstruktur von CAD. Durch die Dimerisierung entsteht eine tiefe Spalte, die von den beiden α 4-Helices gebildet wird. Am Boden dieser Spalte befindet sich das aktive Zentrum, ein $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv. Zusätzlich ist ein DNA-Strang abgebildet, der in diese Spalte diffundieren könnte³⁶.

Das aktive Zentrum wird aus den Aminosäureresten Asp262, His263, His308, Lys310 und His313 gebildet, wobei Asp262 und His308 zusammen mit zwei H₂O-Molekülen ein Mg²⁺-Ion binden, das für die Spaltung des DNA-Substrates unentbehrlich ist^{36,39}.

Nach der nukleolytischen Spaltung der DNA verbleibt CAD (DFF40) in der apoptotischen Zelle, da es an die Kernmatrix bindet. Dies hat vermutlich den Zweck, ein Austreten der aktiven Nuklease ins Gewebe und somit eventuelle Schäden an Nachbarzellen zu verhindern.

Es gibt eine Vielzahl von nukleären Proteinen, die mit CAD (DFF40) interagieren und möglicherweise dessen Aktivität regulieren. Dazu zählt Topoisomerase II α , die wahrscheinlich zusammen mit CAD (DFF40) zur Spaltung chromosomaler DNA in hochmolekulare Fragmente führt^{31,40}. Weitere Proteine wie Histon H1 und HMGB (*high mobility group box*) -1 und -2 steigern ebenfalls die Enzymaktivität. Zum Beispiel bindet CAD (DFF40) direkt an Histon H1, vermutlich, um die Nuklease zur DNA-Linker-Region zu leiten, wo nukleosomale DNA-Fragmentierung stattfindet^{22,31}.

1.2.2 Der Inhibitor der apoptotischen Nuklease DFF40/CAD

Die inhibitorische Untereinheit des DNA-Fragmentierungsfaktors weist zwei Isoformen auf, die durch differentielles Spleißen gebildet werden²⁸. ICAD-L (DFF45) (*inhibitor of caspase-activated DNase large isoform* bzw. DN-A-Fragmentierungsfaktor 45 kDa) umfasst 331 AS und dient ebenso wie die kürzere Spleißvariante ICAD-S (DFF35, s. Abb. 1.5) der Inhibition der Nuklease im Komplex. Durch Caspase-3-Spaltung des Inhibitors an den Aminosäureresten 117 und 224 verringert sich das Bindungsvermögen der so entstandenen Fragmente. Diese dissoziieren von der Nuklease, die somit aktiv ist (s. 1.2.1) und DNA degradieren kann.

Aufgrund dieser zwei Caspase-3-Schnittstellen lassen sich beide Isoformen DFF45/35 und ICAD-L/-S in drei Domänen (D1, D2 und D3) unterteilen. Am N-Terminus der Domäne D1 befindet sich eine CIDE (*cell death inducing DFF like effector*)-N-Domäne, die für die Wechselwirkung mit der CIDE-N-Domäne von CAD (DFF40) verantwortlich ist⁴¹. Sowohl Domäne D1 als auch D2 sind nach Untersuchungen von Li *et al.* von besonderer Bedeutung für die Inhibition der Nuklease⁴².

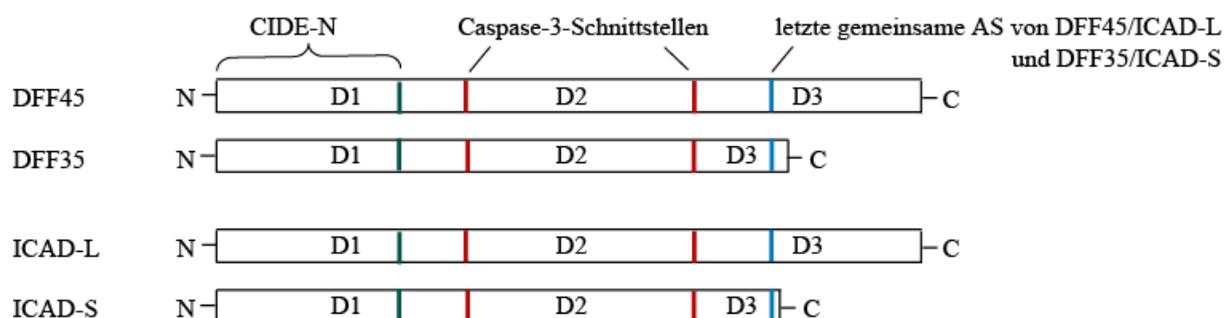


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von DFF45/DFF35 und ICAD-L/ICAD-S. Die beiden Caspase-3-Schnittstellen liegen bei AS 117 und AS 224. DFF45 und ICAD-L umfassen 331 AS, die kürzeren Spleißvarianten DFF35 und ICAD-S 268 AS bzw. 265 AS. Auf die letzte, mit der jeweiligen längeren Isoform gemeinsame AS (AS 261) folgen bei DFF35 noch sieben weitere AS (262-VGGNQGH-268), bei ICAD-S noch vier weitere AS (262-VGKN-265).

ICAD-L (DFF45) weist neben der Inhibitorfunktion noch eine weitere Funktion auf, und zwar die eines Chaperons. Wie bereits in 1.2 erwähnt, bindet ICAD-L (DFF45) an CAD (DFF40) während dessen Biosynthese und verhilft dem Protein zur korrekten Faltung. Lange Zeit konnte nur die Chaperonfunktion von ICAD-L (DFF45) nachgewiesen werden⁴³ und man findet in DFF-Komplexen aus verschiedenen Geweben hauptsächlich diese Isoform. Allerdings gibt es Gewebe, in denen Caspase-3-abhängige nukleolytische Aktivität nachgewiesen wird, die ausschließlich ICAD-S als Inhibitor aufweisen^{44,45}. Somit wurde vermutet, dass möglicherweise andere Chaperone zur korrekten Faltung von CAD (DFF40) beitragen. Scholz *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass ICAD-S zwar eine geringe, aber dennoch nachweisbare Faltungshelferfunktion besitzt³⁹.

Die Antwort auf die Frage, in welcher Form ICAD-L (DFF45) vor der Bindung an CAD (DFF40) vorliegt, ist umstritten. Die Untersuchungen von Widlak *et al.* ergaben, dass freies endogenes ICAD-L meist in Form eines Monomers vorliegt⁴⁶. Andere Ergebnisse besagen wiederum, dass ICAD-L Homooligomere bilden kann, deren biologische Funktion allerdings noch unklar ist⁴⁷.

1.2.2.1 Die Chaperonfunktion von ICAD/DFF45

Neben der DNase-inhibitorischen Funktion übt ICAD-L (DFF45) auch eine Faltungshelferfunktion aus. Im Gegensatz zu den generellen Chaperonen ist ICAD-L (DFF45) ein spezifisches Chaperon, dessen einzig bekanntes Substrat CAD (DFF40) darstellt. Wird CAD (DFF40) *in vivo* in Abwesenheit von ICAD-L (DFF45) synthetisiert, aggregiert es im Cytosol der Zelle¹².

Besondere Bedeutung für die Chaperonaktivität kommt dem C-Terminus von ICAD-L (DFF45) zu, der aus vier α -Helices (Aminosäurereste: 239-247, α 1; 257-265, α 2; 268-275, α 3 und 280-300, α 4) gebildet wird⁴⁸.

Die Kristallstruktur des C-Terminus zeigt, dass die Helices α 2 und α 3 eng an die lange, C-terminale α 4-Helix gepackt sind. Helix α 1 ragt senkrecht aus dieser Struktur heraus.

Die Helix-Struktur wird durch ein ausgedehntes Netz hydrophober Interaktionen stabilisiert, dessen Zentrum von den Aminosäuren L242 und L245 in Helix α 1, L260 und V263 aus Helix α 2, L271 und L275 aus Helix α 3, sowie V285, Q286, C289 und L293 aus Helix α 4 gebildet wird. Die Anzahl positiver und negativer Aminosäurereste ist ausgeglichen, allerdings sind die positiv geladenen gleichmäßig verteilt, die negativ geladenen dagegen sind nahe beieinander lokalisiert und bilden eine negativ geladene Oberfläche. Es wird vermutet, dass durch diese negative Oberfläche eine Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne von CAD (DFF40) vermittelt wird.

Bezüglich der Chaperonfunktion der kurzen Splice-Variante ICAD-S (DFF35) findet man in der Literatur kontroverse Diskussionen. Frühere Beobachtungen führten zu der Annahme, dass ICAD-S keinerlei Chaperonfunktion besitzt¹². Die Kristallstruktur des C-Terminus bestätigte diese Vermutung, da die Sequenz von ICAD-S in der Mitte von Helix α 2 endet und dadurch sowohl der hydrophobe Kern des C-Terminus zertrennt, als auch die negativ geladene Oberfläche nicht vorhanden ist⁴⁸. In ICAD-S folgen 4 Aminosäuren (₂₆₂VGKN₂₆₅) auf die letzte gemeinsame Aminosäure von ICAD-S und ICAD-L. Es könnte sein, dass dadurch Helix α 2 vervollständigt wird. Bis zu diesem Zeitpunkt existiert noch keine dreidimensionale Struktur des C-Terminus von ICAD-S.

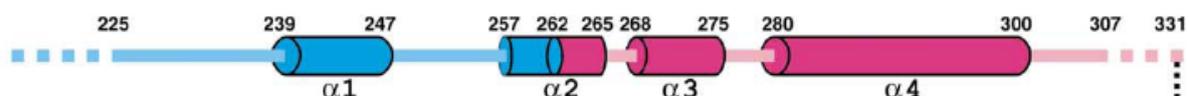


Abb. 1.6: Lokalisation der α -Helices von DFF45 (dargestellt in blau und pink) und DFF35 (dargestellt in blau)⁴⁸.

Allerdings findet man in speziellen Geweben, z.B. im menschlichen Gehirn, ausschließlich die kurze Splice-Variante ICAD-S (DFF35). Dies lässt vermuten, dass ICAD-S (DFF35) Chaperonaktivität ausüben muss oder dass diese von anderen Chaperonen übernommen wird.

Scholz *et al.* konnten zeigen, dass in Anwesenheit von ICAD-S (DFF35) eine aktive Form der Nuklease CAD (DFF40) produziert wird, allerdings war die Aktivität von CAD (DFF40) 40-50-fach geringer, als von CAD (DFF40) koexprimiert mit ICAD-L (DFF45)³⁹. Dies zeigt, dass die

Chaperonfunktion von ICAD-S (DFF35) im Vergleich zu ICAD-L (DFF45) weniger effektiv ist. Nicht nur der C-Terminus von ICAD-L (DFF45), sondern auch die beiden Splice-Varianten gemeinsame Domäne scheint demnach eine grundlegende chaperone Aktivität zu besitzen, die durch die Chaperonfunktion des C-Terminus von ICAD-L (DFF45) ergänzt wird.

Der Mechanismus der Faltungshelferfunktion der ICAD-Isoformen ist bis zu diesem Zeitpunkt unklar. Der Vergleich der C-Termini von DFF45 und DnaK, dem bakteriellen Homolog zum humanen Chaperon Hsp70, zeigt, dass beide eine ähnliche Struktur besitzen. Der C-Terminus von DnaK besteht aus fünf α -Helices (Helix A, B, C, D und E), die zusammen eine kompakte Deckel-Struktur formen⁴⁹. Dieser Deckel verschließt die Substrat-Bindestelle, sobald dort ein Substratpeptid gebunden wurde. Von besonderer Wichtigkeit für die Stabilität der Deckel-Struktur ist Helix D, da sie für die Formation eines antiparallelen Helix-Bündels aus Helix B, C und D sorgt. Diese Struktur stabilisiert den DnaK-Substrat-Komplex. Die Stabilisierung des Helix-Bündels wird durch einzelne Aminosäuren erreicht, wie z.B. E590 und L591, die Wechselwirkungen mit Helix B eingehen. Ist die Substrat-Bindestelle in DnaK unbesetzt, liegt der Aminosäurerest L543 aus Helix B in der hydrophoben Tasche der Bindestelle.

Nicht nur der Vergleich der Sekundärstruktur des DnaK C-Terminus mit dem C-Terminus von DFF45 zeigt strukturelle Ähnlichkeiten (s. Abb. 1.7), sondern der Vergleich der Sequenzen enthüllt auch, dass konservierte Aminosäurereste zwischen den C-Termini vorhanden sind. Aus dieser Beobachtung kann abgeleitet werden, dass die Helices in DFF45 eine ähnliche Funktion beinhalten und dass der C-Terminus ebenfalls eine Deckelstruktur zum Schutz des gebundenen Substrates CAD darstellen könnte.

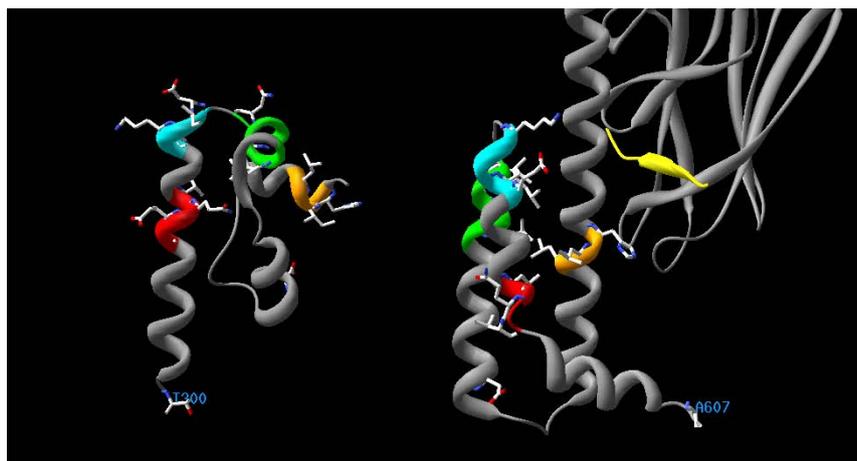


Abb. 1.7: Strukturvergleich der C-Termini von DnaK (rechts) und DFF45 (links). Einander entsprechende Bereiche sind mit gleichen Farben gekennzeichnet. Das Substrat-Peptid, gebunden in der Substratbindestelle von DnaK ist in gelb dargestellt.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

DFF besteht als heterodimerer Komplex aus Nuklease (CAD/DFF40) und Inhibitor (ICAD-L/DFF45), der jedoch auch über eine Chaperonfunktion verfügt. Da bisher wenig über das chaperone Verhalten von DFF45 bekannt war, sollte in dieser Arbeit eine mögliche Zielregion (*chaperon target region*) im DFF-Komplex innerhalb der Nuklease CAD untersucht werden, die erst durch die Chaperonfunktion des Inhibitors DFF45 ihre korrekte Faltung erhält. Es war bereits zuvor bekannt, dass CAD C-terminal eine intrinsisch unstrukturierte Region (IUR) aufweist, die möglicherweise in die Chaperonaktivität des Inhibitors involviert ist. Demzufolge sollten in dieser Region Aminosäurerest-Austausche eingefügt und die somit neu generierten CAD-Varianten zunächst exprimiert und gereinigt werden, um sie dann mittels Nuklease-Aktivitätsassay und DNA-Bindungsassay auf ihre DNA-Spalt- und Bindungseigenschaften hin untersuchen zu können und somit eine *chaperon target region* von CAD zu identifizieren.

Des Weiteren sollten künstliche Heterodimere von CAD generiert werden, um Aufschluss über den Mechanismus der DNA-Spaltung durch CAD zu erhalten. Zunächst bestand das Ziel darin, neue Konstrukte zu generieren und diese anschließend erfolgreich in eukaryotischen Zellen zu exprimieren. Neben dem CAD-wt-Konstrukt sollten weitere CAD-Varianten generiert werden, die einen Aminosäurerest-Austausch (im DNA-Bindemotiv oder im katalytischen Zentrum) oder zwei (in beiden Motiven) beinhalten. Nach der Expression sollte die Reinigung der Proteine und letztendlich deren Einsetzung in Nuklease-Aktivitätsassays erfolgen, um anhand der DNA-Spalteigenschaften und dem Einfluss der Aminosäurerest-Austausche eine Aussage bezüglich des Spaltmechanismus von CAD treffen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen DFF-Komplex bestehend aus der Nuklease CAD und deren Inhibitor/Chaperon DFF45 in Bezug auf den induzierten proteasomalen Abbau zu untersuchen. Es ist bisher nicht bekannt, ob beide DFF-Untereinheiten gemeinsam von Proteasen abgebaut werden oder ob es auch möglich wäre, dass nur eine Untereinheit, Nuklease oder Inhibitor/Chaperon, degradiert wird. Dies sollte mit Hilfe einer destabilisierenden Domäne DD, die an dem zu untersuchenden Protein fusioniert wird, und eines Stabilisierungsliganden, der das DD-fusionierte Protein vor Abbau schützen soll, durchgeführt und analysiert werden. Auf diese Weise könnte auch eine zeitliche Kontrolle der Nuklease für biotechnologische Anwendungen erreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Neben der allgemein üblichen Laborausstattung wurden die nachfolgend aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Geräte, deren Verwendung und Hersteller

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tecnomara/Integra Biosciences
BioDocAnalyse	Biometra
Biosys™ 2000 Series-HPLC-System	Beckman
BlueFlash Semi-Dry Blotter	SERVA
Brutschrank	Mommsen
Elektrophoresekammer, horizontal	SERVA, Keutz
Elektrophoresekammer, vertikal	Angewandte Gentechnik Systeme
Electrophoresis Power Supply-EPS 3500 XL	Pharmacia Biotech
Elektroporator Easyject	EquiBio
Heizblock Dri-Block DB3	Techne
Heizrührer IKAMAG®	Janke & Kunkel
Kühlzentrifugen Centrifuge J6-HC und J2-HS	Beckman
Luftschüttler Innova 40	New Brunswick Scientific
MonoQ HR 5/5- und HR 10/10-Säulen	Pharmacia
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
pH-Meter HI 991001	HANNA
Schüttelinkubator 1083	GFL Labortechnik
Spektrophotometer U-1100	Hitachi
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems
Thermocycler Tpersonal	Biometra
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf
Ultraschall-Desintegrator Sonifier 250	Branson
Vakuumpumpe	HetoLab Equipment
Vakuumbzentrifuge Hetovac VR-1	HetoLab Equipment
Vortexer VF2	Janke & Kunkel

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Alle verwendeten Chemikalien/Biochemikalien besaßen den Reinigungsgrad *pro analysi* und sind in der nachfolgenden Liste aufgeführt.

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Bio-/Chemikalien, deren Verwendung und Hersteller

Chemikalie	Hersteller
40%-Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	AppliChem
Agar	AppliChem
Agarose	AppliChem
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
AP21967 (Rapalog)	ARIAD
APS	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma
Chaps	AppliChem
Chloramphenicol	AppliChem
Coomassie® <i>Brilliant Blue</i>	Serva
DNA-Längenstandards	MBI-Fermentas
dNTPs	Peqlab
DMEM	Invitrogen
DTT	Fermentas
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare
EDTA	AppliChem
EGTA	AppliChem
Ethanol	Merck
EZview™ –Red Anti-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma
EZview™ –Red Anti-HA Affinity Gel	Sigma
EZview™ –Red Anti-cMyc Affinity Gel	Sigma
FLAG® Peptide	Sigma
3X FLAG® Peptide	Sigma
Fötiales Kälberserum	Invitrogen
Glutathion (reduziert)	Merck
Glutathion Sepharose	Amersham Bioscience
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Guanidiniumchlorid	Merck
HA-Peptide	Sigma
Hefeextrakt	Biochemica
HEPES	AppliChem

Hybond™ –P Membran	GE Healthcare
Imidazol	AppliChem
IPTG	AppliChem
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Polyethylenglycol 3550	Fluka
RPMI-Medium	Invitrogen
Salzsäure	Merck
SDS	Serva
<i>Shield1</i>	ARIAD
Streptomycin	Invitrogen
TEMED	Merck
Tetracyclin-Hydrochlorid	AppliChem
TransFast™ Transfection Reagent	Promega
Tris	AppliChem
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck

2.1.3 Kits

Bei der Anwendung von Kits wurde grundsätzlich nach Angaben des Herstellers verfahren.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Kits, deren Verwendung und Hersteller

Kit	Hersteller
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Pure Yield™ Plasmid Midi-/Maxiprep System	Promega
Quick Start Bradford Protein Assay	Bio-Rad

2.1.4 Enzyme und Marker

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Enzyme und Größenstandards, sowie deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz und Hersteller

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
BamHI	G GATCC	Fermentas
BglII	A GATCT	Fermentas
BseRI	GAGGAGNNNNNNNNN N	NEB
DpnI	GA TC	Fermentas
EcoRI	G AATTC	Fermentas
Eco105I	TAC GTA	Fermentas
HindIII	A AGCTT	Fermentas
HpaI	GTT AAC	Fermentas
MfeI	C AATTG	Fermentas
NheI	G CTAGC	Fermentas
NotI	GC GGCCGC	Fermentas
Paul	G CGCGC	Fermentas
SacI	GAGCT C	Fermentas
SalI	G TCGAC	Fermentas
SpeI	A CTAGT	Fermentas

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Enzyme und deren Hersteller

Enzym	Hersteller
Caspase 3	Eigenherstellung
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Eigenherstellung
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eigenherstellung

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Größenstandards und deren Hersteller

Größenstandard	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
pUC 8 Mix	Fermentas

2.1.5 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper sowie deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.7: Liste der verwendete Antikörper und deren Hersteller

Antikörper	Hersteller
Anti-Actin, polyclonal	Sigma
Anti-DFF45/35 (NT), polyclonal	Assay designs

Anti-FLAG [®] M2-Peroxydase (HRP), monoclonal	Sigma
Anti-GST Antibody	Pharmacia Biotech
Anti-HA Peroxydase (HRP), monoclonal	Roche
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	CALTAG Laboratories
Anti-Sheep/Goat IgG-POD	Boehringer Mannheim

2.2 Mikrobiologische Arbeiten

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle mikrobiologischen Arbeiten unter möglichst sterilen Bedingungen mit autoklavierten, keimfreien Geräten, Materialien und Lösungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Das Autoklavieren der Gebrauchsgegenstände erfolgte im Autoklaven für 30 min bei einer Temperatur von 120 °C.

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

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

LB-Medium: 10.0 g Caseinhydrolysat, 5.0 g Hefeextrakt, 10.0 g NaCl,
mit NaOH auf pH 7.5 einstellen, ad 1 l mit H₂O

Zur Herstellung von Festmedien in Petrischalen wurde vor dem Autoklavieren dem LB-Vollmedium noch Bacto-Agar (1.5 % (w/v)) zugesetzt. Um sogenannte Selektivmedien herzustellen, wurden nach dem Autoklavieren verschiedene Antibiotika zugegeben.

Im Gegensatz dazu, wurden den flüssigen Selektivmedien die Antibiotika erst unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt.

2.2.2 *E. coli*-Stämme

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden die im Folgenden unter Angabe ihres Genotyps beschriebenen *E. coli*-Stämme zu Expressions- und Klonierungszwecken eingesetzt. Die Anzucht von Flüssigkulturen kleiner Volumina (3 ml) in Glasröhrchen und größerer Volumina (bis 500 ml) in Kolben oder Schikanekolben erfolgte in Luftschüttlern bei 28 °C bzw. 37 °C. Die Kultivierung von *E. coli* auf Platten mit Festmedium erfolgte im Brutschrank bei 37 °C.

BL21Gold(DE3) (Novagen) [*F*⁻, *ompT*, *hsdS*(*r*_B⁻ *r*_B⁻) *dcm*⁺, *Tet*^r, *gal* λ(DE3), *endA*, *Hte*] wurde zur Expression von Genen unter Kontrolle des T7φ10-Promotors benutzt.

XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene) [Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrBC*-*hsdSMR*-*mrr*)173, *endA*1, *sup*-E44, *thi*-1, *recA*1, *gyrA*96, *relA*1, *lac*[*F*⁻ *pro* *AB lac*^q*ZAM15 Tn 10*(*Tet*^r)]] wurde bevorzugt als

Stamm zur Generierung von Plasmid-DNA verwendet. Aufgrund seiner geringeren Rekombinationsrate (*recA1*) und der funktionslosen Endonuklease (*endA1*) eignet er sich hervorragend zur Isolierung von Plasmid-DNA mit einem hohem Anteil an scDNA, die in dieser Arbeit durch Midi-Plasmidpräparationen gewonnen wurde.

2.2.3 Plasmidvektoren

Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Plasmide als Expressionsvektoren eingesetzt.

pACET-DFF45 ist ein Derivat von pMQ393. Das DFF45-Gen ist zusammen mit einer ribosomalen Bindungsstelle *upstream* des Gens in die PaeI- und HindIII-sites des Expressionsvektors inseriert worden. Die beiden hintereinander liegenden DNA-Abschnitte sind aus den PaeI- und HindIII-sites des Konstrukts pET15b-DFF45 durch die entsprechenden Restriktionsenzyme herausgeschnitten worden. Der entstandene Vektor pACET-DFF45⁵⁰ besitzt als Selektionsmarker das Chloramphenicol-Resistenzgen und den *p15A-origin of replication*.

pBluescript SK+ (Stratagene) wurde sowohl für DNA-Aktivitätsstudien (s. 2.6.2) als auch für DNA-Bindungsstudien (s. 2.6.3) von DFF verwendet. Dieser Vektor besitzt einen *lac*-Promotor, codiert außerdem für das α -Fragment der β -Galaktosidase und verleiht Ampicillinresistenz. Zudem enthält er eine MCS (*multiple cloning site*), die von den beiden Restriktionsenzymen Sall und KpnI flankiert wird (SK). Das Plus (+) gibt an, in welche Richtung der *f1-origin* abgelesen wird.

pC₄-EN-F1 (ARIAD) wurde in dieser Arbeit verwendet, um Heterodimere von verschiedenen CAD-Varianten zu erzeugen. Der Vektor codiert für FKBP12 in Form eines Fusionsproteins, welches einen N-terminalen Epitop-tag (HA) sowie ein Kernlokalisierungssignal (NLS des *SV40 large T antigen*) enthält. Dem NLS folgt eine einzelne Kopie von FKBP12, welches (zusammen mit der FRB-Domäne s.u.) für die Heterodimerisierung verantwortlich ist.

Um die in dieser Arbeit verwendeten Enzym-Varianten zu erhalten, wurden SpeI und BglII gespaltene PCR-Produkte in den SpeI und BamHI gespaltenen Expressionsvektor eingesetzt. Als *templates* wurden die Plasmide pCI-CAD wt/R168/R168+H263 verwendet. Gleichzeitig wurde C-terminal ein weiterer tag (FLAG) eingeführt.

Die auf dem Plasmid codierte cDNA wird unter der Kontrolle des humanen CMV *enhancer/promoter* exprimiert.

pC₄-R_HE (ARIAD) wurde ebenfalls dazu verwendet, um Heterodimere von CAD-Varianten zu generieren. Der Vektor codiert, ähnlich wie pC₄-EN-F1, ein Fusionsprotein, welches eine

einzelne Kopie des modifizierten FRB_{2098L} (R_H) enthält, gefolgt von einem C-terminalem HA-tag. R_H besteht aus den Aminosäuren 2021-2113 des humanen FRAP, in dem Thr2098 zu Leucin mutiert wurde. Auch hier wurden SpeI und BglII gespaltene PCR-Produkte in den SpeI und BamHI gespaltenen Expressionsvektor eingesetzt, um die gewünschten CAD-Varianten zu erhalten. In diesem Fall dienten pCI-CAD wt/H263 als *templates*.

Auch die auf diesem Plasmid codierte cDNA wird unter der Kontrolle des humanen CMV *enhancer/promoter* exprimiert.

pCDNA 3.1 wurde in dieser Arbeit für die Expression von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-CAD- bzw. EGFP-DFF45-Fusionsproteinen in CHO-Zellen (s. 2.5.1) eingesetzt. Dieser Vektor von Invitrogen besitzt den CMV-Promotor und eignet sich deshalb für die Expression in eukaryotischen Zelllinien.

pCI (Promega) ist ein Vektor, der sich ebenfalls für die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen eignet. Er besitzt neben dem CMV-Promotor einen T7-Promotor für *in vitro* Translationen und ein Intron vor der *multiple cloning site*.

In dieser Arbeit wurden verschiedene pCI-Varianten eingesetzt. Zum einen wurde pCI-cmyc-DFF45 für die Expression in eukaryotischen Zellen eingesetzt und zum anderen dienten pCI-CAD wt/R168/ H263/R168+H263 als *template* für die PCR, um Inserts für die pC₄-Vektoren zu generieren (s.o.). Desweiteren wurden pCI-Konstrukte generiert, pCI-CAD-HA und pCI-DFF45-HA, um den proteasomalen Abbau von CAD bzw. DFF45 zu zeigen.

pGEX-2T-mCAD diente in der vorliegenden Arbeit der Expression von GST-fusioniertem, murinem CAD-Wildtyp (GST-mCADwt). Um dieses Konstrukt zu erhalten, wurde ein BglII und EcoRI gespaltenes PCR-Produkt in den BamHI und EcoRI gespaltenen Expressionsvektor pGEX-2T (Amersham Biosciences) eingesetzt. GST-mCADwt steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors in diesem Vektor, der außerdem für einen konstitutiv exprimierten *lac*-Repressor codiert und Ampicillinresistenz verleiht.

Enzym-Varianten wurden durch ortsgerichtete Mutagenese mittels der PCR nach einem Protokoll von Kirsch und Joly⁵¹ hergestellt⁵². Das Plasmid pGEX-2T-mCADwt (s.o.) diente dabei als Template.

pTuner (Clontech) ist ein Vektor, der es möglich macht, die Menge an gewünschtem Protein in eukaryotischen Zellen präzise zu regulieren. Er kodiert eine 12 kDa große Domäne, die FKBP (L106P) Destabilisierungsdomäne (DD), die eine schnelle Degradation des Proteins, mit dem sie fusioniert ist, bewirkt. Wenn das DD-fusionierte Protein in der Zelle

exprimiert ist, kann die Proteinmenge schnell erhöht werden, indem *Shield1*, ein Stabilisierungsligand, dem Medium hinzugefügt wird (s. 2.6.6).

Neben dem aktiven humanen CMV-Promotor $P_{CMV\ IE}$ besitzt der Vektor den *SV40 origin of replication*, welcher die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden in Anwesenheit des *SV40 large T antigen* ermöglicht.

Um den proteasomalen Abbau von CAD bzw. DFF45 untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit CAD und DFF45 mittels PCR mit einem C-terminalen HA-tag versehen. Die mit HindIII und Sall gespaltenen PCR-Produkte wurden schließlich in den HindIII und Sall gespaltenen pPTuner-Vektor eingesetzt.

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli-Zellen sind von Natur aus nicht in der Lage, DNA aufzunehmen. Für eine effiziente Transformation mit DNA, müssen die Zellen aufnahmefähig gemacht werden. In dieser Arbeit wurden zwei Arten kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt.

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

Dieses Verfahren geht auf die TSS-Methode (*Transformation Storage Solution*) zurück⁵³, und zeichnet sich durch eine einfache Handhabung und eine hohe Transformationseffizienz aus. Die verwendeten Gefäße und die TSS-Lösung wurden zuvor autoklaviert bzw. mit Ethanol ausgespült und auf Eis vorgekühlt.

Die Bereitung der *E. coli*-Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Zunächst wurde eine 3 ml-Vorkultur ü.N. bei 37 °C im Luftschüttler inkubiert;
2. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 0.5 OD^{600nm} (frühe logarithmische Phase) angezogen;
3. Diese Zellen wurden nun 10 min bei 4000 rpm (4450 × g) und 4 °C abzentrifugiert und auf Eis gelagert;
4. Das Zellpellet wurde danach in 0.1 Vol. (bezogen auf das ursprüngliche Kulturvolumen) eiskaltem TSS (LB-Vollmedium mit 10 % (w/v) PEG 6000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM Mg²⁺ (MgCl₂ oder MgSO₄), pH 6.0-6.5) aufgenommen und vorsichtig resuspendiert;
5. Die nicht sofort benötigten 200 µl Aliquots wurden bei -196 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Derartig behandelte Zellen waren sofort kompetent und konnten zur Transformation eingesetzt werden. Die bei -80 °C gelagerten Stämme behielten für 2-3 Monate ihre Kompetenz.

2.2.4.2 Bereitung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Elektrokompetente Zellen werden für eine kurze Zeit Hochspannungsimpulsen ausgesetzt, wodurch kleine Öffnungen in der Zellwand entstehen. Durch diese Öffnungen kann nun externe DNA, die sich im Medium befindet, in die Zellen aufgenommen werden. Bei diesem Verfahren ist es wichtig, dass sowohl die Zellen als auch die im Medium befindliche DNA in Ionen-freier Lösung vorliegt, was durch mehrmaliges Waschen mit 10%-igem Glycerin erreicht wird.

Die verwendeten Gefäße und Lösungen wurden zuvor autoklaviert bzw. mit Ethanol ausgespült und auf Eis vorgekühlt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Durchführung entsprach folgendem Protokoll:

1. Zunächst wurde eine 50 ml Vorkultur ü.N. bei 37 °C im Luftschüttler inkubiert;
2. 10 ml dieser Vorkultur wurden in 2 x 500 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 0.5 OD^{600nm} (frühe logarithmische Phase) angezogen;
3. Diese Zellen wurden nun 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert und auf Eis gelagert;
4. Anschließend folgten mehrere Waschschrte, wofür die Zellpellets in 250 ml, 150 ml, 40 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert wurden;
5. Zuletzt wurden die Pellets in 2 ml eiskalter Glycerinlösung resuspendiert, in Aliquots á 80 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.2.5.1 Transformation TSS-kompetenter Zellen

1. Ein Aliquot (200 µl) TSS-kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 10 ng-2 µg Plasmid in gelöster Form für 30 min bei 0 °C inkubiert;
2. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und dann auf Eis abgekühlt;
3. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz mit 800 µl sterilem LB-Vollmedium versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert;
4. Die Zellen wurden anschließend pelletiert und das überstehende Medium dekantiert. Im verbleibenden Rest (in den üblicherweise verwendeten Eppendorfreaktionsgefäßen ca. 100 µl) wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert;

5. Schließlich wurde 50 μl oder 100 μl der Zellsuspension auf Selektivplatten ausplattiert; die restlichen Zellen wurden erneut pelletiert, nach Dekantierung im verbliebenen Medium aufgenommen und ebenfalls ausplattiert.

Die Selektivplatten wurden ü.N. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.2 Transformation elektrokompeter Zellen

Der Transfer von DNA durch Elektrotransformation beruht darauf, dass kurze Hochspannungsimpulse kleine Öffnungen in der Zellhülle verursachen, durch welche exogene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann.

Die Transformation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Ein Aliquot (80 μl) elektrokompeter Zellen wurde auf Eis kurz angetaut und mit 1-200 ng salzfreier DNA versetzt, die zum größten Teil in der *supercoiled* Form vorliegen sollte, weil sie in dieser Form besser von den Bakterienzellen aufgenommen werden kann;
2. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben;
3. Die Transformation erfolgte mit maximaler Kapazität von 50 μF , einem Widerstand von 150 Ω , sowie einer vorgelegten Spannung von 1750 V, einer Stromstärke von 25 mA und einer maximalen Leistung von 25 W. Die Zellen wurden im Elektroporator kurzfristig diesem elektrischen Feld ausgesetzt;
4. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 60 min bei 37 °C inkubiert;
5. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen, wie bereits bei der TSS-Transformation (s. 2.2.5.1) beschrieben, ausplattiert.

2.2.6 Glycerinkulturen von *E. coli*

1. Zunächst wurde eine 3 ml-Vorkultur eines *E. coli*-Stammes mit dem gewünschten Plasmid mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und ü.N. im Luftschüttler inkubiert;
2. Aus dieser Vorkultur wurden 100 μl in eine 3 ml-Kultur überführt und bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 0.5 OD^{600 nm} (frühe logarithmische Phase) angezogen;
3. Schließlich wurden 800 μl dieser Hauptkultur unter sterilen Bedingungen mit 200 μl Glycerin gemischt, 20 min auf Eis inkubiert und dann bei -80 °C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Elektrophorese

Für die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen wurden elektrophoretische Verfahren verwendet⁵⁴.

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von hochmolekularen Nukleinsäuren (> 1000 bp) verwendet, wohingegen die Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Nukleinsäuren einer Länge unter 1000 bp eingesetzt wurde⁵⁵.

Für Proteinanalysen wurde ebenfalls Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt, allerdings in Gegenwart von 0.1 % Natriumdodecylsulfat (SDS (*sodium dodecyl sulfat*)-PAGE)⁵⁶.

2.3.1.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der DNA-Bindung des DFF-Komplexes CAD/DFF45, die Spaltung von einigen Substraten durch CAD, sowie die Kontrolle von Plasmidpräparationen wurden mit horizontaler Agarosegelelektrophorese nach Zugabe von 0.2 Vol. Agaroseauftragspuffer (AAP) durchgeführt.

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

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

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

Die Elektrophorese fand mit maximal 10 V/cm-Gellänge und bei RT statt. Große Gele (20 cm - 25 cm × 10 cm) wurden bereits vor dem Lauf mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0.25 nM) versehen, kleine Gele (10 cm × 10 cm) wurden nach dem Lauf in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend gewässert. Die DNA-Banden konnten mit einer Geldokumentationsanlage durch UV-Licht sichtbar gemacht werden, da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die DNA interkaliert. Die Bilder wurden sowohl elektronisch gespeichert als auch ausgedruckt.

2.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in 8 %igen Gelen (Acrylamid : Bisacrylamid / 29 : 1) in TPE-Puffer (Tris-Phosphat-EDTA-Puffer) mit einer Größe von 10 cm x 10 cm x 0.1 cm bei einer Stromstärke von 45 mA analysiert.

TPE-Puffer: 80 mM Tris-Phosphat, 2 mM EDTA, pH 8.0

Die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt, dann gewässert und mit der Geldokumentationsanlage ausgewertet.

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

In dieser Arbeit wurde zur Proteinanalyse die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Aufgrund der Anwesenheit des Detergens SDS (*sodium dodecyl sulfate*) konnte die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen bzw. ihrer Untereinheiten ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht erfolgen.

Als Molekulargewichtsstandard wurde die Proteinmischung PageRuler (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 kDa) verwendet.

Die Gele bestanden aus einem 12 %igen Trenngel (Acrylamid : Bisacrylamid / 29 : 1) mit pH 8.8 und einer Größe von 9 cm x 6 cm x 0.1 cm, sowie einem 6 %igen Sammelgel (pH 6.8) mit einer Größe von 9 cm x 3 cm x 0.1 cm.

Der Lauf erfolgte bei einer Stromstärke von 35 mA. Die Gele wurden anschließend dreimal für 5 min gewässert, in *Coomassie[®] Brilliant Blue* gefärbt und mit Wasser wieder entfärbt. Die Proteinbanden behielten dabei ihre Färbung.

2.3.1.4 Western Blot

Western *blotting*⁵⁷ ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem man geringe Proteinmengen sichtbar machen kann, für die die SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie[®] Brilliant Blue* Färbung nicht empfindlich genug ist. In dieser Arbeit wurde der Western Blot eingesetzt, um das Expressionsniveau und Dimerisierungsverhalten von HA- bzw. FLAG-fusionierten CAD-Varianten in HEK293T-Zellen zu überprüfen. Desweiteren wurde der Western Blot eingesetzt, um den proteasomalen Abbau von HA-fusioniertem CAD bzw. DFF45 zu untersuchen.

Die Proteine wurden aus einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch (*Elektro-blotting*) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dies geschah nach der *semidry blotting*-Methode in einem kontinuierlichen Puffersystem.

Filterpapiere, Gele und Membranen wurden vor dem *blotting* in Transferpuffer eingelegt.

Die Proteine wurden bei einer angelegten Spannung von 15 V (20 V bei zwei Gelen) vom Gel auf die Membran übertragen.

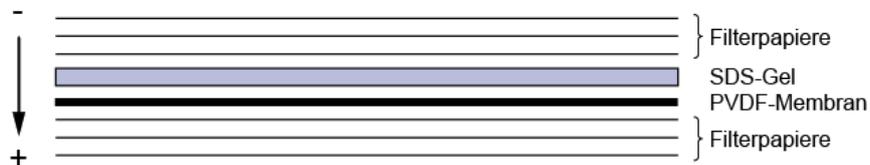


Abb. 2.1: Aufbau eines Western Blots. Auf drei Filterpapieren wird zunächst die PVDF-Membran, die zuvor in MeOH aktiviert wurde, gelegt, gefolgt vom Trenngel und schließlich wieder drei Filterpapieren. Zuletzt wird mit einem Glasstab die Luft unter den Filterpapieren entfernt, indem das Ganze glatt gerollt wurde.

Um unbesetzte Bindungsstellen auf der Membran zu belegen, wurde die Membran 1-2 h in Blockpuffer eingelegt. Anschließend wurde die Membran gewaschen.

Der Nachweis der interessierenden Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern (s. Tabelle 2.8) in einer nachfolgenden Reaktion mit Anti-Immunglobulinen, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind.

Der erste Antikörper erkannte spezifisch das gesuchte Protein. Nach 1-2 stündiger Inkubation der Membran in der Antikörper-Lösung (1 x PBST, 2.5% Magermilchpulver, Antikörper) folgten drei Waschschrte zu je 10 min. Wenn der erste Antikörper nicht mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, wurde anschließend die zweite Antikörperlösung auf die Membran gegeben. Meerrettich-Peroxidase ist ein Enzym, welches in der Lage ist Luminol unter Lichtaussendung zu oxidieren.

Nach weiteren drei Waschschrten wurde Luminol-haltige ECLTM-Detektionslösung auf die Nitrozellulosemembran (Amersham bioscience) pipettiert und die Lichtemission durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak) nachgewiesen.

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Antikörper und deren Arbeitsverdünnung

Antikörper	Verdünnung
Anti-Actin, polyclonal	1:5000
Anti-DFF40/CAD (IN), polyclonal	1:500
Anti-DFF45/35 (NT), polyclonal	1:500
Anti-FLAG [®] M2-Peroxidase (HRP), monoclonal	1:500
Anti-GST Antibody	1:1000
Anti-HA Peroxidase (HRP), monoclonal	1:2000
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:4000
Anti-Sheep/Goat IgG-POD	1:2500

2.3.2 Plasmid-DNA-Isolation

Zur Überprüfung neuer Plasmid-Konstrukte musste die Plasmid-DNA zuvor aus den entsprechenden *E. coli*-Zellen isoliert werden. Dazu wurde eine Plasmid-Mini-Präparation mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Firma Promega durchgeführt. Dabei wurde nach einem Protokoll des Herstellers vorgegangen, welches dafür geeignet ist, aus einer 3 ml-Kultur bis zu 15 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

Um eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine Plasmid-Midi-/Maxi-Präparation durchgeführt. Hierzu wurde das Pure Yield™ Plasmid Midi-/Maxiprep System der Firma Promega eingesetzt, wodurch aus 250 ml Kulturen eine Ausbeute von 100-800 ng/µl Plasmid-DNA erreicht wurde. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers. Beide Methoden sind Modifikationen des Verfahrens der alkalischen Lyse⁵⁸.

2.3.2.1 Ethanol-Fällung

Da für einige Versuche Plasmid-DNA in sehr hoher Konzentration benötigt wurde, konnte dies durch eine Ethanol-Fällung erreicht werden. Das Prinzip der EtOH-Fällung beruht auf der Tatsache, dass EtOH zum einen die Löslichkeit der DNA erniedrigt und zum anderen ihr die Hydrathülle entzieht, wodurch die DNA ausfällt. Gleichzeitig kompensieren Kationen (NaAc) die negative Ladung des Phosphatrückgrates.

Zur Durchführung wurde 1 Vol. DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5.2) und 2.5 Vol. EtOH abs. gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, das erhaltene Pellet wiederum mit 70 % EtOH abs. gewaschen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde die gefällte DNA einrotiert und in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Somit konnten bis zu 3.5 µg/µl Plasmid-DNA erhalten werden.

2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Aufnahme eines Spektrums im Wellenlängenbereich zwischen 320 nm und 220 nm bestimmt. Dabei entspricht $1 \text{ E}^{260 \text{ nm}}$ 50 ng/µl dsDNA.

2.3.4 Klonierung und Modifikation von DNA

2.3.4.1 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsspaltung von DNA wurde eingesetzt, um die korrekte Länge von Plasmiden oder PCR-Produkten zu überprüfen (analytische Restriktionsspaltung) oder um Fragmente mit den benötigten Enden für die Klonierung in einen Plasmid-Vektor zu erzeugen (präparative Restriktionsspaltung). Für analytische Spaltungen wurden 0.1-0.5 µg DNA mit 10-20 U des Restriktionsenzym und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem 10 µl-Ansatz gemischt und 1 h bei der optimalen Spalttemperatur des Enzyms inkubiert. Anschließend wurden die Spaltprodukte durch Agarosegelelektrophorese bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Eine Aufreinigung der Proben war für rein analytische Zwecke nicht notwendig. Für präparative Spaltungen wurden 5 µg-10 µg DNA mit 10-20 U des Restriktionsenzym und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem 30-60 µl großen Ansatz gemischt und 1-2 h bei der optimalen Spalttemperatur des Enzyms inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (250) nach Anleitung des Herstellers Qiagen gereinigt. Die Analyse der Spaltprodukte wurde mit Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit dem Enzym T4-DNA-Ligase durchgeführt. Im Ligationsansatz befanden sich 50-100 ng Vektor und ein Überschuss an Insert. Die Ligation erfolgte 2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Ligations-Produkte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (250) nach Anleitung des Herstellers Qiagen gereinigt und konnten dann für Transformationen eingesetzt werden.

2.3.5 PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich, DNA zu replizieren, wobei die Replikation von eingesetztem *template* und Primern abhängt⁵⁹. Das DNA-*template* wird dabei in sukzessiven Zyklen von Denaturierung, Primerhybridisierung bzw. *primer annealing* und Polymerisation exponentiell amplifiziert.

In dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um DNA für präparative Zwecke zu amplifizieren und um positive Klone nach einer Klonierung zu finden (*screening*). Als Primer dienten Oligonukleotide, die über RP-Kartuschen gereinigt, von der Firma Biomers bezogen wurden.

2.3.5.1 PCR-Standardbedingungen

PCR-Standard-Ansatz

Zur Amplifikation von zu klonierenden DNA-Fragmenten und zum *Screenen* von positiven Klonen wurde im Wesentlichen PCR-Ansätze folgender Art bereitet:

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

0.1 Vol. Polymerase 10 x Puffer (1.5 mM MgCl₂)

200 µM eines jeden dNTPs

0.3 µM 5' Primer

0.3 µM 3' Primer

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

30 - 50 µl Endvolumen

PCR-Temperaturzyklusprofile

Die Polymerasekettenreaktion wurde bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1. Einmalige Denaturierung (95 °C, 2-3 min)
2. Zyklische Wiederholungen von Denaturierung (95 °C, 30 sec), Primerhybridisierung (50 °C-56 °C, 1 min) und Primerextension (68 °C/72 °C, 1-2 min)

Die Primerhybridisierungstemperatur hängt vom eingesetzten Primer-Paar ab. Sie wird nach dem GC- bzw. AT-Gehalt der Primersequenzen ermittelt⁶⁰.

Dabei gilt:

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

Bei der Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase wurde eine Primerextensionstemperatur von 68 °C eingestellt, bei der *Taq*-DNA-Polymerase eine Temperatur von 72 °C.

3. Einmalige Primerextension (68 °C/72 °C, 5 min)
4. Abkühlung auf 4 °C.

2.3.5.2 Mutagenese-PCR

Mutagenese ist eine Möglichkeit, die Sequenz der Nukleotide der DNA zu verändern. Die gezielte Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) erlaubt es, an spezifischen Stellen auf dem DNA-Strang Mutationen zu erzeugen. Meist wird dafür die gewünschte Mutation in die Primer integriert, die für die PCR verwendet werden. Bei der gezielten bzw.

stellenspezifischen Mutagenese ist mindestens einer der Primer nicht 100% identisch mit der DNA, an die er sich anlagert. Während der Amplifikation wird so eine Mutation in das synthetisierte DNA-Fragment eingeführt.

In dieser Arbeit wurde die Mutagenese-PCR durchgeführt, um eine Punktmutation in das Plasmid pGEX2T-mCAD einzuführen. Es wurden im Bereich der *chaperone target region* (CTR) insgesamt sechs Codons verändert und somit sechs neue Varianten des Plasmides hergestellt, die in der folgenden Liste aufgeführt sind.

Tabelle 2.9: Liste der generierten CAD-Varianten

Plasmid	Austausch
pGEX2TmCAD	E284A
pGEX2TmCAD	V285A
pGEX2TmCAD	N286D
pGEX2TmCAD	I322T
pGEX2TmCAD	Y323A
pGEX2TmCAD	R324A

Die Durchführung erfolgte mit zwei aufeinanderfolgenden PCRs. Die erste PCR diente der Einführung der Mutation und wurde nach Standardbedingungen durchgeführt. Hierbei enthielt einer der beiden Primer die einzubauende Punktmutation/das ausgetauschte Nukleotid und als *template* wurde pGEX2T-mCAD verwendet. Zudem wurde jeweils eine Markerschnittstelle eingebaut, um das Gelingen der PCR zu überprüfen. Es entstanden 150 bis 250 bp-große PCR-Produkte, die nach einer Reinigung als Megaprimer für die zweite PCR dienen. In dieser PCR wurde erneut das gleiche *template* benutzt. Nachdem die PCR-Produkte gereinigt wurden, folgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym DpnI, um das Original-*template* zu zerstören. DpnI spaltet methylierte DNA, wodurch sichergestellt wird, dass nur noch mit dem neu-amplifizierten Plasmid weitergearbeitet wird.

2.4 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

2.4.1 Expressionssysteme

In dieser Arbeit wurde CAD (Wildtyp und Varianten) als N-terminales Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST; in diesem Fall GST-mCAD) mit DFF45 als Komplex in BL21Gold(DE3)-Zellen koexprimiert, die mit den Expressionsvektoren pACET-DFF45 und pGEX-2T-mCAD transformiert waren.

Aufgrund der Eigenschaften des Expressionssystems (Genotyp der Wirtszelle, Promotor, Kontrollelemente etc.) wurde eine Überexpression der gewünschten Proteine in *E. coli* erreicht.

2.4.2 Expression der Proteine im präparativen Maßstab

Zur Expression löslicher Proteine im präparativen Maßstab wurden jeweils vier 500 ml-Flüssigkulturen (LB-Vollmedium, s. 2.2.1) des gewünschten *E. coli*-Stammes (s. 2.2.2) bis zu einer Zelldichte von $0.5 \text{ OD}^{600 \text{ nm}}$ angezogen und danach durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation: $2500 \times g$, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), gewaschen (Resuspendieren in STE) und erneut zentrifugiert.

STE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 8.0

Danach erfolgte ein Ultraschallaufschluss ($10 \times 20 \text{ sec}$, *duty cycle* 50 %, *output level* 5) der Zellen in einem für die weitere Verarbeitung geeignetem Puffer.

Aufschlusspuffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Triton

Nach dem Zellaufschluss folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, um die löslichen und unlöslichen Komponenten dieser Suspension zu fraktionieren ($31\,400 \times g$, 1 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Der lösliche DFF-Komplex wurde zur weiteren Verarbeitung über Affinitätschromatographie (s. 2.4.3.1) gereinigt.

2.4.3 Reinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

2.4.3.1 Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie

Alle Proteine wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine überexprimiert, wodurch eine affinitätschromatographische Reinigung der Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose möglich war. Diese Affinitätsmatrix wurde säulenchromatographisch und im *batch*-Verfahren eingesetzt.

Zur Reinigung der Proteine wurde nach dem Pelletieren der Zellfragmente (s. 2.4.2) der Überstand zu 1 ml Glutathion-Sepharose (äquilibriert in GST-Waschpuffer) gegeben und unter Schütteln bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ an die Matrix gebunden. Danach wurde drei Mal mit GST-Waschpuffer gewaschen.

GST-Waschpuffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM/0.75 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT,
10 % Glycerin, 0.01 % Triton

Die Elution erfolgte mit einem Puffer, der zusätzlich 20 mM reduziertes Glutathion enthielt.
Anschließend wurde gegen DFF-Dialysepuffer dialysiert.

DFF-Dialysepuffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.01 % Chaps

2.4.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Da die meisten biochemischen Experimente nur mit einer sehr reinen, hoch konzentrierten DFF-Komplexpräparation durchzuführen sind, wurde nach der affinitätschromatographischen Reinigung des Komplexes eine Anionenaustauschchromatographie mit einer Mono-Q-Säule durchgeführt. Dadurch konnten Proteinverunreinigungen wie auch komplexgebundene *E. coli*-DNA beseitigt werden. Diese Entfernung der Kontaminationen erfolgte mit einer MonoQ HR5/5- oder HR10/10-Säule, bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Salzgradienten von 100-400 mM NaCl.

MonoQ-Puffer: 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA,
100/400 mM NaCl

Nachdem die Eluate in 1 ml-Fractionen gesammelt worden waren, wurden sie durch SDS-PAGE überprüft (s. 2.3.1.3). Zur Stabilisierung der Proteine wurde gegen Dialysepuffer dialysiert und die Fractionen anschließend mit Centricon YM50-Ultrafiltrationseinheiten konzentriert.

2.5 Expression und Reinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zelllinien

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei eukaryotische Zelllinien eingesetzt:

1. HEK293T

Dabei handelt es sich um *human embryonic kidney cells*, die das große T-Antigen des SV40-Virus überexprimieren. Sie wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um verschiedene Varianten von DFF45 bzw. ICAD-L mit verschiedenen Varianten von CAD zu exprimieren. Die Proteine wurden, je nach Versuch, gereinigt oder mit dem gesamten Zellextrakt auf ein SDS-Gel

geladen, um das Expressionsniveau durch Western Blot-Untersuchungen überprüfen zu können.

2. CHO

Diese Epithelzellen stammen aus den Ovarien chinesischer Hamster. Sie wurden in dieser Arbeit verwendet, um EGFP-CAD bzw. EGFP-DFF45 in Kombination mit DD-DFF45 bzw. DD-CAD zu exprimieren und den proteasomalen Abbau von EGFP-DFF45 *in-vivo* am Fluoreszenzmikroskop zu beobachten.

Beide Zelllinien wachsen adhärent als Monolayer in beschichteten Gewebekulturschalen, wobei HEK293T-Zellen in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) und CHO-Zellen in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-Medium, jeweils versetzt mit 10 % FCS (Fötale Kälber Serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Gemisch wachsen. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂.

Um Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern, war es beim Arbeiten mit eukaryotischen Zellen besonders wichtig mit großer Sorgfalt und unter sterilen Bedingungen zu arbeiten. Das bedeutet, dass alle Gebrauchsgegenstände, Puffer und Nährmedien vor dem Einsatz autoklaviert werden mussten. Sowohl die Hände, als auch Medien- und Pufferflaschen wurden mit 70 %igem EtOH vor dem Einsatz unter der Sterilbank desinfiziert.

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden sie alle 2-3 Tage verdünnt und umgesetzt. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebeschale wurde durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA erreicht. Anschließend wurden die Zellen in neuem Medium aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Das Volumen der Trypsin/EDTA-, Medium- und Zellsuspension soll 20 ml betragen. Die Zellen wurden, je nach Dichte, im Verhältnis von 1:3 - 1:15 auf neue Schalen mit vorgelegtem, frischem Medium verteilt.

2.5.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die zur Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzte DNA stammte aus Midi-Präparationen und besaß einen großen scDNA-Anteil, um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen. Die Zellen wurden am Tag zuvor so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Dichte von 50 % besaßen. In dieser Arbeit wurden Transfektionen in Schalen mit 14,5 cm und 9,4 cm Durchmesser durchgeführt.

2.5.2.1 Transfektion mit TransFast™ Transfection Reagent

Um HEK293T-Zellen mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurde das Transfektionsreagenz TransFast™ der Firma Promega verwendet. Bei dieser Methode wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und TransFast™ im dreifachen Überschuss im Verhältnis zur DNA zugegeben.

2.5.3 Ernte und Aufschluss eukaryotischer Zellen

24 h nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 800 µl CellLytic™ M Cell Lysis Reagent von Sigma. Da die Zellen am Boden haften, wurden sie mit Hilfe eines Silikonschabers geerntet und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die Suspension für 1 h bei 4 °C inkubiert und bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde über jeweilige *beads* gereinigt (s. 2.5.4).

Die gereinigten Proteine wurden mit SDS-PAGE (s. 2.3.1.3) aufgetrennt und anschließend durch einen Western Blot (s. 2.3.1.4) auf Expressionsniveau und Molekulargewicht überprüft.

2.5.4 Expression und Reinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Nachdem die Zellen geerntet und aufgeschlossen wurden (s. 2.5.3), erfolgte die Reinigung der Proteine. Da zuvor die Proteine mit einem *tag* versehen wurden (FLAG-*tag*, HA-*tag*), konnten diese somit über dementsprechende *beads* (FLAG-*beads*, HA-*beads*) gereinigt werden. Die im Überstand befindlichen Proteine konnten an die *beads* binden und somit von den restlichen Proteinen im Überstand gereinigt werden. Im Fall der hier verwendeten Reinigung der Proteine geht die weitere Durchführung über in den Ko-immunopräzipitationsversuch (s. 2.6.4).

2.6 Charakterisierung von Proteinen

Um das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen, wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie® Brilliant Blue Färbung (s. 2.3.1.3) durchgeführt.

2.6.1 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

2.6.1.1 Rekombinante Proteine aus *E. coli*

Die Konzentration von proteinhaltigen Lösungen wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Aufnahme eines Spektrums im Wellenlängenbereich zwischen 320 nm und 220 nm bestimmt. Dabei wurden die molaren Extinktionskoeffizienten mit Hilfe des Algorithmus

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

berechnet⁶¹.

2.6.1.2 Rekombinante Proteine aus eukaryotischen Zellen (Bradford-Assay)

Da die Menge rekombinanter Proteine aus eukaryotischen Zellen relativ gering war, wurde in diesem Fall der Bradford-Assay verwendet⁶², um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Der Bradford-Assay beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Protein in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximum von 456 nm zu 595 nm.

Zunächst wurde mit BSA (*bovine serum albumin*) eine Standardkurve aufgenommen mit deren Hilfe dann die zu untersuchenden Proteine verglichen werden konnten. Die Proteine wurden in jeweiliger Verdünnung eingesetzt, wobei 1 µl der Proteinverdünnung mit 49 µl des Bradford-Puffers vermischt wurde.

Bradford-Puffer: 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl

Danach wurden 50 µl des Bradford-Reagenzes hinzupipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Schließlich konnte gegen einen Referenz-Wert die Konzentrationen der Proteine mit Hilfe der photometrischen Absorption bei 595 nm gemessen werden.

2.6.2 Nuklease-Aktivitätsassay

Die enzymatische Aktivität von DFF40 (CAD) sowie den Varianten des Enzyms wurde durch Spaltung von sc-Plasmid-DNA nachgewiesen. Ein affinitätschromatographisch (s. 2.4.3.1) oder zusätzlich HPLC (s. 2.4.3.2) gereinigter DFF-Komplex wurde mit Caspase-3 Δ1-18 aktiviert. Dabei wurde DFF45 an den Positionen Asp117 und Asp224 gespalten. In einem

Volumen von 10 μ l wurde 25 ng/ μ l Plasmid-DNA mit Enzym-Konzentrationen von 0.25 nM-5 μ M und 5 mM MgCl₂ für 30 min bei 37 °C in Spalt-Puffer inkubiert.

Spalt-Puffer: 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01 % Chaps, 10 % Glycerin

Danach wurden die Ansätze gelelektrophoretisch mit 0.8 %igen TBE-Agarosegelen (s. 2.3.1.1) auf Plasmidspaltung untersucht.

2.6.3 DNA-Bindungsassay

Das DNA-Bindungsverhalten von DFF-Varianten wurde mit Hilfe eines DNA-Bindungsassays bzw. *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) untersucht.

Hierfür wurde in 10 μ l Ansätzen Plasmid-DNA (s. 2.2.3) mit DFF für 20 min bei RT in Shift-Puffer inkubiert, wobei die Plasmid-DNA in einer Konzentration von 25 ng/ μ l eingesetzt wurde.

Shift-Puffer: 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01 % CHAPS, 10 % Glycerin

Anschließend wurden die Ansätze mit 5xAAP ohne SDS versetzt und auf 0.8 %igen TBE-Agarosegelen untersucht (s. 2.3.1.1).

2.6.4 Koimmunoprecipitationsversuche

In dieser Arbeit wurden Koimmunoprecipitationsversuche durchgeführt um zu untersuchen, ob eine Dimerisierung von bestimmten CAD-Varianten bzw. ICAD-L-Varianten stattfand. Dafür wurden mehrere Ansätze mit verschiedenen fusionierten Varianten durchgeführt, die aus der folgenden Tabelle zu entnehmen sind.

Tabelle 2.10: Liste der Ko-IP Versuchsansätze

Ansatz	Plasmide	IP	Antikörper
1	pCI-CAD-FLAG, pCI-cmyc-DFF45	FLAG	α -FLAG, α -DFF45
2	pCI-CAD-HA, pCI-cmyc-DFF45	HA	α -HA, α -DFF45
3	pCI-CAD-FLAG, pCI-CAD-HA, pCI-cmyc-DFF45	FLAG, HA	α -FLAG, α -HA, α -DFF45
4	pCI-CAD-FLAG, pCI-CAD-cmyc, pCI-ICAD-L-HA (in einer bzw. zwei Schalen)	HA	α -FLAG, α -HA
5	pCI-CAD-cmyc, pCI-ICAD-L-HA, pCI-ICAD-L-FLAG (in einer bzw. zwei Schalen)	cmyc	α -FLAG, α -HA
6	pCI-ICAD-L-HA, pCI-ICAD-L-FLAG (in einer bzw. zwei Schalen)	FLAG	α -FLAG, α -HA

Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit diesen verschiedenen fusionierten CAD-Varianten bzw. ICAD-L-Varianten transfiziert und wie oben beschrieben, geerntet und aufgeschlossen (s. 2.5.3). Nachdem die Zellen pelletiert wurden und sich somit die Proteine im Überstand befanden, wurden diese an die jeweiligen *beads* (s. Tabelle 2.10), die zuvor äquilibriert wurden, 2 h bei 4 °C gebunden. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und mit CelLytic™ M Cell Lysis Reagent gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden entweder die *beads* mit gebundenen Proteinen auf ein SDS-Gel geladen, oder es wurde mit entsprechenden Peptiden (FLAG-/HA-Peptiden) eluiert, und demzufolge die eluierten Proteine geladen. Die weitere Auswertung erfolgte durch einen Western Blot (s. 2.3.1.4), wobei die verwendeten Antikörper ebenfalls der Tabelle 2.10 zu entnehmen sind.

2.6.5 Forcierte Heterodimerisierung

Um Heterodimere von CAD (Wildtyp und Varianten) reinigen zu können, wurde zu Beginn deren Heterodimerisierung forciert. Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit drei verschiedenen fusionierten CAD-wt-Konstrukte (s. 2.5.1) transfiziert, um die Expression und anschließend deren Reinigung über die jeweiligen *tags* untersuchen zu können. In der folgenden Tabelle sind diese CAD-wt-Konstrukte aufgeführt.

Tabelle 2.11: Liste der eingesetzten CAD-Konstrukte für Expression und Reinigung

Ansatz	Plasmide	IP	Antikörper
1	pC ₄ -EN-F1-CAD-wt-HA-FLAG, pCI, pCI-cmyc-DFF45	FLAG	α-HA
2	pC ₄ -R _H E-CAD-wt-HA, pCI, pCI-cmyc-DFF45	HA	α-HA
3	pC ₄ -EN-F1-CAD-wt-HA-Strep, pCI, pCI-cmyc-DFF45	Strep	α-HA

Anschließend wurden Heterodimerisierungsansätze mit den jeweiligen CAD-Varianten durchgeführt, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 2.12: Liste der Heterodimerisierung-Versuchsansätze

Ansatz	Plasmide	IP	Antikörper
1	pC ₄ -EN-F1-CAD-wt-FLAG, pC ₄ -R _H E-CAD-wt-HA, pCI-cmyc-DFF45	FLAG	α-HA
2	pC ₄ -EN-F1-CAD-R168A-FLAG, pC ₄ -R _H E-CAD-wt-HA, pCI-cmyc-DFF45	FLAG	α-HA
3	pC ₄ -EN-F1-CAD-R168A/H263A-FLAG, pC ₄ -R _H E-CAD-wt-HA, pCI-cmyc-DFF45	FLAG	α-HA
4	pC ₄ -EN-F1-CAD-wt-FLAG, pC ₄ -R _H E-CAD-H263-HA, pCI-cmyc-DFF45	FLAG	α-HA

Die Transfektion in HEK293T-Zellen wurde wie oben beschrieben (s. 2.5.2.1) durchgeführt, wobei noch das Rapamycin-Analog AP21967 hinzugefügt wurde, welches die jeweiligen Proteine zur Dimerisierung zwingt. Nachdem die Proteine ü.N. exprimiert wurden, erfolgte die Ernte und der Zellaufschluss ebenfalls wie oben beschrieben (s. 2.5.3). Bevor die Proteine nun über FLAG-*beads* aufgereinigt wurden, wurde von jedem Ansatz Zellextrakt entnommen, um auf Expression zu überprüfen. Sowohl der Zellextrakt als auch die gereinigten Proteine wurden elektrophoretisch getrennt (s. 2.3.1.3) und schließlich über einen Western Blot analysiert (s. 2.3.1.4). Die Detektion erfolgt über einen α -HA-Antikörper.

2.6.6 Proteasomaler Abbau

Um den proteasomalen Abbau des DFF-Komplexes zu untersuchen, wurden zuvor neue CAD- und DFF45-Varianten generiert. HEK293T-Zellen wurden daraufhin mit den Plasmiden pPT-DD-CAD-HA/pCI-DFF45-HA und pCI-CAD-HA/pPT-DD-DFF45-HA kotransfiziert, wobei der membran-permeable stabilisierende Ligand *Shield1* dem DMEM-Medium in geringer Konzentration (500 nM) hinzugefügt wurde. Nachdem die Proteine ü.N. exprimiert wurden, erfolgte am darauffolgenden Tag ein Mediumwechsel. Den jeweiligen Ansätzen wurde dabei das *Shield1*-enthaltende Medium abgesaugt, vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen und erneut Medium (ohne *Shield1*) zugegeben. Die Platten wurden dann für die restliche Zeit wieder in den Wärmeschrank bei 37 °C gestellt. Den Ansätzen wurden somit nach 240 min, 120 min, 60 min und 30 min der stabilisierende Ligand *Shield1* entzogen. Die Ernte und der Aufschluss der Zellen erfolgten wie in 2.5.3 beschrieben. Mit dem erhaltenen Zellextrakt wurde anschließend ein Bradford-Assay durchgeführt (s. 2.6.1.2) und die Proteine letztendlich über einen Western Blot analysiert (s. 2.3.1.4). Die Detektion fand mit dem α -HA-Antikörper statt.

2.6.6.1 Mikroskopische Analyse des proteasomalen Abbaus von DD-CAD/DFF45 koexprimiert mit EGFP-DFF45/CAD in CHO-Zellen

Die Untersuchung des proteasomalen Abbaus von DD-DFF wurde mit Hilfe eines Zeiss (*Germany*) Axiophot Fluoreszenzmikroskops durchgeführt, welches vom Institut für Genetik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt wurde. Das Mikroskop verfügte über eine Kamera, mit welcher Ausschnittbilder der Zellen zur Dokumentation des Experiments gemacht wurden.

EGFP-Fusionsproteine, EGFP-CAD und EGFP-DFF45, wurden jeweils mit DD-DFF45 bzw. DD-CAD in CHO-Zellen in An- und Abwesenheit von *Shield1* exprimiert. Aufgrund der Abwesenheit von *Shield1* war kein stabilisierender Ligand enthalten, wodurch proteasomaler Abbau des Proteins stattfinden konnte, der 24 h nach der Transfektion untersucht wurde.

2.6.6.2 Zellkern-Färbung transfizierter Zellen

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

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung einer möglichen *chaperone target region* (CTR) von CAD

Da bisher wenig sowohl über die Chaperonfunktion von ICAD-L (DFF45) als auch über die Zielregion in CAD, die einer Hilfe bei der Faltung benötigt, bekannt war, sollte das Phänomen der Abhängigkeit der korrekten Faltung der Caspase-aktivierten DNase von der Anwesenheit des Faltungshelfers und Inhibitors ICAD-L (DFF45) näher untersucht werden. Betrachtet man die Struktur der Caspase-aktivierten DNase so fällt auf, dass wichtige Reste des aktiven Zentrums in einem ausgedehnten *loop* am C-Terminus liegen, der nur eine sehr kleine Kontaktfläche mit dem Restprotein aufweist. Dieser intramolekularen Interaktion kommt eine wichtige Rolle zu, da sie in einer strukturell bedeutsamen Region liegt, deren korrekte Faltung die strukturelle Integrität des gesamten aktiven Zentrums bestimmt. Im weiteren Verlauf enthält sie ein Kernlokalisierungssignal (NLS), welches mit dem aus dem Inhibitor integriert, ein zusammengesetztes NLS bildet⁶³. Die korrekte räumliche Anordnung der für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste hängt stark von der korrekten Positionierung dieses *loops* ab. Abweichungen davon würden bewirken, dass die Nuklease in inaktiver Form vorliegt. Eine Hypothese zur Wirkungsweise der Faltungshelferaktivität von ICAD-L stützt sich auf die Vorhersage einer intrinsisch ungefalteten Region genau innerhalb dieses *loops* am C-Terminus der Nuklease (s. 1.2.1). Es wäre vorstellbar, dass diese Region der Hilfe durch ICAD-L (DFF45) zur korrekten Ausbildung ihrer Struktur und damit einer äußerst wichtigen intramolekularen Interaktion in CAD bedarf. Ein Ziel dieser Arbeit war es deswegen, diese intrinsisch ungefaltete Region genauer zu untersuchen und so ihren Einfluß auf die Aktivität der Nuklease sowie deren Interaktion mit dem Inhibitor und Chaperon ICAD-L (DFF45) zu beleuchten.

3.1.1. Vorhersage einer intrinsisch ungefalteten Region in CAD (DFF40)

Um die potentiell intrinsisch ungefaltete(n) Region(en) (IUR) in CAD ausfindig zu machen, wurde die Aminosäuresequenz von CAD in verschiedene web-basierte Software-Programme, sogenannte Prädiktoren (*predictors*), eingespeist. Diese Prädiktoren basieren auf der Annahme, dass das Fehlen einer regulären Struktur in spezifischen Merkmalen der Aminosäuresequenz kodiert wird, und können auf dieser Basis intrinsisch unstrukturierte Regionen innerhalb eines Proteins vorhersagen⁶⁴.

Die Ergebnisse der vier Prädiktoren VLXT, VL3, IUPred und RONN ergaben, dass ab einem bestimmten Aminosäurerest (Thr312) die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer intrinsisch

ungefalteten Region über 0.5 steigt, so dass anzunehmen ist, dass die folgenden Aminosäurereste wahrscheinlich eine solche unstrukturierte Region bilden (s. Abb. 3.1).

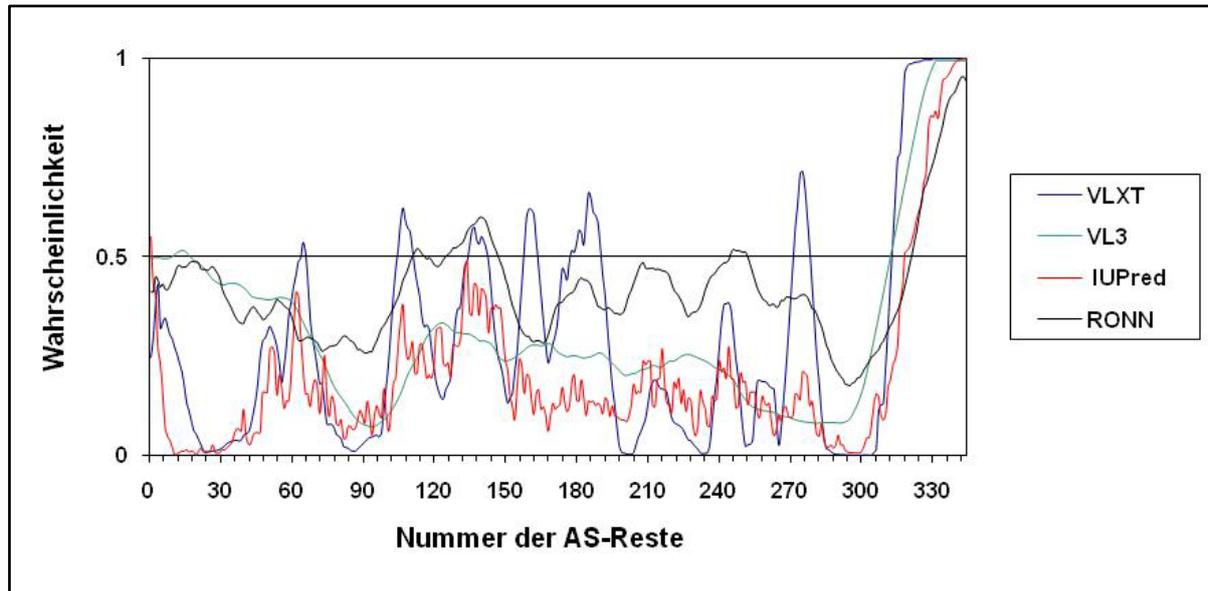


Abb. 3.1: Potentiell intrinsisch ungefaltete Region am C-Terminus von CAD. Gezeigt ist ein Diagramm, in dem die Wahrscheinlichkeit einer intrinsisch unstrukturierten Region von CAD am Ende des C-Terminus vorhergesagt wird. Nach dem AS-Rest Thr312 steigt die Wahrscheinlichkeit bei allen vier verwendeten Prädiktoren (VLXT, VL3, IUPred, RONN) über 0.5, was bedeutet, dass die folgenden AS sehr wahrscheinlich unstrukturiert vorliegen.

Mit Hilfe des oben gezeigten Diagramms wurde eine potentielle IUR identifiziert, die am C-Terminus von CAD zu finden ist und 13 AS-Reste vor dem NLS beinhaltet (s. Abb. 3.2).

Diese IUR, die Teil eines langen *loops* ist, bindet über drei Aminosäurereste an einen kleinen *loop* zwischen α -Helix 7 und 8 der Nuklease, der zur katalytisch relevanten Region des Enzyms zählt. Diese Interaktion könnte somit sehr wichtig für die strukturelle Integrität des aktiven Zentrum der Nuklease sein und die entsprechende Region tatsächlich als *target-site* für die Faltungshelferaktivität von ICAD-L (DFF45) in Frage kommen.

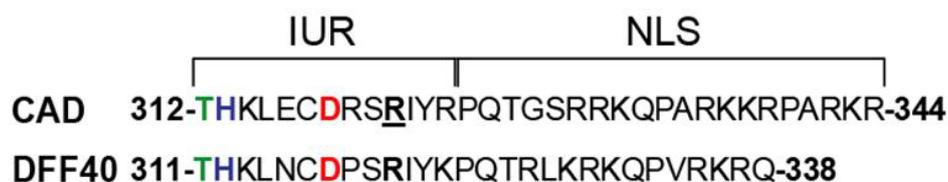


Abb. 3.2: C-Termini von CAD und DFF40. Gezeigt ist eine vermutlich intrinsisch unstrukturierte Region (IUR), die unmittelbar vor dem Kernlokalisierungssignal (NLS) liegt. Die unterschiedlich farbig markierten Buchstaben entsprechen den Aminosäuren, die die Region flankieren, die von den

jeweiligen Prädiktoren als intrinsisch unstrukturiert vorhergesagt wurden. Grün: VL3, blau: VLXT, rot: IUPred, schwarz/unterstrichen: RONN.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden einige Untersuchungen durchgeführt, die vermuten ließen, dass diese Region eine wichtige strukturelle Aufgabe hat. Dies führte zu der Hypothese, dass ICAD-L (DFF45) als Faltungshelfer wichtig für die Ausbildung der korrekten Struktur in dieser Region der Nuklease ist (Meiss, unveröffentlicht). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit CAD-Varianten generiert, die in genau dieser Region, im folgenden *chaperone target region* (CTR) genannt, einen Aminosäurerest-Austausch aufweisen.

3.1.2 Auswahl und Klonierung der CTR-Konstrukte

Da der *loop* der IUR eine Bindung mit dem *loop* zwischen der α -Helix 7 und 8 der Nuklease eingeht (s. Abb. 3.3), wurden Varianten von CAD generiert, die in beiden Regionen Aminosäurerest-Austausche aufweisen.

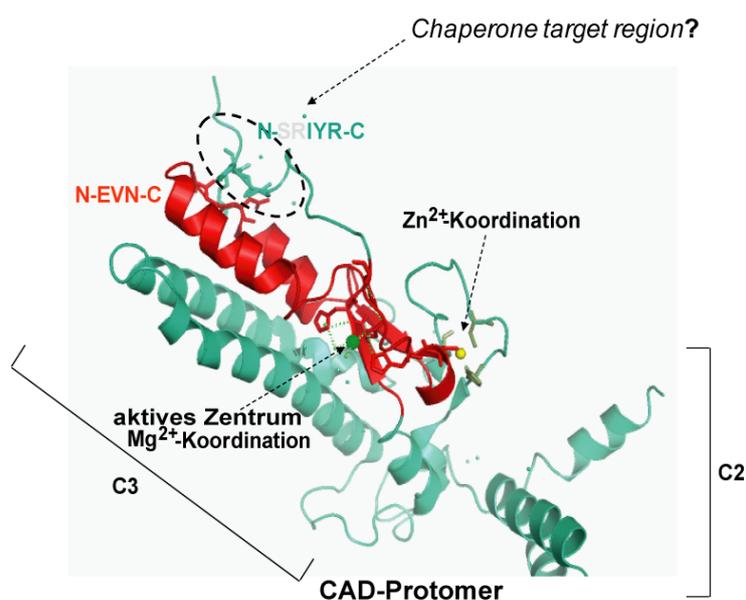


Abb. 3.3: Bindung des *loops* zwischen α -Helix 7 und 8 mit dem *loop* der IUR innerhalb eines CAD-Protomers. Gezeigt ist ein Modell eines CAD-Protomers bestehend aus der C2- und C3-Domäne. Neben dem aktiven Zentrum und den für die Katalyse wichtigen Strukturen (in rot dargestellt) kann man erkennen, dass die beiden *loops* eine Bindung eingehen, in die folgende AS integriert sind. Im *loop* zwischen α -Helix 7 und 8 ²⁸⁴EVN²⁸⁶ und im *loop* der vorhergesagten intrinsisch unstrukturierten Region die AS ³²²IYR³²⁴.

Die neu generierten CAD-Varianten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.1: Liste der generierten Varianten von CAD

<i>loop</i> zwischen α -Helix 7 und 8			<i>loop</i> (IUR)		
Aminosäure	Position	Mutation	Aminosäure	Position	Mutation
Glutaminsäure	284	Alanin	Isoleucin	322	Threonin
Valin	285	Alanin	Tyrosin	323	Alanin
Asparagin	286	Asparaginsäure	Arginin	324	Alanin

Diese mittels Mutagenese-PCR (s. 2.3.5.2) generierten CAD-Varianten, die zur affinitätschromatographischen Reinigung einen N-terminalen GST-tag enthalten, wurden anschließend in *E. coli* exprimiert.

3.1.3 Expression der CTR-Varianten in *E. coli*

Nachdem die verschiedenen Varianten von CAD erfolgreich kloniert wurden, erfolgte deren Expression in *E. coli* (s. 2.4.2). Hierfür wurden BL21Gold(DE3)-Zellen, die bereits das Chaperon DFF45 enthielten, mit den jeweiligen Plasmiden transformiert (s. 2.2.5.1), wodurch der DFF-Komplex koexprimiert werden konnte.

Die Genexpression wurde induziert, wobei vor und nach der Induktion mit IPTG jeweils eine Probe entnommen wurde, die auf ein SDS-Gel (s. 2.3.1.3) aufgetragen wurde. DFF wurde ü.N. exprimiert, die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen und anschließend die Proteine gereinigt.

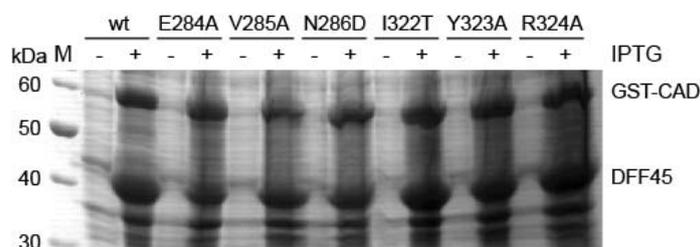


Abb. 3.4: Expression von DFF-Komplexen. Gezeigt ist ein *Coomassie Brilliant Blue*[®] gefärbtes SDS-Gel, auf dem jeweils die Proben des Wildtyps (wt) als auch der einzelnen CAD-Varianten vor und nach der Induktion aufgetragen wurden. Man erkennt deutlich die beiden Banden der Untereinheiten des DFF-Komplexes, von GST-CAD bei ca. 60 kDa und von DFF45 bei ca. 42 kDa.

Nach Induktion der Genexpression sind zwei deutliche Banden bei ca. 42 kDa und bei 60 kDa zu erkennen (Abb. 3.4). Die Bande bei 42 kDa entspricht dem Chaperon DFF45. Da die Nuklease CAD (40 kDa) mit einem GST-tag (27 kDa) versehen ist und demzufolge GST-CAD eine Größe von etwa 67 kDa besitzt, entspricht somit die Bande bei ca. 60 kDa dem Fusionsprotein. Die Bandenintensitäten von GST-CAD und DFF45 sind ungefähr gleich stark, d.h. beide Proteine wurden im gleichen Maße exprimiert.

Nach ge Glückter Koexpression der DFF-Untereinheiten erfolgte die Reinigung über den N-terminalen GST-*tag*.

3.1.4 Reinigung der CTR-Varianten

Zunächst erfolgte die Reinigung der Proteine, aufgrund ihres GST-*tags*, mit Hilfe einer affinitätschromatographischen Methode.

3.1.4.1 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie (s. 2.4.3.1) bindet das zu reinigende Protein, in diesem Fall über einen GST-*tag*, an eine Affinitätsmatrix, die hier aus Glutathion-Sepharose besteht. Es sollten nur die Proteine an die Matrix binden, die eine hohe Affinität aufweisen, d.h. die einen GST-*tag* tragen. Allerdings kann es auch dazu kommen, dass andere Proteine unspezifisch an die Matrix binden und somit ebenfalls gereinigt werden.

Um eine höhere Proteinausbeute zu erhalten, wurden die Proteine nach zweistündiger Bindung an den *beads* gewaschen und eluiert. Anschließend wurde der Überstand erneut auf *beads* gegeben, um die noch im Überstand befindlichen ungebundenen DFF-Komplexe ü. N. an die *beads* binden zu lassen. Die Reinigung wurde kontrolliert, indem jeweils drei Eluate mittels SDS-PAGE (s. 2.3.1.3) analysiert wurden.

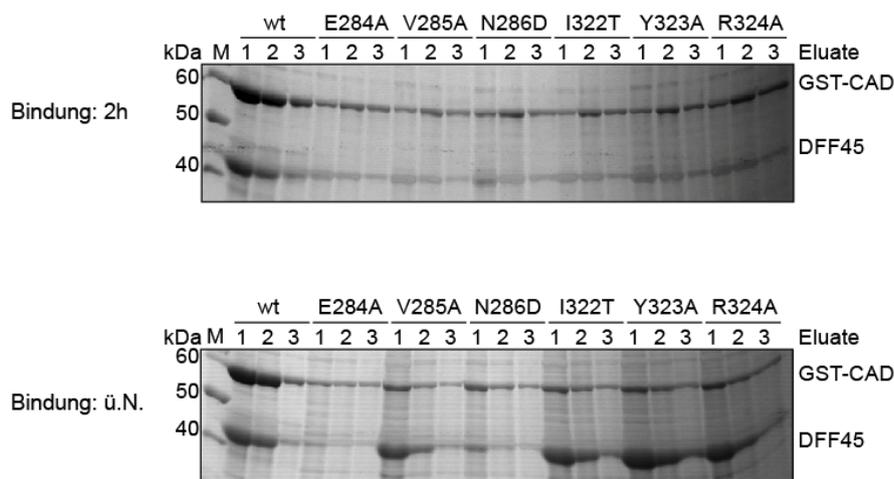


Abb. 3.5: Reinigung des DFF-Komplexes über Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie. Gezeigt sind *Coomassie Brilliant Blue*[®] gefärbte SDS-Gele, die eine unterschiedliche Menge an gebundenem Protein des Wildtyps (wt) und der einzelnen CAD-Varianten zeigen. Oben: 2 h Bindungszeit. Unten: Bindung über Nacht.

Obwohl nahezu gleiche Mengen CAD und DFF45 exprimiert wurden, konnten nach der Reinigung über Glutathion-Sepharose mit Ausnahme des Wildtyps keine Komplexe mit annähernd ausgeglichenem Verhältnis von Chaperon und Nuklease gewonnen werden (s. Abb. 3.5). Es ist zu erkennen, dass die Über-Nacht-Bindung in dieser Hinsicht effektiver war (s. Abb. 3.5, unten) als eine nur zweistündige Bindung der Proteine an die Affinitätsmatrix (s. Abb. 3.5, oben), wobei für die weitere Durchführung die Eluate jeweils vereint wurden. Zudem war der affinitätsgereinigte DFF-Komplex nicht rein genug, d.h. die Eluate enthielten noch andere Proteine, die unspezifisch an die Matrix gebunden hatten. Deshalb erfolgte nach der Reinigung über Glutathion-Sepharose eine zweite Reinigung der Proteine, und zwar mit Hilfe einer Anionenaustauschchromatographie.

3.1.4.2 Anionenaustauschchromatographie

Die zuvor über GSH-Affinitätschromatographie gewonnenen DFF-Komplexe wurden anschließend über Anionenaustauschchromatographie (s. 2.4.3.2) mittels einer Mono-Q-Säule gereinigt, um Verunreinigungen durch unspezifisch gebundene Proteine oder komplexgebundene *E. coli*-DNA zu beseitigen.

Die in 1 ml-Fractionen aufgefangenen Eluate wurden auf SDS-Gele (s. 2.3.1.3) aufgetragen, um herauszufinden, in welcher Fraktion sich der gereinigte DFF-Komplex befand.

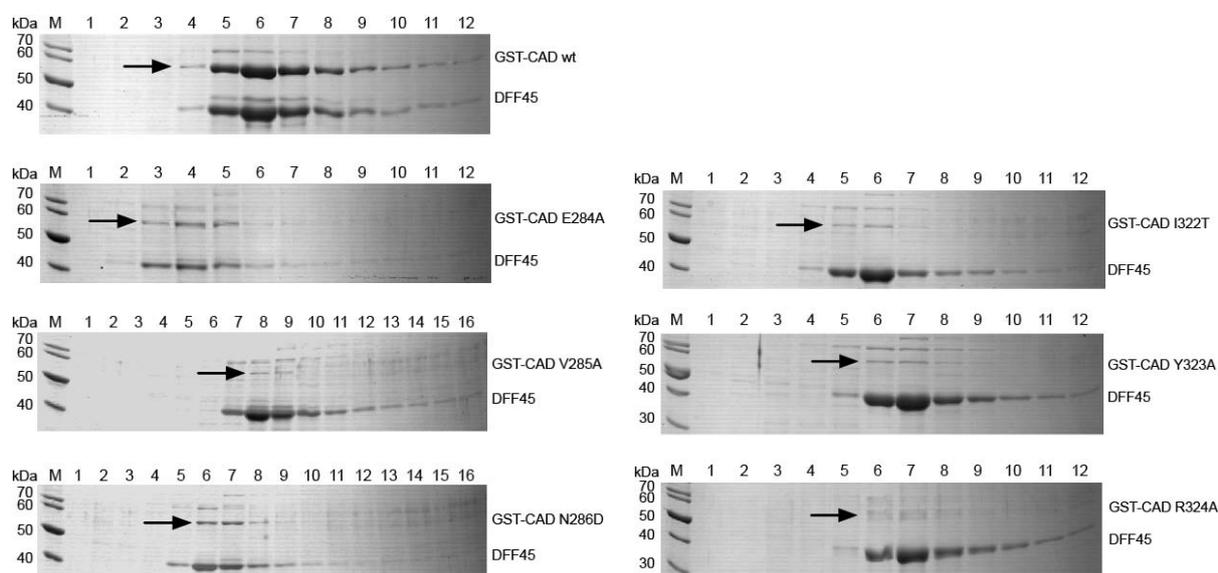


Abb. 3.6: Reinigung des DFF-Komplexes über Anionenaustauschchromatographie. Gezeigt sind Coomassie Brilliant Blue[®] gefärbte SDS-Gele, auf denen die Fraktionen der HPLC-Läufe des Wildtyps (wt) als auch der einzelnen Varianten aufgetragen sind. Zu erkennen ist, dass trotz wiederholter Reinigung die DFF-Komplex-Präparationen immer noch Verunreinigungen aufweisen und dass die Nuklease, mit Ausnahme des Wildtyps, in geringerer Menge erhalten wurde als das Chaperon. Der

Pfeil zeigt jeweils auf die schwer erkennbare Bande von CAD. Bei der Bande oberhalb von GST-CAD handelt es sich um das *E. coli* Chaperon DnaK.

Nach dem Lauf über die Mono-Q-Säule konnte im Fall von GST-CAD wt und GST-CAD E284A jeweils ein annähernd stöchiometrischer Komplex mit dem Chaperon DFF45 gereinigt werden (s. Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu konnte dies bei den anderen DFF-Komplexen nicht erzielt werden, da hier mehr Chaperon als Nuklease erhalten wurde.

Nachdem die Fraktionen, in denen sich der DFF-Komplex befand, ermittelt wurden, erfolgte ü.N. eine Umpufferung in Dialysepuffer, der u.a. auch 10% Glycerin enthielt. Somit konnten die DFF-Komplexe bei -20 °C gelagert werden bzw. waren für die darauffolgenden Untersuchungen einsetzbar.

Es konnten zwar alle DFF-Komplexe gereinigt werden, allerdings waren diese Komplexe sehr instabil, was durch die Reinigung der Proteine beobachtet werden konnte. Die Reinigung wird in erster Linie über das Chaperon DFF45 bewerkstelligt, da dieses mit seiner stark negativen Ladung an die positive Säulenmatrix bindet. Somit wird auch die im Komplex an DFF45 gebundene Nuklease CAD gereinigt. Wenn allerdings die Bindung innerhalb des Komplexes durch geschwächte Interaktion der beiden Proteine reduziert ist, kann CAD während des Waschschrattes von DFF45 gerissen werden. Dies resultiert in einem Missverhältnis an Nuklease und Inhibitor im Eluat.

3.1.5 Aktivierungsassay der DFF-Komplexe

Zunächst wurde untersucht, ob die neu generierten DFF-Komplexe, bestehend aus CAD-Wildtyp oder einer CAD-Variante und DFF45, aktivierbar waren. Dazu wurde der DFF-Komplex mit Caspase-3 für 30 min bei 37 °C inkubiert, wodurch der gebundene Inhibitor DFF45 gespalten werden sollte und dessen Spaltfragmente auf einem SDS-Gel (s. 2.3.1.3) zu sehen sein sollten.

Es konnte gezeigt werden, dass alle DFF-Komplexe durch Caspase-3 aktivierbar waren, da die entsprechenden Spaltprodukte detektiert werden konnten. Allerdings war die Konzentration der Nuklease sehr gering und konnte teilweise auf den Gelen nicht detektiert werden. Zudem erwiesen sich die Konzentrationen von CAD auf dem Gel als so unterschiedlich (s. Abb. 3.6), dass in einem weiteren Aktivierungsassay diese zuvor angeglichen wurden. Hierfür wurde durch densitometrische Auswertungen mit Hilfe des Programms TotalLab die Nuklease-Konzentration der CAD-Varianten an die des CAD-Wildtyps angeglichen. Allerdings konnten auch dieses Mal keine übereinstimmenden Nuklease-Konzentrationen der Komplexe erhalten werden, welches auf eine starke Instabilität der Komplexe hinweist.

Als nächster Schritt wurde ein Nuklease-Aktivitätsassay durchgeführt um zu untersuchen, wie sich der entsprechende Aminosäurerest-Austausch in CAD auf die Spaltaktivität auswirkt.

3.1.6 Nuklease-Aktivitätsassay

Um die Auswirkung der Veränderung in der Aminosäuresequenz von CAD auf die Spaltaktivität zu untersuchen, wurde ein Nuklease-Aktivitätsassay durchgeführt (s. 2.6.2). Hierbei wurde der DFF-Komplex zunächst 30 min bei 37 °C mit Caspase-3 und anschließend für 20 min bei RT mit Plasmid-DNA (pBluescript SK(+), s. 2.2.3) inkubiert. Damit die Spaltaktivität auf die aktivierte Nuklease zurückzuführen ist, wurde zusätzlich jeweils ein DFF-Komplex, der zuvor nicht aktiviert wurde, mit Plasmid DNA inkubiert. Analysiert wurde die Spaltreaktion mit Hilfe eines Agarosegels (s. 2.3.1.1).

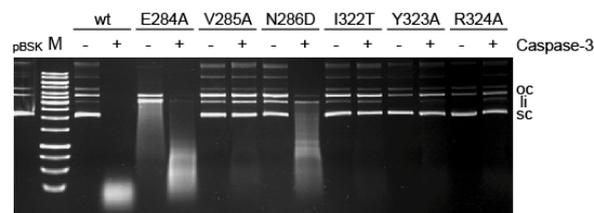


Abb. 3.7: Spaltverhalten von DFF-Komplexen. Gezeigt ist ein 0.8%iges, Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel. Eine effiziente Spaltung der DNA ist nur im Falle des Wildtyps (wt) zu erkennen, wobei die CAD-Varianten E284A und N286D ebenfalls eine DNA-Spaltung zeigen. Die übrigen CAD-Varianten zeigen eine stark reduzierte bis keine Spaltaktivität.

Im Gegensatz zum Wildtyp, der die Plasmid-DNA effizient spaltet, zeigten die CAD-Varianten E284A und N286D, die zusammen mit V285A im *loop* zwischen α -Helix 7 und 8 liegen, eine geringfügig reduzierte Spaltaktivität (s. Abb. 3.7). Bei der CAD-Variante V285A ist eine leichte Zunahme an linearer DNA zu erkennen, wohingegen die übrigen CAD-Varianten kaum bzw. keine Aktivität zeigten. Auffallend ist, dass der nicht-aktivierte Komplex CAD E284A/DFF45 enzymatische Aktivität aufweist.

Um nun noch die Bindungseigenschaft der einzelnen CAD-Varianten mit der des Wildtyps vergleichen zu können, wurde schließlich ein DNA-Bindungsassay durchgeführt.

3.1.7 DNA-Bindungsassay

Nachdem die Spalteigenschaft der CAD-Varianten untersucht worden war, erfolgte ein DNA-Bindungsassay (s. 2.6.3). Hierfür wurden die DFF-Komplexe mit Plasmid-DNA 20 min bei RT inkubiert und auf einem Agarosegel (s. 2.3.1.1) analysiert.

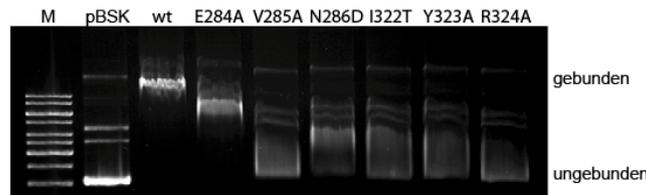


Abb. 3.8: DNA-Bindungsverhalten von DFF-Komplexen. Gezeigt ist ein 0.8%iges, Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel. Es ist zu erkennen, dass CAD wt die gesamte Plasmid-DNA bindet, die dadurch eine Mobilitätsänderung erfährt. Im Gegensatz dazu zeigt die CAD-Variante E284A zwar ebenfalls eine komplette, allerdings schon reduzierte DNA-Bindung. Die übrigen CAD-Varianten weisen nur noch unvollständige, schwache Bindung der DNA auf, wobei unter diesen die CAD-Variante N286D noch am besten bindet.

Man kann erkennen, dass der Wildtyp das beste Bindungsvermögen besitzt, gefolgt von den CAD-Varianten E284A und N286D (s. Abb. 3.8). Die übrigen CAD-Varianten zeigten kaum DNA-Bindung, was mit den Ergebnissen des Nuklease-Aktivitätsassays korreliert.

Betrachtet man die Stabilität der rekombinanten DFF-Komplexe (s. 3.1.3.2) zusammen mit der Nuklease-Aktivität (s. 3.1.6) und dem DNA-Bindungsverhalten (s. 3.1.7), stellt man fest, dass die Ergebnisse der einzelnen Versuche miteinander korrelieren. Die rekombinanten DFF-Komplexe, die neben dem Wildtyp am besten DNA binden können, wie CAD E284A/DFF45 und CAD N286D/DFF45, zeigen ebenso die beste DNA-Spaltaktivität. Zudem weisen diese beiden Varianten auch nach der Reinigung (s. 3.1.4) und der Nuklease-Konzentrationsangleichung die höchste effektive CAD-Konzentration auf, wohingegen die übrigen CAD-Varianten niedrige Stabilität und damit einhergehend auch schlechte DNA-Bindung und -Spaltung zeigen.

Um herauszufinden, ob die vorangegangenen Ergebnisse lediglich eine Folge unterschiedlich eingesetzter Nuklease-Konzentrationen waren, wurde zur Quantifizierung schließlich ein Western Blot durchgeführt.

3.1.8 Nachweis der Nuklease mittels Western Blot

Im Aktivierungsassay (s. 3.1.5) war es zwar möglich, das im Komplex mit CAD vorliegende Chaperon DFF45 zu spalten und somit dessen Ablösung vom DFF-Komplex zu erreichen. Allerdings war es bisher schwierig, die Nuklease auf einem SDS-Gel zu detektieren. Aufgrund der Nuklease-Aktivitäts- und DNA-Spaltassays wurde zwar das Vorhandensein der Nuklease bereits bestätigt, jedoch war nicht bekannt, ob die zuvor angegliche CAD-Konzentration (s. 3.1.5) auch wirklich gleich war. Deshalb wurde ein Western Blot durchgeführt, da diese Methode der Immunodetektion empfindlicher als eine Coomassie-

Färbung ist und sich daher gut eignet, um sehr geringe Proteinkonzentrationen zu detektieren (s. 2.3.1.4).

In diesem Fall wurden nominell angegliche Nuklease-Konzentrationen (2 μM) eines jeden DFF-Komplexes eingesetzt, die zuvor über Coomassie-gefärbte SDS-Gele quantifiziert wurden und nun mittels Western Blot analysiert werden sollten.

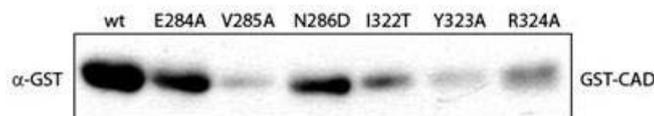


Abb. 3.9: Immunologischer Nachweis von GST-CAD. Dargestellt ist ein Western Blot, der die detektierten Banden von GST-CAD sowohl beim Wildtyp (wt) als auch bei den CAD-Varianten zeigt. Der hierfür verwendete Antikörper war α -GST.

Alle CAD-Varianten sowie die Wildtyp-Nuklease sind im Western Blot durch Immunodetektion nachweisbar (Abb. 3.9). Die stärkste Intensität zeigt die Bande von GST-CAD wt, das somit im Vergleich zu den Nuklease-Varianten in der höchsten Konzentration (2 μM) vorliegt. Die CAD-Varianten E284A und N286D zeigen eine etwas schwächere Bande, da diese beiden niedriger konzentriert sind als der Wildtyp. Eine schwache Bande für die GST-fusionierte Nuklease zeigen die Varianten V285A, I322T, Y323A und R324A, wobei die Bande von V285A und Y323A am schwächsten ist. Somit liegen diese vier Nukleasen nur in geringer Konzentration vor. Einer densitometrischen Auswertung zufolge wurden, ausgehend vom Wildtyp mit 2 μM , folgende Ergebnisse errechnet. Für die beiden CAD-Varianten E284A (1.2 μM) und N286D (1.1 μM) wie auch für die restlichen Varianten (V285A: 0.3 μM , I322T: 0.5 μM , Y323A: 0.4 μM und R324A: 0.6 μM) wurden deutlich geringere Nuklease-Konzentrationen gemessen. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Nuklease-Konzentrationen der Variante V285A als auch der drei Varianten im *loop* der IUR deutlich niedriger ausfallen, was an einer Instabilität des DFF-Komplexes liegen könnte.

Demzufolge konnte eine Angleichung der Konzentrationen trotz Berechnung nach densitometrischer Auswertung der Banden eines Coomassie gefärbten SDS-Geles nicht erreicht werden, wodurch die vorangegangenen Ergebnisse in einem anderen Blickwinkel betrachtet werden müssen. Denn da schon zu Beginn ungleiche Nuklease-Konzentrationen in die jeweiligen Assays eingesetzt wurden, resultierten daraus sowohl eine verringerte DNA-Spaltaktivität als auch veringerte DNA-Bindungseigenschaften der CAD-Varianten im Gegensatz zum Wildtyp.

3.2 Oligomerenstatus der Untereinheiten im DFF-Komplex

Erste Untersuchungen zeigten, dass es sich im Falle von DFF um einen heterodimeren Komplex bestehend aus einer Nuklease (CAD/DFF40) und einem Inhibitor (ICAD-L/DFF45) handelt²⁷. Einige Jahre später konnte allerdings gezeigt werden, dass DFF sowohl in gesunden als auch in apoptotischen Zellen in der Lage ist, Oligomere zu bilden⁶⁵. Somit wich das ursprünglich angenommene Modell eines heterodimeren Komplexes (CAD/ICAD-L) einem nun neuen Modell, das von einem Tetramer, bestehend aus zwei DFF-Heterodimeren (CAD/ICAD-L)₂, ausgeht. Dies könnte bedeuten, dass CAD schon vor der Aktivierung durch Caspase-3 in einem dimeren Zustand vorliegt, der sich allerdings von dem des aktiven Dimers unterscheidet. Es wäre vorstellbar, dass der DFF-Komplex als Tetramer an DNA bindet und in diesem gebundenen Zustand durch Caspase-3 aktiviert wird. Durch die Präformation tetramerer oder höherer Komplexe kann die Nuklease sofort beginnen, DNA zu spalten, ohne aus der Lösung homodimerisieren zu müssen.

Zur Untersuchung der Frage, ob DFF Tetramere bildet, sollte durch Koexpression unterschiedlich Epitop-fusionierter DFF-Untereinheiten in Säugerzellen der Oligomerenstatus von DFF untersucht werden.

3.2.1 Klonierung der DFF-Untereinheiten zum Nachweis oligomerer DFF-Komplexe

Zu Beginn wurden sowohl verschiedene fusionierte CAD- als auch DFF45-Varianten generiert (s. Tabelle 2.10), die in Dimerisierungsversuchen eingesetzt werden sollten, um Heterodimere zu erlangen.

3.2.2 Koimmunopräzipitationsversuch

Für diesen Koimmunopräzipitationsversuch wurden HEK293T-Zellen (s. 2.5.1) mit den oben genannten CAD-Varianten in drei verschiedenen Ansätzen (s. Tabelle 2.10, Ansätze 1-3) gemeinsam mit DFF45 transfiziert, die exprimierten Proteine über FLAG- oder HA-tag jeweils gereinigt und schließlich die Ergebnisse mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.3.1.4) analysiert.

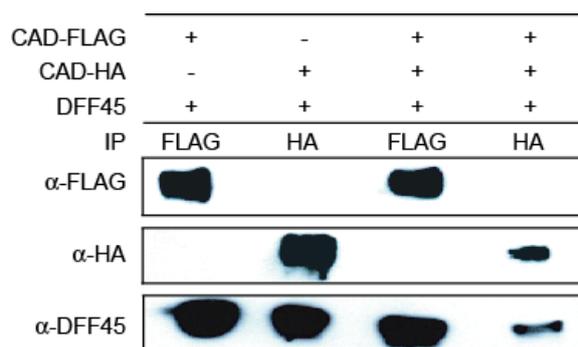


Abb. 3.10: Koimmunopräzipitation verschiedener DFF-Komplexe. Gezeigt ist ein Western Blot, durchgeführt mit α -FLAG, α -HA und α -DFF45 Antikörpern. Die Ergebnisse der IPs zeigen in den ersten beiden *lanes* die Reinigung der CAD-Konstrukte, die gemeinsam mit DFF45 in HEK293T-Zellen erfolgreich exprimiert wurden. In den beiden darauffolgenden *lanes* sollten jeweils drei Banden zu sehen sein, da in diesen Ansätzen die Zellen jeweils mit drei Plasmiden transfiziert wurden. Da dies nicht der Fall ist und wie zuvor nur zwei Banden zu erkennen sind, kann man daraus schließen, dass es zu keiner Heterodimerisierung von CAD kam.

Es ist zu beobachten, dass die Expression und Reinigung der DFF-Komplexe, bestehend aus CAD-FLAG bzw. CAD-HA und dem Inhibitor DFF45 möglich ist, was durch die ersten beiden *lanes* dokumentiert wurde (s. Abb. 3.10). Sowohl die Reinigungen über FLAG-*beads* als auch über HA-*beads* verliefen erfolgreich. Die Ergebnisse der Ansätze, die in den beiden darauffolgenden *lanes* zu sehen sind, zeigten allerdings, dass es nicht möglich war, CAD-Heterodimere zu reinigen. Es wurden zwar HEK293T-Zellen mit zwei verschiedenen CAD-Konstrukten und DFF45 transfiziert, jedoch konnte neben der DFF45-Bande nur eine CAD-Bande detektiert werden. Dementsprechend war es nicht möglich durch Koexpression der beiden CAD-Varianten Heterodimere der Nuklease zu reinigen.

3.2.3 Dimerisierung von DFF45-Protomeren

Um sicher zu stellen, dass es aufgrund der verwendeten Konstrukte oder experimentellen Bedingungen zu keiner Heterodimerisierung der Nuklease kam, wurden erneut CAD-Konstrukte und auch ICAD-L-Konstrukte generiert, die unterschiedliche Epitop-*tags* aufwiesen. Der erneute Versuch des Nachweises oligomerer DFF-Komplexe wurde auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt, wobei im ersten Fall die Proteine (s. Tabelle 2.10, Ansätze 4-6) gemeinsam in Zellen einer Gewebekulturschale koexprimiert wurden. Nach der Expression wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proteine über die jeweiligen *tags* gereinigt. Zum anderen wurden die Proteine zunächst jeweils getrennt in Zellen einer Gewebekulturschale (insgesamt in zwei Schalen) koexprimiert und nach Zellaufschluss zusammen für eine Stunde im Kühlraum inkubiert. Erst danach erfolgte die

Koimmunopräzipitation (s. 2.6.5), deren Ergebnis erneut mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.3.1.4) analysiert wurde.

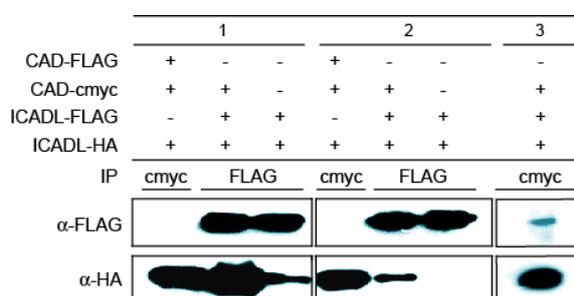


Abb. 3.11: Dimerisierung von DFF45-Untereinheiten. Gezeigt ist ein Western Blot, durchgeführt mit α -FLAG und α -HA Antikörpern. In HEK293T-Zellen koexprimierte Proteine aus einer (1) und aus zwei Gewebekulturschalen (2, 3), die über cmyc- oder FLAG-IP gereinigt wurden. Sowohl im ersten Fall (1) als auch im zweiten Falle (2) ist in der ersten *lane* keine Bande bei α -FLAG zu erkennen. Dies bedeutet, dass keine Heterodimerisierung von CAD statt fand. Jedoch zeigen die darauffolgenden *lanes* jeweils Banden bei α -HA, weshalb man von einer Dimerisierung der Untereinheiten von DFF45 ausgehen kann, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von CAD. Dies wird auch durch die Ergebnisse, die in der letzten *lane* zu sehen sind, bestärkt. Ebenso kann in dem Fall, in dem die beiden DFF45-Konstrukte in Zellen einer Schale koexprimiert und über ihren FLAG-*tag* gereinigt wurden, eine Bande bei α -HA detektiert werden, wodurch eine Dimerisierung der beiden Untereinheiten nachgewiesen ist.

Diese Western Blot Analyse (s. Abb. 3.15) zeigt eine Vielfalt von Ergebnissen, die folglich einzeln beschrieben werden. Zunächst erkennt man, dass sowohl bei Koexpression von zwei unterschiedlichen CAD-Konstrukten mit DFF45 (s. Abb. 3.11; 1, 1. Spur) als auch bei einer getrennten Expression mit anschließender Inkubation der Proteine (s. Abb. 3.11; 2, 1. Spur) zwar eine Bande bei α -HA vorhanden ist, allerdings keine Bande bei α -FLAG. Da die entstandenen DFF-Komplexe über einen cmyc-*tag* gereinigt wurden, den eine der beiden Nukleasen besitzt, sollte bei einer Heterodimerisierung der Nuklease CAD-FLAG nachzuweisen sein. Da dies nicht beobachtet werden konnte, fand offenbar keine Heterodimerisierung von CAD statt.

Im Gegensatz dazu sind in den beiden jeweils darauffolgenden *lanes* (s. Abb. 3.11; 1+2, jeweils 2. Spur) zwei deutliche Banden bei α -HA zu erkennen, nachdem zwei unterschiedliche ICAD-L-Konstrukte mit CAD koexprimiert wurden. Dies wiederum bedeutet, dass es hier zu einer Dimerisierung der beiden DFF45-Untereinheiten gekommen ist. Dieses Ergebnis lässt sich auch bestätigen, wenn die Reinigung der DFF-Komplexe über einen anderen *tag* erfolgt (s. Abb. 3.11; 3). Auch hier sind beide Banden gut zu erkennen.

Zuletzt zeigt eine Koexpression der beiden Inhibitoren allein (s. Abb. 3.11; 1, 3. Spur) ebenfalls eine Bande bei α -HA, wodurch hier ebenfalls eine Dimerisierung der beiden DFF45-Konstrukte beobachtet werden konnte. Allerdings ist dieses Verhalten bei einer getrennten Expression mit darauffolgender Inkubation der Proteine nicht zu beobachten (s. Abb. 3.11; 2, 3. Spur), da der Dimerisierungsvorgang offenbar sehr langsam stattfindet.

Zwar konnten mit den durchgeführten Versuchen keine Heterodimere von CAD erhalten werden, allerdings wurden andere Ergebnisse erzielt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass es bei einer Koexpression von CAD und zwei DFF45-Konstrukten zu einer Dimerisierung der Untereinheiten von DFF45 kommt. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass diese beiden DFF45-Konstrukte ebenfalls dimerisieren, wenn sie in Abwesenheit von CAD koexprimiert werden. Dieser Vorgang der Dimerisierung wird allerdings durch die Anwesenheit von CAD beschleunigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich zumindest um einen trimären DFF-Komplex (CAD/ICAD₂) handelt.

Nachdem mit verschiedenen Möglichkeiten versucht wurde, eine Heterodimerisierung von CAD zu erhalten bzw. CAD-Heterodimere zu reinigen, dies allerdings nicht gelungen war, wurde bei den im Folgenden beschriebenen Ansätzen der Versuch unternommen, die Heterodimerisierung von CAD zu erzwingen.

3.3 Forcierte Heterodimerisierung von CAD-Protomeren

Es wurde schon früh angenommen, dass in der Nuklease CAD zwei unterschiedliche Domänen für die DNA-Bindung und -Spaltung verantwortlich sind⁶⁶. Des Weiteren wurde vermutet, dass neben dem katalytischen Zentrum, das im Komplex durch DFF45 inhibiert wird, noch eine weitere, nicht katalytische DNA-Bindungsstelle existiert, die allerdings nicht durch den Inhibitor blockiert wird³³. Aufgrund von Ergebnissen meiner Diplomarbeit konnte schließlich gezeigt werden, dass CAD neben dem katalytischen Zentrum, welches mit dem $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv unspezifisch über die kleine Furche mit der DNA interagieren kann, eine weitere DNA-Bindedomäne aufweist⁶⁷. Die α -Helix 4, die sich inmitten dieser zweiten DNA-Binderegion befindet, knüpft Kontakte zur großen Furche der DNA und ist somit für eine stabile DNA-Bindung verantwortlich. Demzufolge besitzt ein CAD-Protomer jeweils eine Domäne für die DNA-Bindung und eine für die DNA-Spaltung.

Da bekannt ist, dass funktionelles CAD nach Aktivierung des DFF-Komplexes als Homodimer aktiv ist, stellt sich nun die Frage, welches DNA-Bindemotiv mit welchem katalytischen Zentrum zusammenarbeitet. Ist es ausreichend, wenn beide Motive eines Protomers zusammenarbeiten (*cis*-Komplementation), wobei dann zur Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung keine Dimerisierung mehr von Nöten wäre, oder muss die Nuklease

homodimerisieren, weil ein DNA-Bindemotiv des einen Protomers mit dem katalytischen Zentrum des anderen Protomers interagiert (*trans*-Komplementation, s. Abb. 3.12).

Um dies herauszufinden, wurden verschiedene fusionierte CAD-Varianten generiert, die letztendlich als Heterodimere, eingesetzt in einem Aktivitätsassay, Aufschluss darüber geben sollten.

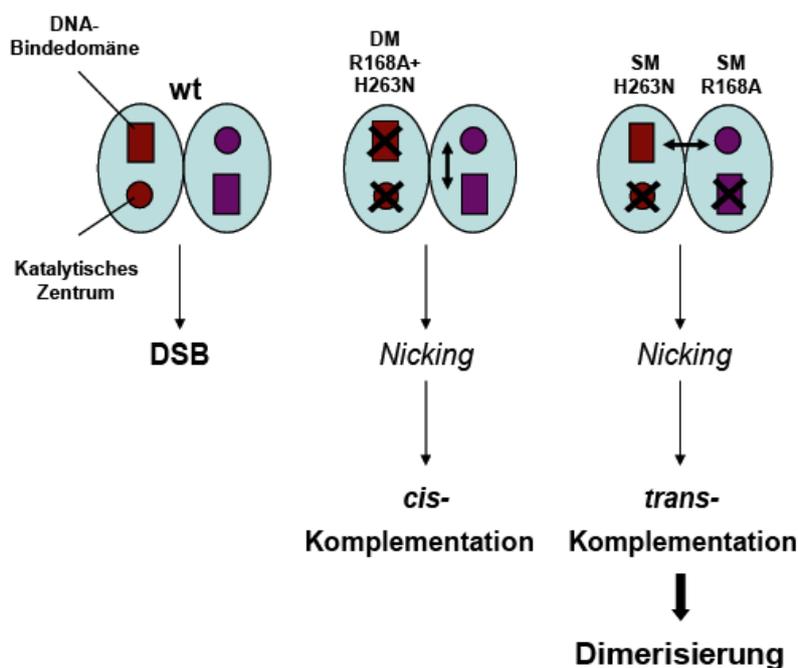


Abb. 3.12: Vereinfachte Darstellung der erwarteten Ergebnisse des Heterodimer-Aktivitätsassays. Vereinfacht dargestellt sind CAD-Dimere, die jeweils (in einem Protomer) eine DNA-Bindedomäne und ein katalytisches Zentrum aufweisen. Im Fall des Wildtyps (wt), der keine Mutation besitzt, kommt es bei einem Nuklease-Aktivitätsassays zu einem Doppelstrangbruch (DSB) der DNA. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden anderen Kombinationen theoretisch ein *nicking* der DNA, da nur ein katalytisches Zentrum aktiv ist. Wenn die beiden Zentren eines Protomers mutiert sind und das aktive Heterodimer (mit Doppel-Variante R168A/H263N) die DNA *nickt*, besteht eine *cis*-Komplementation, d.h. ein Protomer ist ausreichend, um DNA zu spalten. Wenn allerdings dasjenige Heterodimer, in dem jeweils in einem Protomer das DNA-Bindemotiv und im anderen Protomer das katalytische Zentrum mutiert sind, *nicking* zeigte, läge eine *trans*-Konformation vor. Dies würde bedeuten, dass CAD dimerisieren muss, um eine aktive Form zu erlangen.

Da im Vorfeld die Heterodimerisierung von CAD durch gemeinsame Expression oder durch Inkubation der Proteine nach Zellaufschluss nicht erfolgreich war, wurde eine Strategie zur erzwungenen Heterodimerisierung versucht. Zu diesem Zweck wurden neue Versuche durchgeführt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

3.3.1 Auswahl und Klonierung der CAD-Varianten

Da zu Beginn bekannt war, welche Aminosäurereste in CAD für welche Region (DNA-Bindedomäne bzw. katalytisches Zentrum) essentiell sind, konnte dieses Wissen für die Klonierung geeigneter Expressionsvektoren verwendet werden. Es wurden CAD-Konstrukte mit verschiedenen *tags* generiert, um auf diese Weise nach Immunpräzipitationen Heterodimere zu erlangen. Neben Wildtyp-CAD wurden auch Varianten von CAD hergestellt, die entweder einen oder zwei Aminosäurerest-Austausche aufwiesen. Bei den Varianten mit nur einem Aminosäurerest-Austausch war entweder das DNA-Bindezentrum (CAD-R168A) oder das katalytische Zentrum (CAD-H263N) mutiert, wohingegen bei der Doppel-Variante beide Regionen einen Aminosäurerest-Austausch aufwiesen.

Die verschiedenen CAD-Varianten wurden in zwei verschiedene Plasmid-Vektoren eingesetzt, pC₄-EN-F1 und pC₄-R_HE (s. 2.2.3), die jeweils ein Gen enthalten, das für ein bestimmtes Protein kodiert. Diese beiden Proteine werden durch Zugabe eines Rapamycin-Analogs (AP21967) quasi gezwungen, Dimere zu bilden.

Um allerdings sicher zu gehen, dass diese Methode dazu geeignet ist, Heterodimere zu generieren, wurden zunächst nur Wildtyp-CAD-Konstrukte eingesetzt.

3.3.2 Expression und Reinigung verschiedener CAD-Varianten

Zu Beginn wurden HEK293T-Zellen (s. 2.5.1) mit DFF45 und drei verschiedenen fusionierten CAD-Varianten (wt) transfiziert (s. 2.5.2): CAD-wt-FLAG, CAD-wt-HA und CAD-wt-Strep. Nachdem die Proteine ü.N. exprimiert wurden, konnten am nächsten Tag die Zellen aufgeschlossen und die Proteine je nach *tag* gereinigt werden (s. Tabelle 2.11). Um sowohl die Expression, als auch das Ergebnis der Reinigung beobachten zu können, wurde neben dem gereinigten Protein auch der Zellextrakt auf ein SDS-Gel (s. 2.3.1.3) aufgetragen, um schließlich das Ergebnis durch Western Blot (s. 2.3.1.4) zu analysieren. Als Negativkontrolle dienten die Zellextrakte sowie Eluate, die von nicht-transfizierten Zellen gewonnen wurden.

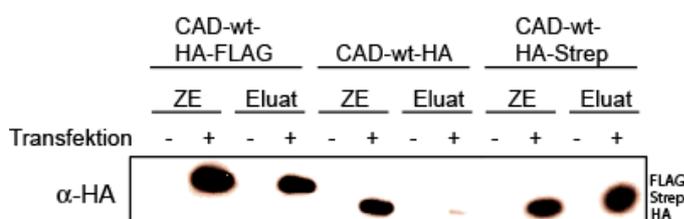


Abb. 3.13: Expression der unterschiedlich fusionierten CAD-Varianten. Zu sehen ist ein Western Blot, durchgeführt mit α -HA Antikörper. Die jeweilige Bande des Zellextrakts (ZE) zeigt die Expression der einzelnen CAD-Varianten an, wohingegen im Eluat nur die gereinigten Proteine zu finden sind.

Expression und Reinigung sind mit Ausnahme von CAD-wt-HA gut, wohingegen die Ergebnisse sowohl der Zellextrakte als auch der Eluate der nicht-transfizierten Zellen keine Banden zeigen.

Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen ist, zeigten zunächst die nicht-transfizierten Zellen weder im Zellextrakt (ZE) noch nach der Reinigung über die entsprechenden *tags* der Proteine Banden. Im Gegensatz dazu, wurden bei den transfizierten Zellen sowohl im Zellextrakt als auch nach der Reinigung die verschieden fusionierten CAD-Varianten nachgewiesen. Allerdings zeigte sich die Reinigung von CAD-wt-HA über HA-*beads* als nicht erfolgreich, da hier nur eine sehr schwache Bande zu erkennen war.

Demzufolge wurden für den folgenden Versuch die beiden Plasmide pC₄-EN-F1-CAD-wt-HA-FLAG und pC₄-R_HE-CAD-wt HA-Strep eingesetzt.

3.3.3 Doppel-Affinitätsreinigung der CAD-wt-Heterodimere

Um zu untersuchen, ob eine Heterodimerisierung von CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA-Strep gelungen war, wurden zunächst HEK293T-Zellen (s. 2.5.1) mit DFF45 und diesen beiden Plasmiden in An- oder Abwesenheit von AP21967 (Rapalog) transfiziert (s. 2.5.2), ü.N. exprimiert und am darauffolgenden Tag zunächst über einen FLAG-*tag* und anschließend einen Strep-*tag* oder umgekehrt (1. Strep-*tag* und 2. FLAG-*tag*) gereinigt. Hier wurde, neben den Eluaten der Reinigung, erneut Zellextrakt mit auf das SDS-Gel (s. 2.3.1.3) aufgetragen, um die Expression der Proteine verfolgen zu können. Mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.3.1.4) konnte untersucht werden, ob nach der zweiten Reinigung ein heterodimeres Protein erhalten werden konnte.

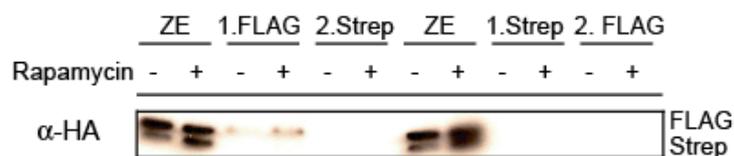


Abb. 3.14: Verlauf der Doppel-Affinitätsreinigung von CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA-Strep.

Gezeigt ist ein Western Blot, der mit α -HA Antikörper durchgeführt wurde. Es ist zu erkennen, dass im Zellextrakt (ZE) sowohl mit als auch ohne AP21967 (Rapalog) beide Proteine exprimiert wurden, wobei die Menge mit Rapalog etwas größer war. Jedoch konnte nach den jeweilige Reinigungsschritten kaum (1. FLAG) bzw. kein Protein (1. Strep) detektiert werden.

Die Expression der beiden Proteine CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA-Strep war sowohl mit als auch ohne AP21967 (Rapalog) gut (s. Abb. 3.14), wobei in Anwesenheit von AP21967 die exprimierte Menge an Protein etwas erhöht war. Allerdings konnte nach der ersten Reinigung über FLAG-*tag* (1. FLAG) nur noch eine geringe Menge an FLAG-fusioniertem

3.3.5 Untersuchung der FLAG/HA-Konstrukte bezüglich forcierter Heterodimerisierung durch AP2197

Da die Untersuchung der Heterodimerisierung zuvor nicht erfolgreich war (s. 3.3.2), wurde nun mit neuen Konstrukten, CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA, der folgende Versuch durchgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob auch bei diesen Konstrukten das Rapalog AP21967 einen Einfluß auf die Heterodimerisierung zeigte. Hierfür wurden HEK293T-Zellen (s. 2.5.1) mit beiden Plasmiden, pC₄-EN-F1-CAD-wt-FLAG und pC₄-R_HE-CAD-wt-HA, sowie einem dritten Plasmid, pCI-cmyc-DFF45 in An- und Abwesenheit von AP21967 transfiziert, ü.N. exprimiert und am darauffolgenden Tag über FLAG-tag gereinigt. Die Eluate wurden (in zunehmender Menge) auf ein SDS-Gel (s. 2.3.1.3) aufgetragen und das Ergebnis mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.3.1.4) analysiert.

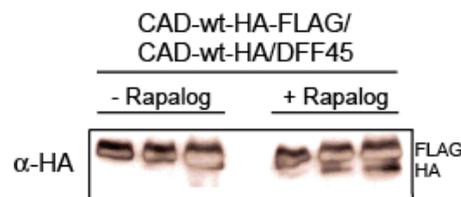


Abb. 3.16: Heterodimerisierung von CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA. Gezeigt ist ein Western Blot, durchgeführt mit α -HA Antikörpern. Anhand der Ergebnisse dieser FLAG-IP kann man mit zunehmender Menge an Eluat die Dimerbildung der beiden Nukleasen in Anwesenheit des Rapalogs erkennen, wohingegen ohne Rapalog nur die Bande von CAD-wt-HA-FLAG zu beobachten ist.

In diesem Fall konnte in Anwesenheit von AP21967 Heterodimere, erkennbar an den zwei Banden (FLAG und HA), gereinigt werden (Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu konnte ohne Rapalog nur eine Bande (FLAG) detektiert werden und somit nur CAD-wt-HA-FLAG gereinigt werden. Allerdings zeigten die CAD-Heterodimere keine 1:1 Stöchiometrie auf, was in folgenden Versuchen verbessert werden sollte.

3.3.6 Generierung von CAD-Heterodimeren aus verschiedenen fusionierten CAD-Varianten

Da es nun möglich war, Heterodimere von CAD zu exprimieren und zu reinigen, wurden verschiedene Ansätze durchgeführt (s. Tabelle 2.12), um CAD-Heterodimere mit verschiedenen Aminosäurerest-Austauschen zu erhalten. Die Proteine wurden erneut in HEK293T-Zellen (s. 2.5.1) exprimiert, anschließend über FLAG-tag gereinigt und das Ergebnis mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.3.1.4) analysiert. Es wurde sowohl der

Zellextrakt als auch die gereinigten Proteine auf das SDS-Gel (s. 2.3.1.3) aufgetragen, um zum einen die Expression und zum anderen die Reinigung verfolgen zu können.

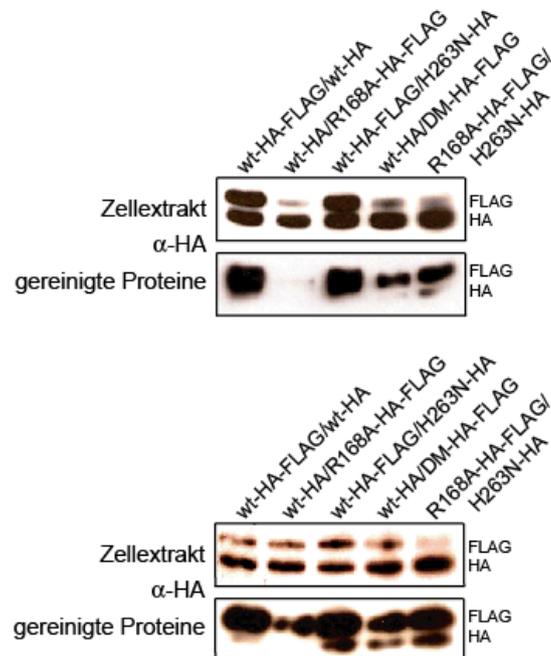


Abb. 3.17: Heterodimere von CAD-Varianten. Gezeigt sind Western Blots durchgeführt mit α -HA Antikörpern. Oben: Man erkennt unterschiedlich starke Expression der einzelnen Proteine (Zellextrakt) und ebenfalls die stöchiometrisch unterschiedlich gereinigten Proteine. Unten: Die Expression der einzelnen Proteine zeigt im Zellextrakt eine annähernd gleiche Verteilung, wobei die gereinigten CAD-Heterodimere auch keine 1:1 Stöchiometrie aufweisen.

Wie man in Abbildung 3.17 (oben; Zellextrakt) erkennen kann, wurden zwar jeweils beide Proteine exprimiert, aber auch in unterschiedlicher Menge. Nach der Reinigung über FLAG-tag konnten allerdings nur noch geringe Mengen an Heterodimeren detektiert werden, wobei zu erkennen ist, dass die Expressionsrate von den jeweilige Plasmiden abhängig war. So z.B. zeigte CAD-wt-HA-FLAG eine bessere Expression als die FLAG-fusionierten CAD-Varianten.

Um nun bessere Aussagen treffen zu können, wurde versucht, eine 1:1 Stöchiometrie im Expressionslevel zu erreichen, indem die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an Plasmiden transfiziert wurden, was auch annähernd erfolgreich war (s. Abb. 3.17 unten; Zellextrakt). Man kann erkennen, dass die Proteine einigermaßen gleichmäßig exprimiert wurden. Die Reinigung zeigte allerdings nur vereinzelt CAD-Heterodimere, die jedoch auch keine 1:1 Stöchiometrie aufwiesen.

Obwohl nur wenige CAD-Heterodimere gereinigt werden konnten, wurden die Proteine in Nuklease-Aktivitätsassays eingesetzt, um deren Verhalten bezüglich ihrer Spaltaktivität zu testen.

3.3.7 Nuklease-Aktivitätsassay

Die zuvor gereinigten CAD-Heterodimere wurden anschließend in einem Nuklease-Aktivitätsassay eingesetzt, um ihre Spalteigenschaft zu untersuchen. Dazu wurden die DFF-Komplexe zunächst 30 min bei 37 °C mit Caspase-3 (ohne Caspase-3 als Kontrolle) und anschließend mit Plasmid-DNA (pBSK, s. 2.2.3) für 20 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden auf einem Agarosegel (s. 2.3.1.1) analysiert.

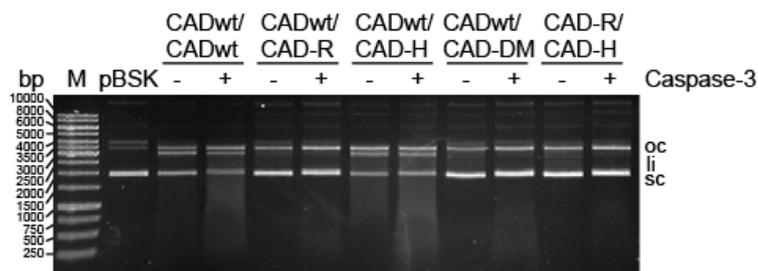


Abb. 3.18: Nuklease-Aktivitätsassay der FLAG/HA-Konstrukte von CAD. Gezeigt ist ein 0.8%iges, Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel. Man kann erkennen, dass sowohl das CAD-wt-Homodimer als auch das CAD-wt/CAD-H263N-Heterodimer geringe DNA-Spaltung zeigen. Dies deutet darauf hin, dass ein katalytisches Zentrum und zwei DNA-Bindedomänen für eine Spaltung der DNA notwendig und ausreichend sind. Diese Annahme wird durch das Spaltverhalten der restlichen Heterodimere bestärkt, da in diesen Fällen jeweils nur ein DNA-Bindemotiv funktionstüchtig ist und somit die DNA nicht gespalten werden kann. Zudem zeigen alle Proteine eine Anreicherung von *open circle* (oc) DNA, was auch ohne Caspase-3-Inkubation zu beobachten ist. oc: *open circle*, lin: *linear*, sc: *supercoil* DNA.

Das CAD-wt-Homodimer zeigte nach Caspase-3-Inkubation eine leichte Spaltaktivität, wohingegen ohne Caspase-3 keinerlei Spaltung zu beobachten war. Das CAD-Heterodimer, in dem ein Protomer eine inaktive DNA-Bindestelle aufwies (CAD-wt/CAD-R168A), zeigte kaum Spaltaktivität, verglichen mit dem Wildtyp. Anders beim CAD-Heterodimer, das aus einem Wildtyp-Protomer und einem Protomer mit mutiertem katalytischem Zentrum bestand (CAD-wt/CAD-H263N). Denn hier konnte ebenfalls eine geringe Spaltaktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten auch die Ergebnisse der beiden CAD-Heterodimere CAD-wt/CAD-DM und CAD-R168A/CAD-H263N keine Spaltaktivität.

In diesem Teil der Arbeit konnten CAD-Heterodimere, bestehend aus unterschiedlich fusionierten CAD-Varianten, in einem 1:1 Verhältnis der beiden Nukleasen erfolgreich exprimiert werden. Die darauffolgende Reinigung dieser Heterodimere konnte zwar gezeigt werden, allerdings wiesen die resultierenden Protein-Komplexe keine 1:1 Stöchiometrie

mehr auf. Demzufolge konnten auch mit dem darauffolgenden Nuklease-Aktivitätsassays im Hinblick auf die Spalteigenschaft der CAD-Heterodimere keine eindeutigen Angaben gemacht werden, da die unterschiedlichen CAD-Konstrukte im Heterodimer nicht gleichmäßig verteilt vorlagen. Deshalb können im Folgenden nur bedingt Aussagen getroffen werden. Da neben dem CAD-wt-Homodimer nur das CAD-wt/CAD-H263N-Heterodimer DNA-Spaltung zeigt, kann man davon ausgehen, dass für eine DNA-Spaltung zum einen ein katalytisches Zentrum ausreichend ist und zum anderen beide DNA-Bindedomänen erforderlich sind. Dies wird auch durch die Ergebnisse der beiden CAD-Heterodimere bestärkt, die nur eine funktionelle DNA-Bindestelle besitzen. Somit wäre eine Homodimerisierung von CAD zur Erlangung einer katalytisch kompetenten Form unumgänglich.

3.4 Induzierter proteasomaler Abbau von CAD

Wenn der DFF-Komplex bestehend aus der Nuklease CAD und dem Inhibitor/Chaperon DFF45 einmal durch Caspase-3 aktiviert wurde und somit DFF45 gespalten wird und von CAD dissoziiert, ist die Nuklease aktiv und kann DNA internukleosomal spalten. Allerdings wäre es von großem Vorteil, wenn man die beiden wichtigen Vorgänge, die Aktivierung des DFF-Komplexes durch Spaltung von DFF45 und die Nukleaseaktivität von CAD, kontrollieren könnte. Dann wäre es möglich zu definierten Zeitpunkten den DFF-Komplex, aber v.a. CAD zu kontrollieren und somit die Nukleaseaktivität zu regulieren. Wie bekannt ist, wird sobald CAD nicht mehr mit dem Inhibitor interagiert, die Nuklease ubiquitiniert und vom Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut⁶⁸.

In dieser Arbeit wurde dieser Aspekt hinsichtlich der Nukleaseaktivität untersucht und der proteasomale Abbau induziert. Hierfür wurde mit einem System gearbeitet, das es mit Hilfe eines Stabilisierungsliganden (*Shield1*) ermöglicht, die Menge an gewünschtem Protein in der Zelle zu regulieren. Dazu wurde das Gen des zu untersuchenden Proteins (CAD bzw. DFF45) durch Verwendung eines speziellen Vektors (pPTuner, s. 2.2.3) kloniert, der u.a. eine 12 kDa große Domäne, die FKBP (L106P) Destabilisierungsdomäne (DD) enthält. Diese DD bewirkt eine schnelle Degradation des DD-fusionierten Proteins, wohingegen in Anwesenheit des Stabilisierungsliganden *Shield1* die intrazelluläre Proteinmenge schnell erhöht werden kann (s. 2.6.6). Demzufolge ließe sich mit Hilfe von *Shield1* zum einen die Aktivierung des DFF-Komplexes steuern, indem CAD/DD-DFF45 in Anwesenheit von *Shield1* stabilisiert als Komplex vorliegt und in Abwesenheit DD-DFF45 destabilisiert vorliegt und proteasomal abgebaut wird. Zum anderen könnte auch die Nukleaseaktivität kontrolliert werden, da DD-CAD in Anwesenheit von *Shield1* aktiv ist und DNA spaltet, wohingegen in Abwesenheit von *Shield1* die Nuklease durch Proteasen abgebaut würde und demzufolge die DNA nicht mehr spalten könnte.

Zunächst sollte allerdings die Frage geklärt werden, ob bei einem DFF-Komplex bestehend aus CAD/DD-DFF45 in Abwesenheit von *Shield1* nur der Inhibitor abgebaut wird und die Nuklease stabil bleibt, oder ob sowohl Inhibitor als auch Nuklease abgebaut werden. Um dies herauszufinden, wurden Assays (s. 2.6.4) durchgeführt, die den induzierten Abbau des DFF-Komplexes *in vivo* untersuchen.

3.4.1 Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-DFF45 koexprimiert mit CAD in HEK293T-Zellen

Zu Beginn wurde zunächst DFF45 wie oben beschrieben mit Hilfe des Vektors (pPTuner, s. 2.2.3) kloniert, der u.a. eine destabilisierende Domäne (DD) enthielt. Bei einem in HEK293T-Zellen (s. 2.5.1) koexprimierten DFF-Komplex konnte durch einen Liganden (*Shield1*) der Inhibitor stabilisiert und somit vor proteasomalem Abbau geschützt werden. Neben einer Negativ- und einer Positiv-Kontrolle wurden vier weitere Ansätze getestet, denen nach unterschiedlichen Zeitpunkten (30, 60, 120, 240 min) das Ligand-enthaltene Medium entzogen wurde. Nachdem die Zellen geerntet und aufgeschlossen wurden (s. 2.5.3), konnte mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.3.1.4) das Ergebnis analysiert werden.

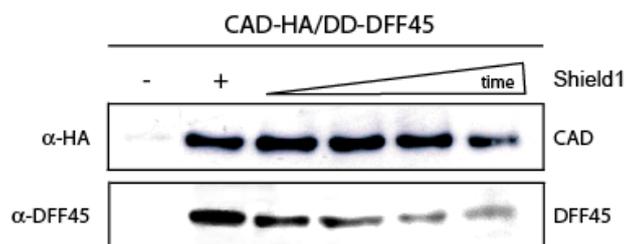


Abb. 3.19: Induzierter proteasomale Abbau des DFF-Komplexes. Gezeigt ist ein Western Blot durchgeführt mit α -HA und α -DFF45 Antikörpern. Es ist zu erkennen, dass ohne *Shield1* (500 nM) DD-DFF45 abgebaut wird und deshalb auch nur eine sehr geringe Menge an CAD exprimiert werden konnte. Im Gegensatz dazu kann in Anwesenheit von *Shield1* der DFF-Komplex stabilisiert werden. Mit zunehmender Zeit in Abwesenheit von *Shield1* ist von beiden Proteinen ein Abbau zu erkennen.

Das Ergebnis zeigt, dass ohne den stabilisierenden Liganden *Shield1* DD-DFF45 abgebaut wurde, und demzufolge auch nur eine sehr geringe Menge an CAD exprimiert werden konnte. In Anwesenheit von *Shield1* allerdings waren beide Proteine stabil (s. Abb. 3.19). Je länger die Inkubationszeit der Zellen ohne *Shield1* war, desto mehr Protein DD-DFF45 wurde abgebaut.

Da allerdings für dieses Experiment zwei Western Blots nötig waren um beide Proteine detektieren zu können, wurden weitere Konstrukte hergestellt, um sowohl CAD als auch

DFF45 auf einer PVDF-Membran gemeinsam nachweisen zu können. Dies hätte den Vorteil einer relativen Quantifizierung der Proteinmengen.

3.4.2 Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-CAD bzw. DD-DFF45 koexprimiert mit DFF45 bzw. CAD in HEK293T-Zellen

Um nun beide Proteine durch Immunodetektion gemeinsam unter Verwendung eines Antikörpers nachweisen zu können, wurden neue Konstrukte generiert, die für die Detektion jeweils einen HA-tag enthielten. Da zunächst nur der Inhibitor DFF45 eine destabilisierende Domäne (DD) enthielt, wurde nun ebenfalls CAD durch Verwendung des DD-enhaltenen Vektors pPTuner (s. 2.2.3) kloniert. Somit konnten die Untereinheiten beider DFF-Komplexe, DD-CAD/DFF45 und CAD/DD-DFF45, auf ihr Verhalten bei induziertem proteasomalem Abbau der mit der destabilisierenden Domäne fusionierten Untereinheit untersucht werden.

Die Ansätze entsprachen den vorhergehenden (s. 3.4.1), wobei für diese Versuche zusätzlich Kontrollen eingesetzt wurden. Somit wurden HEK293T-Zellen zum einen mit pPT-DD-CAD-HA und zum anderen mit pCI-CAD-HA transfiziert, um zu sehen, ob endogenes, in der Zelle bereits vorhandenes DFF45 als Chaperon fungiert und somit die verschiedenen CAD-Fusionsproteine exprimiert werden können.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Western Blot Analysen und Immunodetektion (s. 2.3.1.4) sichtbar gemacht und sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

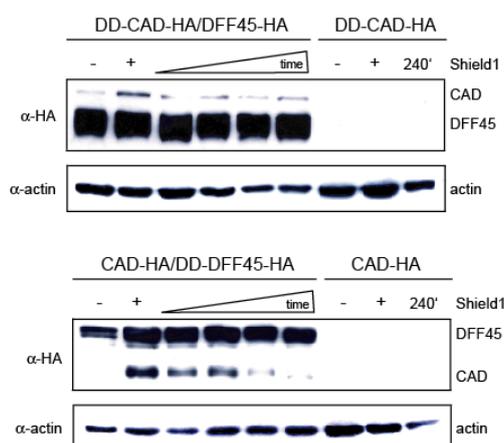


Abb. 3.20: Proteasomaler Abbau von DD-DFF-Komplexen. Gezeigt sind Western Blots durchgeführt mit α -HA Antikörper. Oben: DD-CAD koexprimiert mit DFF45 und allein exprimiert. Unten: DD-DFF45 koexprimiert mit CAD und allein exprimiert. Zu erkennen ist bei beiden DFF-Komplexen, dass unabhängig von der DD-Fusion die Menge an detektiertem CAD abnimmt, wohingegen eine Abnahme an DFF45 schwer zu erkennen ist, da dessen Expression zu stark ist. Actin wurde als *loading control* verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei einem Komplex bestehend aus DD-CAD und DFF45 zu einer Abnahme der Nuklease kommt, wohingegen eine Abnahme des Inhibitors nicht zu erkennen ist (s. Abb. 3.20).

Dieselben Ergebnisse wurden im Falle des Komplexes CAD/DD-DFF45 erhalten. Sowohl die im Western Blot nachweisbare Menge an Nuklease als auch DD-DFF45 nehmen in Abwesenheit von *Shield1* mit der Zeit ab.

Bei beiden Blots ist ebenfalls zu erwähnen, dass ohne *Shield1* eine sehr hohe Menge an DFF45 zu sehen ist, die dementsprechend nicht proteasomal abgebaut wurde, da die Expression des Inhibitors zu stark ist.

Zudem konnte eine 1:1 Stöchiometrie des DFF-Komplexes nicht erhalten werden, da die beiden Proteine CAD und DFF45 unterschiedlich gute Expression zeigten, wobei der Inhibitor DFF45 in dieser Zelllinie besser exprimiert werden konnte als die Nuklease.

3.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-CAD/-DFF45 koexprimiert mit EGFP-DFF45/-CAD in CHO-Zellen

Um den proteasomalen Abbau von DD-DFF-Komplexen auf eine andere Art untersuchen zu können bzw. um ihn besser sichtbar zu machen, wurden neue Konstrukte generiert, die jeweils ein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-Fusionsprotein enthielten.

In diesem Fall wurden in CHO-Zellen (s. 2.5.1) DFF-Komplexe koexprimiert, die zum einen aus DD-CAD/EGFP-DFF45 und zum anderen aus EGFP-CAD/DD-DFF45 bestanden. Zudem wurden zwei weitere DFF-Komplexe exprimiert (EGFP-CAD und EGFP-DFF45, jeweils allein exprimiert), die als Kontrolle dienten, um die Fluoreszenzintensität der Proteine vergleichen zu können.

CHO-Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und nach 24 h die Zellkerne mit Hoechst 33342 gefärbt (s. 2.6.4.2). Es folgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung (s. 2.6.4.1).

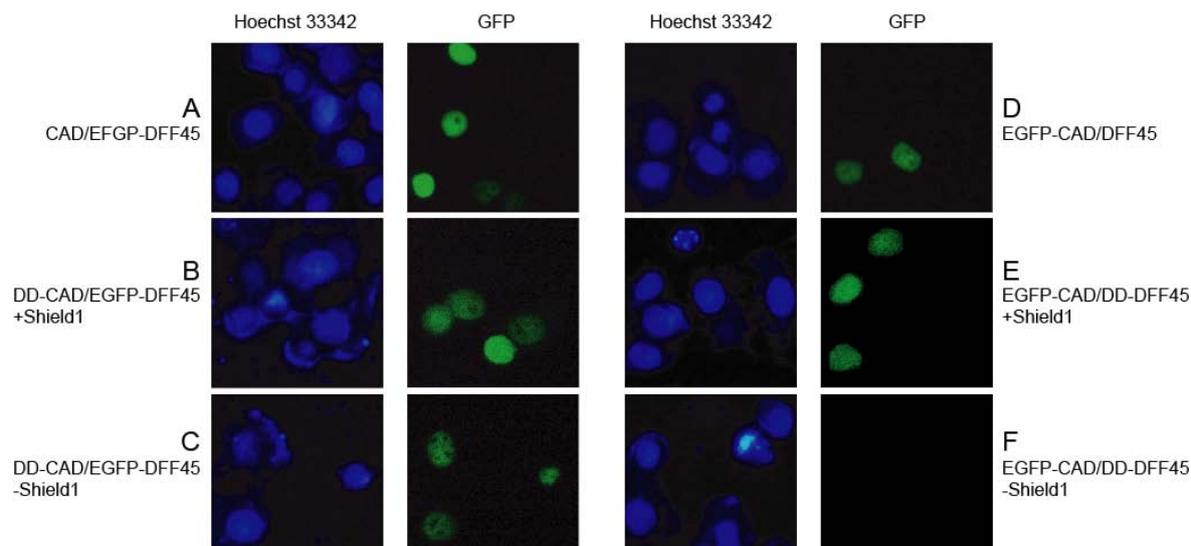


Abb. 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung des proteasomalen Abbaus von DD-DFF-Komplexen. Gezeigt sind CHO-Zellen 24 h nach Kotransfektion mit CAD/EGFP-DFF45 (A), DD-CAD/EGFP-DFF45 + *Shield1* (B), DD-CAD/EGFP-DFF45 – *Shield1* (C), EGFP-CAD/DFF45, (D), EGFP-CAD/DD-DFF45 + *Shield1* (E) und EGFP-CAD/DD-DFF45 – *Shield1* (F). Es ist zu erkennen, dass bei DD-CAD/EGFP-DFF45 mit *Shield1* (B) EGFP-DFF45 gut exprimiert wurde, wohingegen ohne *Shield1* (C) die Intensität der Fluoreszenz leicht abnimmt. Im Gegensatz dazu ist bei EGFP-CAD/DD-DFF45 ohne *Shield1* (F) keine Fluoreszenz zu erkennen, wohingegen mit *Shield1* (E) die EGFP-Fusionsproteine nicht abgebaut werden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt.

Die beiden Kontrollen EGFP-CAD/DFF45 und CAD/EGFP-DFF45 zeigten eine relativ gute Expression der Fusionsproteine (s. Abb. 3.21, A und D). Vergleicht man nun DD-CAD/EGFP-DFF45 mit und ohne *Shield1* (s. Abb. 3.21, B und C), ist zu erkennen, dass in Anwesenheit von *Shield1* die Expression von EGFP gut war. In Abwesenheit von *Shield1* konnte zwar noch EGFP nachgewiesen werden, wobei die Intensität der Fluoreszenz abgenommen hatte.

Koexpression von EGFP-CAD/DD-DFF45 in An- und Abwesenheit von *Shield1* (s. Abb. 3.21, E und F) zeigte allerdings, dass ohne *Shield1* keine Fluoreszenz detektiert werden konnte, wohingegen mit *Shield1* der Inhibitor/Chaperon stabilisiert und demzufolge der DFF-Komplex nicht abgebaut wurde.

Um dieses Experiment statistisch zu befestigen, wurden jeweils 120 Zellen gezählt und deren Fluoreszenzintensität (schwach, mittel, stark) ermittelt, was in der folgenden Abbildung dargestellt wurde.

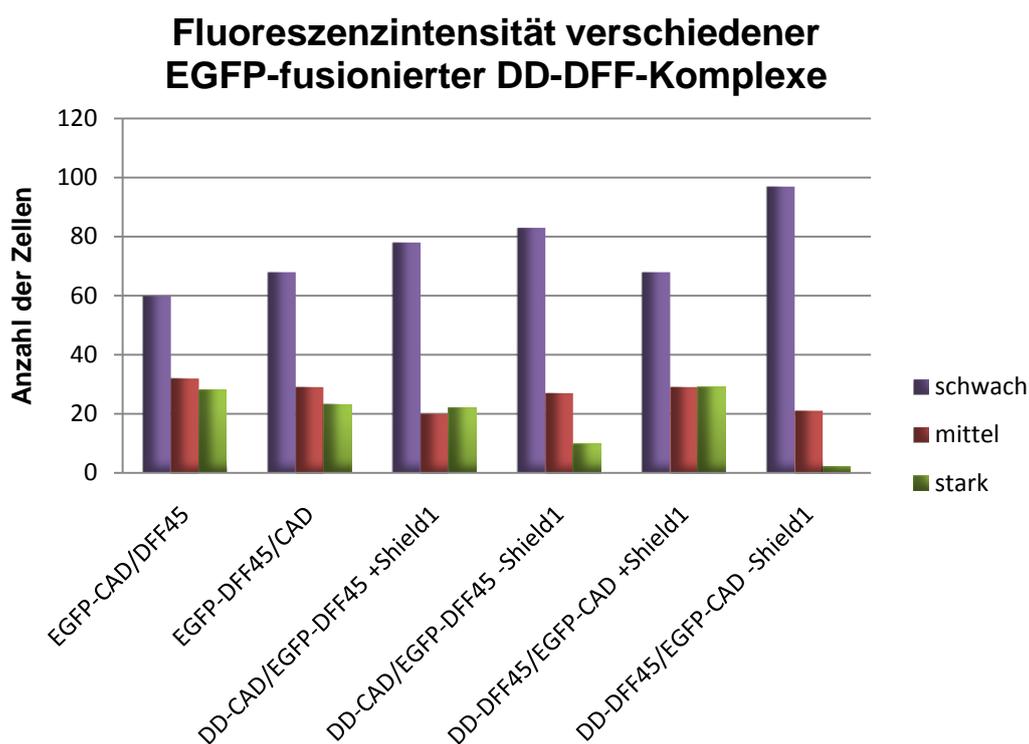


Abb. 3.22: Säulendiagramm des proteasomalen Abbaus von DD-DFF-Komplexen. Gezeigt ist ein Säulendiagramm, welches die ermittelten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen DFF-Komplexe widerspiegelt. Lila: schwache Fluoreszenz, rot: mittlere Fluoreszenz, grün: starke Fluoreszenz. Zu erkennen ist, dass ohne *Shield1* kaum starke Fluoreszenz erhalten wurde, wohingegen mit *Shield1* die Anzahl der Zellen mit starker und mittlerer Fluoreszenz größer war.

Dieses Säulendiagramm bestätigt die vorangegangenen Experimente, da exprimierte DD-DFF-Komplexe in Abwesenheit von *Shield1* nur eine geringe Menge an fluoreszierenden Zellen aufbrachten. Die Proteine lagen somit in einem destabilisierten Zustand vor und wurden demzufolge durch Proteasen abgebaut. Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit von *Shield1* eine größere Menge an fluoreszierenden Zellen beobachtet werden, weil durch den Ligand *Shield1* das DD-Protein stabilisiert und somit vor dem proteasomalen Abbau geschützt werden konnte. Zu erwähnen wäre noch, dass der proteasomale Abbau im Falle von EGFP-CAD/DD-DFF45 stärker zu sehen war als bei DD-CAD/EGFP-DFF45, da hier der Inhibitor die DD enthielt und demzufolge die geringere Bildung von EGFP-CAD besser beobachtet werden konnte.

Letzendlich konnte gezeigt werden, dass durch *Shield1* der proteasomale Abbau der Nuklease DD-CAD reguliert werden konnte, indem das Protein in Anwesenheit von *Shield1* vor Abbau geschützt wurde und es in dessen Abwesenheit destabilisiert vorlag und somit abgebaut wurde.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung einer möglichen *chaperone target region* (CTR) in CAD

DFF ist ein heterodimerer Komplex, bestehend aus der apoptotischen Nuklease CAD (DFF40) und deren Inhibitor ICAD-L (DFF45). Untersuchungen haben gezeigt, dass synthetisiertes DFF40 in Abwesenheit von DFF45 aggregiert und auch keine Nuklease-Aktivität aufweist²³. Ein Jahr später konnte das gleiche Phänomen für CAD und ICAD-L nachgewiesen werden⁴³. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass der Inhibitor auch als Chaperon für die Nuklease fungiert, wobei sich ICAD-L (DFF45) nicht in eine der zwei Hauptklassen der Chaperone einteilen lässt. Denn im Gegensatz zu DnaK/HSP70 oder zum *chaperonin* TCP1-ring (TRiC)/GroEL System arbeitet ICAD-L (DFF45) ohne ATP-Verbrauch^{69,70}. Weitere Untersuchungen zeigten, dass allgemeine Chaperone zwar die Aggregation von CAD (DFF40) verhindern, aber alleine keine funktionsfähige Nuklease falten können und dass somit ICAD-L (DFF45) als spezifisches Chaperon für CAD (DFF40) gilt^{24,43}. Durch die Doppelfunktion von ICAD-L (DFF45) als Inhibitor und Chaperon wird verhindert, dass es in Zellen ohne ICAD-L (DFF45) zur DNA-Fragmentierung kommt. Somit ist gewährleistet, dass nur als Antwort auf einen Apoptose-auslösenden Stimulus Caspase-3 den Inhibitor spaltet und die DNase aktiv werden kann. Demzufolge wird prinzipiell verhindert, dass es in Zellen, die mehr Nuklease als Inhibitor exprimieren, zum DNA-Abbau und zur Chromatinkondensierung kommt. Allerdings scheint zudem die intrazelluläre Konzentration an ICAD-L (DFF45) die von CAD (DFF40) zu übertreffen, so dass stets ein Überschuss an Inhibitor vorliegt⁴⁶. Darüberhinaus existiert eine kleinere Isoform des Inhibitors, ICAD-S (DFF35), die eine zusätzliche inhibitorische *back-up* Funktion übernimmt⁷¹.

Aufgrund der Annahme, dass der C-terminale *loop* am Ende der C3-Domäne der Nuklease intrinsisch ungefaltet vorliegt und über die drei Aminosäurereste ³²²IYR³²⁴ Kontakt zum *loop* zwischen den beiden α -Helices 7 und 8 mit den Aminosäureresten ²⁸⁴EVN²⁸⁶ hat, die nahe des katalytischen Zentrums liegen, wurde vermutet, dass der Kontakt zwischen den sechs Aminosäureresten, vermittelt durch ICAD-L (DFF45), zur Stabilisierung der katalytischen C3-Domäne beiträgt. Aus diesem Grund wurden sechs Varianten von CAD, die sich in jeweils einem Aminosäurerest vom Wildtyp unterscheiden, hergestellt und auf Stabilität, Spaltaktivität und DNA-Bindevermögen untersucht, um neue Erkenntnisse über die Chaperon-Bindestelle von ICAD-L (DFF45) zu erfahren.

4.1.1 Expression und Reinigung von CAD/DFF45-Komplexen

Die Koexpression von GST-CAD bzw. den Varianten von GST-CAD und DFF45 in *E.coli* konnte erfolgreich durchgeführt werden. Dabei wurden die Nuklease- und Inhibitor-untereinheiten der Komplexe in nahezu stöchiometrischen Mengen exprimiert (s. 3.1.3). Auch nachdem die DFF-Komplexe affinitätschromatographisch über den GST-tag der Nuklease gereinigt wurden, konnte ein nahezu stöchiometrisches Verhältnis der beiden Untereinheiten bewahrt werden (s. 3.1.4.1). Um die katalytische Aktivität und das DNA-Bindungsvermögen der Nuklease untersuchen zu können, mussten allerdings die DFF-Komplexe von kontaminierender DNA befreit werden, was durch die Verwendung der Anionenaustauschchromatographie als weitere Reinigungsmethode erfolgte. Die Stöchiometrie der auf diese Weise gereinigten Komplexe hing jedoch stark von der Stabilität der DFF-Komplexe ab.

4.1.1.1 Stabilität der CAD/DFF45-Komplexe

Nachdem die DFF-Komplexe, bestehend aus GST-CAD (Wildtyp bzw. Varianten) und DFF45, nach zweistündiger Bindung an Glutathion-Sepharose *beads* gereinigt wurden, konnte generell mehr Nuklease als Inhibitor gereinigt werden (s. 3.1.4.1, Abb. 3.5 oben). Dies ist durchaus erklärbar, da entweder nur Nuklease oder nur rekombinanter Komplex über die GST-Fusion gereinigt werden können.

Im Gegensatz dazu zeigte die Über-Nacht-Bindung der DFF-Komplexe andere Ergebnisse. Der Wildtyp-Komplex wies als einziger DFF-Komplex ein 1:1 Verhältnis von Nuklease:Inhibitor auf, wohingegen bei den DFF-Komplexen mit den Nuklease-Varianten V285A, I322T, Y323A und R324A sich mehr DFF45 als GST-CAD in den Eluatn (s. 3.1.4.1, Abb. 3.5 unten) befand. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass DFF45 nach langer Bindungszeit auch unspezifisch an die GSH-*beads* binden kann. Ebenso kann es möglich sein, dass der Inhibitor die Nuklease auch als Dimer oder Oligomer binden kann und somit DFF45 in unstöchiometrischen Mengen gereinigt wird. Eine Ausnahme stellen hier die Komplexe mit den CAD-Varianten E284A und N286D dar, da auch nach Über-Nacht-Bindung bei diesen Enzymvarianten mehr Nuklease als DFF45 gereinigt werden konnte.

Um einen stöchiometrischen DFF-Komplex (1:1) nach der Reinigung zu erhalten, wurden bereits zuvor andere Reinigungsmethoden durchgeführt. Hierfür wurden sowohl GST-fusionierte Nuklease als auch GST-fusionierter Inhibitor exprimiert und anschließend gereinigt, wobei auch hier keine 1:1 Stöchiometrie der DFF-Untereinheiten erzielt werden konnte. Eine Möglichkeit um ein ausgeglichenes Verhältnis von Nuklease und Inhibitor zu erhalten ist, den Komplex über eine Importin besetzte Säule aufzureinigen. Denn wie Untersuchungen gezeigt haben, können nur eine Nuklease und ein Inhibitor über das

jeweilige NLS an Importin binden, wodurch ein stöchiometrischer DFF-Komplex gereinigt werden kann⁶³.

Die Tatsache, dass Nuklease und Inhibitor nicht exakt im Verhältnis 1:1 vorliegen, kann auf eine Destabilisierung einiger rekombinanter DFF-Komplexe durch die eingeführten Aminosäurerest-Austausche hinweisen. Auffällig ist dieses Ungleichgewicht aus GST-CAD und Chaperon bei allen hergestellten Enzymvarianten nach der Anionenaustauschchromatographie. Durch den jeweiligen Aminosäurerest-Austausch E284A, V285A, N286D im *loop* zwischen den α -Helices 7 und 8 bzw. I322T, Y323A und R324A im C-terminalen *loop* der C3-Domäne der Nuklease wird die Stabilität des Komplexes offenbar stark reduziert. Somit kann man vermuten, dass es sich bei diesen Positionen um eine für die DFF45-Bindung wichtige Region in CAD handelt.

Nach affinitätschromatographischer Reinigung der rekombinanten DFF-Komplexe über GSH-*beads* wiesen die Proben allerdings noch eine starke Verunreinigung mit DNA auf, da die Nuklease unspezifisch DNA binden kann. Um diese DNA zu entfernen, wurden die DFF-Komplexe mittels Anionenaustauschchromatographie über eine MonoQ-HR5/5-Säule unter Anlegen eines Gradienten von 100-400 mM NaCl eluiert (s. 2.4.3.2). Der Wildtyp-Komplex und die Variante GST-CAD E284A/DFF45 ließen sich als Komplex von der Säule reinigen, wobei die Proteinausbeute der Variante E284A insgesamt viel niedriger war als die des Wildtyps (s. 3.1.4.2, Abb. 3.6). Da die anionenaustauschchromatographische Reinigung über die DFF45-Untereinheit des Komplexes erfolgte, kann die geringe DFF45-Ausgangskonzentration nach der affinitätschromatographischen Reinigung ein Grund für die geringe Proteinausbeute der Variante gewesen sein. Die Varianten V285A, N286D, I322T, Y323A und R324A ließen sich jedoch nicht im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 von Nuklease:Inhibitor reinigen. Ganz im Gegenteil, in diesen Fällen konnte nur eine geringe Konzentration der jeweiligen Nuklease-Variante gewonnen werden (s. 3.1.4.2, Abb. 3.6), da ein Großteil der Komplexe auf der Säule dissoziierte und somit nur der Inhibitor in großem Überschuss eluierte.

Dies deutet wieder auf eine geschwächte Bindung der Nuklease-Varianten an den Inhibitor bzw. an das Chaperon hin. Aufgrund der schwachen Bindung von CAD an DFF45 kann beim Anlegen des Salzgradienten die Nuklease von der Säule gewaschen werden, wobei auch die Entfernung der DNA durch den Salzgradienten zur weiteren Instabilität des Komplexes beitragen kann. Es ist anzunehmen, dass gebundene DNA die Nuklease stabilisiert und somit die Bindung an DFF45 verbessert.

Nach Reinigung der rekombinanten DFF-Komplexe erfolgte deren Aktivierung um zu testen, ob sich DFF45 durch Caspase-3 spalten lässt und somit ein Aktivitätsassay durchführbar ist. Denn nach Spaltung des Inhibitors verringert sich seine Bindung an die Nuklease, die daraufhin dissoziiert und katalytisch aktiv werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass sich

sowohl Wildtyp-Nuklease als auch alle hier getesteten CAD-Varianten durch Zugabe von Caspase-3 aktivieren ließen. Allerdings war die Konzentration an Nuklease teilweise so gering, dass sie auf den SDS-Gelen nicht detektierbar war. Mittels Western Blot und Immunodetektion konnten darauffolgend zwar alle GST-CAD-Varianten nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich hier erneut ein ungleiches Verhältnis der Nukleasen relativ zueinander (s. 3.1.9). Die höchste Konzentration wies der Wildtyp auf, gefolgt von den CAD-Varianten E284A und N286A. Niedriger konzentriert waren I322T und R324A und die schwächste effektive Nuklease-Konzentration wiesen die Varianten V285A und Y323A auf, was wohl auch an der Stabilität der DFF-Komplexe lag.

Da all diese Ergebnisse korrelieren, kann man davon ausgehen, dass die untersuchten Bereiche, der C-terminale *loop* am Ende der C3-Domäne von CAD und vor allem der *loop* zwischen den beiden α -Helices 7 und 8 mit den Aminosäureresten ²⁸⁴EVN²⁸⁶, die nahe des katalytischen Zentrums liegen, besonders bedeutsam für die Interaktion zwischen Nuklease und DFF45 sind und somit möglicherweise als Zielregion für die Chaperonfunktion des Inhibitors dienen.

4.1.2 Nuklease-Aktivität der CTR-Varianten

Die Caspase-aktivierte-DNase spaltet in Gegenwart von Mg^{2+} doppelsträngige DNA, indem die große Furche der DNA über die α -Helix 4 der C3-Domäne gebunden wird^{36,67} und das aktive Zentrum mit dem $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv in die kleine Furche der DNA binden kann⁶⁷, um dort die Phosphodiesterbindungen anzugreifen und die DNA in nukleosomale Fragmente zu spalten. Die Analyse des Nuklease-Aktivitätsassays ergab, dass nur die CAD-Variante GST-CAD E284A ähnliche Spaltaktivität wie der Wildtyp aufweist. Eine schwache aber noch messbare Aktivität zeigte die Variante GST-CAD N286A, denn nach dem DNA-Verdau durch diese CAD-Variante war keine überspiralisierte (sc) DNA mehr vorhanden, wohingegen die Varianten GST-CAD V285A, GST-CAD I322T, GST-CAD Y323A und GST-CAD R324A im Vergleich zum Wildtyp keine enzymatische Aktivität besaßen (s. 3.1.6, Abb. 3.7). Da jedoch im darauffolgenden Western Blot nachgewiesen wurde, dass die eingesetzten CAD-Konzentrationen sehr variierten, muss man eher davon ausgehen, dass die reduzierte Nuklease-Aktivität daraus resultierte.

Auffallend ist, dass die mittels Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie (s. 3.1.4.1 und 3.1.4.2) gereinigten rekombinanten DFF-Komplexe, auch wenn sie nicht durch Caspase-3 aktiviert wurden, reduzierte enzymatische Aktivität, erkennbar an der Bildung kleiner Mengen linearer DNA im Agarosegel (Abb. 3.7), aufweisen. Diese leichte nukleolytische Aktivität, die durch freie Nuklease entsteht, ist auch beim Wildtyp zu beobachten. Daraus kann man schließen, dass es sich hierbei um eine Eigenschaft der Komplex-Präparationen handelt, die nicht auf den Aminosäurerest-Austausch zurückzu-

führen ist. Bei den CAD-Varianten Y323A und R324A ist keine katalytische Aktivität im nicht-aktivierten Komplex nachweisbar, was aber auch an technischen Schwierigkeiten wie der ungleichmäßigen Beleuchtung der Geldokumentationsanlage liegen kann. Anders sieht dies bei der CAD-Variante E284A aus. Der nicht-aktivierte Komplex zeigt zwar im Gegensatz zum aktivierten Komplex reduzierte Aktivität, ist jedoch so aktiv, dass die gesamte überspiralisierte DNA gespalten wurde und nur noch als offen zirkuläre und lineare DNA vorliegt (Abb. 3.7). Offensichtlich hat der Austausch des sauren Aminosäurerestes Glu284 nach Alanin einen starken Einfluss auf das Bindungsvermögen der Nuklease zum Chaperon DFF45, obwohl der Komplex nach Analyse der anionenaustauschchromatographischen Aufreinigung (s. 3.1.4.2) noch als stabil eingeschätzt wurde. Die Nuklease-Aktivität des Komplexes vor Aktivierung durch Caspase-3 lässt sich durch das verringerte Bindungsvermögen der CAD-Variante E284 an den Inhibitor und des daraus resultierenden hohen Anteils freier Nukleasen im inaktivierten Komplex CAD E284A/DFF45 erklären. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch den Austausch des Aminosäurerests E284A, die Struktur der C3-Domäne von CAD so verändert wird, dass DFF45 die Nuklease nicht mehr inhibieren kann.

Aus diesen Ergebnissen kann bis jetzt nur geschlossen werden, dass der Aminosäurerest-Austausch bei den CAD-Varianten E284A, V285A und N286D im Bereich des *loops* zwischen den α -Helices 7 und 8 und der Austausch bei den CAD-Varianten I322T, Y323A und R324A im C-terminalen *loop* der Nuklease Einfluss auf die Interaktion zwischen Nuklease und Chaperon hat. Die CAD-Variante E284A zeigt gleichermaßen innerhalb der generierten CAD-Varianten die höchste Spaltaktivität, aber auch eine instabile Bindung zu DFF45. Somit ist der Aminosäurerest E284 zwar wichtig für die Bindung von DFF45, hat aber innerhalb des Moleküls einen geringeren Einfluss auf die Stabilisierung der Nuklease.

Ob der Einfluss auf die Spaltaktivität auch auf den Aminosäurerest-Austausch zurückzuführen ist, der zu einem funktionslosen aktiven Zentrum führt oder ob die geringe Spaltaktivität auf ein verringertes DNA-Bindevermögen zurückzuführen ist, kann mit diesen Ergebnissen jedoch nicht beantwortet werden. Deshalb wird das DNA-Bindevermögen der CAD-Varianten und des Wildtyps mittels DNA-Bindungsassay überprüft.

4.1.3 DNA-Bindungsverhalten der CTR-Varianten

Damit die nukleolytische Untereinheit des rekombinanten DFF-Komplexes DNA spalten kann, muss das Enzym DNA binden können. Diese Interaktion kann mittels eines sogenannten DNA-Bindungsassays überprüft werden (s. 2.6.2). Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl freie Nuklease als auch die Nuklease im Komplex DNA binden kann⁶⁷. In der vorliegenden Arbeit wurde diese DNA-Enzym-Interaktion der rekombinanten DFF-Komplexe untersucht. Keine der CAD-Varianten zeigt eine gleich starke DNA-Bindung wie

der Wildtyp, bei dem die DNA vollständig gebunden ist und dadurch eine elektrophoretische Mobilitätsänderung erfährt. Von den hergestellten Varianten besitzen GST-CAD E284A und GST-CAD N286D noch die stabilste DNA-Bindung, wohingegen die anderen vier Varianten GST-CAD V285A, GST-CAD I322T, GST-CAD Y323A und GST-CAD R324A nur ein sehr schwaches DNA-Bindungsvermögen aufweisen und ein Großteil an DNA ungebunden vorliegt (s. 3.1.7). Auch bei diesen Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass das reduzierte DNA-Bindungsvermögen aufgrund ungleicher CAD-Konzentrationen resultierte. Denn je geringer die eingesetzte Nuklease-Konzentration ist, desto weniger DNA kann gebunden werden, wie man auch anhand Abb. 3.8 erkennen kann.

Bei der Interpretation der Ergebnisse des DNA-Bindungsassays (s. Abb. 3.8) muss beachtet werden, dass eine Mobilitätsänderung der DNA im Agarosegel nur beobachtbar ist, wenn ein ausgewogenes Verhältnis zwischen DNA-Größe und Proteinkonzentration besteht. Ist dieses nicht gegeben, so kann die Bindung der Proteine an die DNA nicht durch ein verändertes Laufverhalten der Nukleinsäure im Gel analysiert werden. Da nach affinitäts- und anionenaustauschchromatographischer Proteinreinigung (s. 3.1.4.1 und 3.1.4.2) die rekombinanten DFF-Komplexe nicht in ausreichend hoher Konzentration vorlagen, konnten diese nur in geringer Konzentration eingesetzt werden. Normalerweise wird bei DNA-Bindungsassays versucht zuvor über Titration das richtige Proteinkonzentration:DNA-Größenverhältnis zu bestimmen, um einen besseren DNA-*Shift* zu erzielen.

Offensichtlich reduziert ein einziger Aminosäurerest-Austausch in der Nuklease die Interaktionsregion zwischen CAD und DFF45 so, dass die Stabilität des DFF-Komplexes stark reduziert ist und er schon während der Reinigung über die Anionenaustauschchromatographie zerfällt. Da allerdings die Aminosäurereste ²⁸⁴EVN²⁸⁶ und ³²²IYR³²⁴ nicht direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind, kann man vermuten, dass die verringerte DNA-Bindung durch eine verstärkte Instabilität der Nuklease hervorgerufen wird.

Somit konnte in diesem Teil der Arbeit eine Region innerhalb von CAD identifiziert werden, die zum einen für die Stabilität der Nuklease von großer Bedeutung ist und zum anderen eine Interaktionsregion mit dem Chaperon darstellt. Da die drei Aminosäuren ³²²IYR³²⁴ durch Vorhersagen mehrerer Prädiktoren (s. Abb. 3.1) in einer intrinsisch ungefalteten Region (IUR) liegen (s. Abb. 3.2), kann man ebenfalls davon ausgehen, dass diese Region die Mitwirkung eines Faltungshelfers benötigt und somit für die Chaperonaktivität des Inhibitors wichtig ist.

4.2 Generierung künstlicher CAD-Heterodimere

Dieser Teil der Arbeit wurde durchgeführt, um den Mechanismus der DNA-Spaltung durch die Nuklease CAD genauer analysieren zu können. Es sollte eine künstliche

CAD-Heterodimerisierung von verschiedenen fusionierten DFF-Untereinheiten hervorgerufen werden, um letztendlich durch die Spalteigenschaft dieser CAD-Heterodimere darüber Aufschluss zu erhalten (s. Abb. 3.12).

Wie bereits erwähnt, konnte durch Untersuchungen gezeigt werden, dass es neben dem katalytischen Zentrum in CAD ein weiteres Motiv gibt, das für die DNA-Bindung verantwortlich ist, und zwar die α -Helix 4⁶⁷. Beide DNA-Bindedomänen befinden sich in der C3-Domäne, die das „scherenförmige“ aktive Zentrum (s. 1.2.1, Abb. 1.4) bilden, in welchem die chromosomale DNA nukleolytisch gespalten wird. Das katalytische Zentrum kann mit dem $\beta\beta\alpha$ -Me-Finger-Motiv unspezifisch über die kleine Furche mit der DNA interagieren, wohingegen die α -Helix 4 über die große Furche Kontakte zur DNA knüpft und somit für eine stabile DNA-Bindung sorgt. Demzufolge weist ein CAD-Protomer zwei wichtige Domänen für DNA-Bindung (α -Helix 4) und -Spaltung (katalytisches Zentrum) auf. Da nun bekannt ist, dass funktionelles CAD als Dimer aktiv ist, sollte hier untersucht werden, welche Domänen miteinander interagieren. Ist eine Dimerisierung von CAD notwendig, da das katalytische Zentrum des einen Protomers mit dem DNA-Bindemotiv des anderen Protomers zusammenarbeitet, oder ist es ausreichend, wenn die DNA-Bindung und -Spaltung von einem Protomer vollzogen wird? Um diese Frage beantworten zu können, wurden verschiedene fusionierte CAD-Varianten in HEK293T-Zellen exprimiert, über die jeweiligen Fusionen gereinigt und anschließend in Koimmunopräzipitationsversuchen (IPs) eingesetzt.

4.2.1 Koimmunopräzipitationsversuche

Nachdem die jeweiligen Fusionsproteine (s. Tabelle 2.10, Ansätze 1-3) in eukaryotischen Zellen exprimiert und anschließend über FLAG- bzw. HA-tag gereinigt wurden, folgte eine Inkubation der Proteine, wodurch eine Heterodimerisierung von CAD resultieren sollte. Die Ergebnisse, die mit Hilfe eines Western Blots analysiert wurden, zeigen, dass zunächst die Expression der DFF-Komplexe erfolgreich war (s. Abb. 3.10). Es konnten sowohl der CAD-FLAG/DFF45-Komplex als auch der CAD-HA/DFF45-Komplex exprimiert und gereinigt werden. Allerdings konnten im darauffolgenden Schritt keine Heterodimere von CAD erhalten werden. Es wurden lediglich die CAD-Varianten detektiert, die den zur Reinigung verwendeten tag enthielten.

Es lässt sich nicht genau sagen, welchen Einfluss der tag auf die Struktur von CAD hat und ob durch ihn die Dimerisierung von CAD abgeschwächt wurde. Doch da der jeweilige tag N-terminal an CAD fusioniert wurde und sich somit in der C3-Domäne befindet, sollte dies keinen Einfluss haben, da für die Dimerisierung der beiden CAD-Protomere die C2-Domäne verantwortlich ist. Das Scheitern der Heterodimerisierung könnte allerdings an einem schnellen Austausch der Untereinheiten liegen. Möglicherweise bilden sich die

CAD-Heterodimere so schnell, um gleich darauf wieder zu zerfallen und können somit nicht in einer stabilen Form gereinigt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es aufgrund fehlerhafter Konstrukte nicht möglich war, CAD-Heterodimere zu generieren. Um dies ausschließen zu können, wurden in weiteren Untersuchungen zum einen neu generierte CAD-Varianten eingesetzt und zum anderen eine Koexpression der DFF-Komponenten durchgeführt.

Im nächsten Teil wurden, wie oben bereits erwähnt, neu generierte CAD-Varianten (s. Tabelle 2.10, Ansätze 4-6) auf unterschiedliche Weise in HEK293T-Zellen exprimiert. Einerseits wurden die DFF-Komplexe zunächst getrennt voneinander (CAD-FLAG/DFF45 und CAD-HA/DFF45 jeweils einzeln) in unterschiedlichen Gewebekulturschalen exprimiert und darauffolgend nach Zellaufschluss zusammen inkubiert. Andererseits wurden beide Nukleasen mit dem Inhibitor in einer Gewebekulturschale koexprimiert, um CAD-Heterodimere zu erhalten. Des Weiteren wurden verschiedene Ansätze untersucht in denen eine CAD-Variante mit zwei DFF45-Varianten ko-/exprimiert wurde oder auch nur zwei verschieden fusionierte Inhibitoren exprimiert wurden. Nach der jeweiligen Reinigung der Protein-Komplexe (s. Tabelle 2.10, Ansätze 4-6) wurden die erhaltenen Eluate auf SDS-Gele aufgetragen und mit Hilfe von Western Blots das Ergebnis analysiert. Sowohl bei Expression der Proteine in zwei Gewebekulturschalen als auch bei Koexpression in einer Gewebekulturschale ist keine Heterodimerisierung von CAD zu erkennen. Demzufolge besteht kein Unterschied, ob die Proteine erst nach Expression zusammen inkubiert oder koexprimiert wurden. Folglich kann man nicht genau sagen, ob sich bei einer „getrennten“ Expression der DFF-Komplexe Homodimere von CAD bilden und es deshalb nicht möglich ist, CAD-Heterodimere zu erhalten. Denn bei einer Koexpression der DFF-Komplexe konnten ebenfalls keine Heterodimere erhalten werden. Es besteht also weiterhin die Frage, warum die unterschiedlich fusionierten CAD-Varianten nicht dimerisieren und somit ein Heterodimer bilden. Wie oben schon genannt, könnte es der Fall sein, dass entstehende Nuklease-Heterodimere nur eine kurze Lebensdauer aufweisen, und nachdem sie sich gebildet haben, gleich wieder in ihre Untereinheiten zerfallen und deshalb nicht zu reinigen sind.

Mit diesen Versuchen konnte zwar kein CAD-Heterodimer erhalten und gereinigt werden, allerdings gab es Aufschluss in Bezug auf den Inhibitor DFF45. Man kann beobachten, dass es zu einer Dimerisierung der beiden Inhibitor-Untereinheiten kommen kann, jedoch nur, wenn diese koexprimiert wurden. Dass DFF45 nicht nur mit CAD Heterodimere bilden kann, sondern auch *in vitro* und in Zellen Homooligomere bildet, war bereits bekannt⁴⁷. Ebenso wie die Tatsache, dass in Anwesenheit von CAD der Inhibitor DFF45 Homodimere bildet⁶⁵. Im Gegensatz dazu konnte jedoch hier gezeigt werden, dass auch in Abwesenheit von CAD DFF45 dimerisiert (s. Abb. 3.11; 1, 3. Spur). Allerdings wird die Dimerisierung der beiden

DFF45-Untereinheiten durch die Anwesenheit von CAD verstärkt (s. Abb. 3.11; 1, 2. Spur). Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass es sich bei einem DFF-Komplex zumindest um einen trimären Komplex bestehend aus einer Nuklease und zwei Inhibitoren handelt. Diese Annahmen werden auch von frühen Untersuchungen bestärkt, die einen Überschuß an DFF45 innerhalb eines exprimierten DFF-Komplexes zeigen und somit einen trimären DFF-Komplex befürworten würden²⁷.

In diesem Teil der Arbeit war es nicht möglich CAD-Heterodimere zu erhalten bzw. diese zu reinigen. Deshalb wurde daraufhin der Versuch unternommen die Heterodimerisierung von CAD zu erzwingen.

4.3 Forcierte Heterodimerisierung von CAD-Protomeren

Da es mit Hilfe der vorangegangenen Untersuchungen nicht möglich war, Heterodimere der Nuklease CAD zu exprimieren und zu reinigen, wurde letztendlich die Dimerisierung von CAD forciert. Denn sollte es der Fall sein, dass CAD instabile Heterodimere bildet, die nach der Bildung gleich wieder zerfallen, könnte eine solche Forcierung dieses Problem beseitigen.

Die erzwungene Heterodimerisierung sollte mit einem System erfolgen, das dies mit Hilfe zweier Plasmide, pC₄-EN-F1 und pC₄-R_HE (s. 2.2.3), bewerkstelligen sollte. Beide Plasmide enthalten jeweils ein Gen, das zum einen für FKBP12 und zum anderen für eine einzelne Kopie des modifizierten FRB_{2098L} (R_H) kodiert. Durch die Zugabe eines Rapamycin-Analogs (AP21967) werden somit beide Proteine gezwungen Dimere, in diesem Fall Heterodimere zu bilden. Demzufolge wurde zu Beginn das Gen, das für CAD kodiert mit einem zusätzlichen *tag* (FLAG, HA, Strep) in die jeweiligen Plasmide kloniert und zunächst in HEK293T-Zellen auf Expression getestet. Nach erfolgreicher Expression und Reinigung der CAD-Heterodimere sollte ein Nuklease-Aktivitätsassay folgen um letztendlich Auskunft zu erhalten, ob für die nukleolytische Spaltung der DNA eine Dimerisierung von CAD notwendig ist oder ob auch ein CAD-Protomer ausreichend ist.

4.3.1 Expression und Reinigung der CAD-wt-Varianten

Nachdem zunächst unterschiedlich fusionierte CAD-Varianten mit dem Inhibitor DFF45 in HEK293T-Zellen erfolgreich exprimiert wurden, erfolgte anschließend die Reinigung der Proteine über die jeweiligen *tags*, die ebenfalls erfolgreich war (s. Abb. 3.13). Es konnte allerdings beobachtet werden, dass im Gegensatz zu CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA-Strep, das dritte Protein CAD-wt-HA zwar gut exprimiert wurde, jedoch nach der Reinigung kaum Protein gegenwärtig war. Dies ist mit einer schlechten Bindung der Proteine an die HA-*beads* zu begründen, da im Zellextrakt (ZE) noch relativ viel CAD-wt-HA

(verglichen mit den anderen CAD-Varianten) vorhanden war. Deshalb ist es möglich, dass die HA-fusionierten Nukleasen nur schlecht an die HA-*beads* gebunden hatten oder dass die Bindung nicht effizient genug war und die Proteine beim Waschvorgang von den *beads* gewaschen wurden. Aufgrund dessen wurden für die weiteren Versuche die folgenden Plasmide eingesetzt, pC₄-EN-F1-CAD-wt-HA-FLAG und pC₄-R_HE-CAD-wt HA-Strep.

4.3.2 Doppel-Affinitätsreinigung

Nach erfolgreicher Expression der beiden CAD-Varianten CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA-Strep folgte eine Doppel-Affinitätsreinigung (s. 3.3.3), um mit Hilfe der beiden verschiedenen Fusionen (FLAG- und Strep-*tag*) die entstandenen CAD-Heterodimere von Homodimeren zu trennen.

Die Expression der beiden CAD-Varianten erfolgte sowohl in An- als auch in Abwesenheit von AP21967 gut (s. Abb. 3.14), jedoch konnten die vermeintlichen Heterodimere nicht gereinigt werden.

Das Scheitern dieser Doppel-Reinigung könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte die Interaktion zwischen den beiden Protomeren zu gering sein, um gereinigt zu werden, so dass der Komplex, gebunden an HA-*beads*, auseinandergerissen wird. Es könnte allerdings auch sein, dass durch die *tags* die Bindung an die HA-*beads* beeinträchtigt wurde und es deshalb nicht möglich war, die entstandenen CAD-Heterodimere zu reinigen.

4.3.3 Nuklease-Aktivitätsassay

CAD erzeugt in seiner Wildtyp-Form einen Doppelstrangbruch, da beide katalytischen Zentren und beide Bindedomänen des Homodimers intakt sind. Deshalb sollte bei einem forcierten Heterodimer die Plasmid-DNA komplett gespalten werden. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn man Abb. 3.15 betrachtet. Es ist zwar zu erkennen, dass es nur bei Caspase-3-Aktivierung zu einer schwachen Spaltung der DNA kam, jedoch nur anhand der Tatsache, dass die Menge an linearer DNA zunimmt. Interessant ist allerdings, dass nach der zweiten Reinigung über Strep-*tag* die Plasmid-DNA gespalten wird, obwohl im Western Blot kein Protein nachgewiesen werden konnte; ebenso nach der ersten Reinigung über Strep-*tag*. Hier erkennt man auch eine schwache Bande linearer DNA, wohingegen im Western Blot keine Nuklease detektiert werden konnte. Wenn es sich nun um unspezifische Spaltung handeln würde, müssten auch die nicht aktivierten CAD-Varianten eine Spaltaktivität zeigen. Da dies aber nicht der Fall ist, kann man davon ausgehen, dass die DNA-Spaltung von CAD durchgeführt wurde. Es könnte auch sein, dass FLAG-fusioniertes CAD unspezifisch an Strep-Säulen binden konnte, somit fälschlicherweise eluiert wurde und nun eine Spaltaktivität aufweist. Wenn es sich hier um Heterodimere handelt, dann um keine

erzwungenen Heterodimere, da die Spalteigenschaft dieselbe war, egal ob in An- oder in Abwesenheit von AP21967.

Da anhand dieser Ergebnisse keine eindeutige Aussage gemacht werden konnte, wurden erneut Proteine exprimiert und zunächst untersucht, ob durch Zugabe von AP21967 eine Heterodimerisierung von CAD erzwungen werden kann.

4.3.4 Dimerisierungsversuch der neu generierten Konstrukte

Um eine Aussage über den Mechanismus der DNA-Spaltung durch CAD treffen zu können, wurden erneut neue CAD-Varianten untersucht. Nach Expression von CAD-wt-HA-FLAG und CAD-wt-HA und anschließender Proteinreinigung über FLAG-*tag* konnte das Ergebnis mittels Western Blot sichtbar gemacht. Wie man gut erkennen kann, wurde ohne Rapalog jeweils nur CAD-wt-HA-FLAG detektiert, wohingegen in Anwesenheit von AP21967 man deutlich zwei Banden beobachten kann, d.h. in diesem Fall wurden CAD-Heterodimere gereinigt (s. Abb. 3.16). Die Intensität der oberen Bande (CAD-wt-HA-FLAG) ist jedoch stärker im Vergleich zur Bande von CAD-wt-HA. Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass diese Proteine den für die Reinigung notwendigen *tag* enthalten und somit vielleicht auch Homodimere bestehend aus (CAD-wt-HA-FLAG)₂ gereinigt wurden, weshalb auch keine 1:1 Stöchiometrie der beiden CAD-Varianten erhalten wurde. Da dieser Versuch nur mit Wildtyp-CAD durchgeführt wurde, um zunächst zu testen, ob Heterodimere erhalten werden können, wurden in den darauffolgenden Versuchen CAD-Varianten eingesetzt, die ein oder zwei Aminosäurerest-Austausche aufweisen.

4.3.5 Forcierte CAD-Heterodimere

Da sowohl die Expression als auch die Reinigung der CAD-wt-Heterodimere erfolgreich war, konnte nun begonnen werden, mit den verschiedenen CAD-Varianten (s. Tabelle 2.12) Heterodimere zu forcieren. Es wurden im Vorfeld sechs verschiedene CAD-Varianten generiert, in denen entweder ein oder zwei Aminosäurereste ausgetauscht wurden. Somit wurden CAD-Varianten hergestellt, die entweder in der DNA-Bindedomäne, im katalytischen Zentrum oder in beiden Domänen einen Austausch enthielten (s. 3.3.1; Abb. 3.12). Durch Koexpression dieser CAD-Varianten mit einer CAD-wt-Variante können Heterodimere erhalten werden, bei denen in einem Protomer das katalytische Zentrum, die DNA-Bindedomäne oder beide Domänen inaktiv sind, und somit im Gegensatz zum CAD-wt-Heterodimer eine veränderte Spaltung der DNA zeigen.

Man kann deutlich erkennen, dass im Zellextrakt des CAD-wt-Dimers und des CAD-wt-HA-FLAG/CAD-H263N-HA-Heterodimers beide CAD-Protomere gleich stark exprimiert wurden und somit ein 1:1 Verhältnis vorliegt (s. Abb. 3.17; oben). Diese Stöchiometrie geht allerdings

nach der Reinigung verloren, wie man in der Abbildung darunter erkennen kann. Bei den restlichen Heterodimeren war dies nicht der Fall, da hier mehr HA-fusioniertes Protein exprimiert wurde, wobei nach der Reinigung mehr FLAG-fusioniertes Protein vorhanden war. Die unterschiedliche Expressionsstärke könnte daran liegen, dass im Allgemeinen die Expressionsrate verschiedener Proteine auch unterschiedlich ist und nicht alle Proteine in bestimmten Zelllinien gleich stark exprimieren. Der Grund für die große Menge an gereinigtem FLAG-fusioniertem CAD besteht darin, dass zum einen über diesen *tag* gereinigt wurde und zum anderen, dass wahrscheinlich die Heterodimerisierung nicht stark genug war, die Heterodimere während der Reinigung dissoziierten und somit nur die FLAG-fusionierten CAD-Varianten gereinigt werden konnten.

Um das Problem der unterschiedlichen Stöchiometrie in der Expression der einzelnen CAD-Varianten zu lösen, wurde in einem darauffolgenden Versuch die Menge an Plasmid, das in die Zellen transfiziert wird, angeglichen. Jedoch konnte auch dieses, außer beim CAD-wt-HA-FLAG/ CAD-H263N-HA-Heterodimer, keine 1:1 Stöchiometrie der CAD-Varianten erhalten werden. Im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch konnte aber eine größere Menge an CAD-Heterodimeren gereinigt werden, wobei die Menge an FLAG-fusionierten CAD-Varianten erneut überwog. Auch in diesem Fall ist es möglich, dass die starken Banden (FLAG) von CAD-HA-FLAG-Homodimeren verursacht wurden.

Zuletzt wurden die Eluate in einem Nuklease-Aktivitätsassay eingesetzt, um eine bessere Einsicht in den DNA-Spaltmechanismus der Nuklease CAD zu bekommen.

4.3.6 Nuklease-Aktivitätsassay

Die zuvor erhaltenen CAD-Heterodimere wurden schließlich in Nuklease-Aktivitätsassays eingesetzt, um durch die Spaltergebnisse eine Aussage über das Spaltverhalten von CAD machen zu können. Eine vollständige Spaltung der eingesetzten Plasmid-DNA ist zwar in keinem der Ansätze zu sehen, jedoch zeigen alle CAD-Heterodimere eine Vermehrung von *open circle* DNA (s. Abb. 3.18). Dies ist allerdings auch der Fall, wenn zuvor keine Caspase-3-Aktivierung statt fand, was bedeutet, dass überall eine unspezifische DNA-Spaltung zu sehen ist. Nur das CAD-wt-Heterodimer und das CAD-wt-HA-FLAG/CAD-H263N-HA-Heterodimer zeigen eine leichte Spaltaktivität, die anhand der Anhäufung von linearer DNA zu erkennen ist.

Das Spaltverhalten dieses Heterodimers, das einen Aminosäurerest-Austausch (H263N) im katalytischen Zentrum aufweist und somit nur ein funktionelles aktives Zentrum besitzt, zeigt, dass ein katalytisches Zentrum für die DNA-Spaltung völlig ausreichend ist, wohingegen die Anwesenheit zweier DNA-Bindungsmotive notwendig ist. Dies bestätigt auch das Ergebnis des CAD-wt-HA/CAD-R168A-HA-FLAG-Heterodimers, denn in diesem Fall sind beide katalytischen Zentren funktionstüchtig, aber eine der beiden DNA-Bindedomänen ist durch

einen Aminosäurerest-Austausch inaktiviert. Da sich hier keine DNA-Spaltung beobachten lässt, kann davon ausgegangen werden, dass demzufolge CAD dimerisieren muss, da für eine erfolgreiche DNA-Spaltung zwar ein katalytisches Zentrum ausreicht, aber beide DNA-Bindedomänen funktionstüchtig sein müssen.

Es könnte zwar auch der Fall sein, dass es sich bei den eingesetzten Heterodimeren um CAD-wt-Homodimere handelt und deshalb eine DNA-Spaltung resultierte, jedoch sollte dann im Fall des CAD-wt-HA/CAD-R168A-HA-FLAG-Heterodimers ebenfalls eine Spaltung der DNA zu sehen sein, wenn CAD-wt-Homodimere gereinigt wurden, was jedoch nicht der Fall ist.

Nach diesen Experimenten konnte letztendes ein Ergebnis erzielt werden, das den Mechanismus der DNA-Spaltung durch die Nuklease CAD besser beschreibt. Somit muss eine Dimerisierung von CAD erfolgen, da beide DNA-Bindemotive für eine DNA-Spaltung benötigt werden, jedoch nur ein katalytisches Zentrum ausreichend ist.

4.4 Der induzierte proteasomale Abbau von DD-DFF-Komplexen

Der DNA-Fragmentierungsfaktor DFF besteht im inhibierten Zustand als Komplex aus der Nuklease CAD (DFF40) und dem Inhibitor bzw. Chaperon ICAD-L (DFF45). Wird dieser Komplex durch Caspase-3 aktiviert, indem ICAD-L gespalten wird und von der Nuklease dissoziiert, ist CAD aktiv und nun in der Lage DNA nukleolytisch zu spalten. Allerdings ist dieser Vorgang irreversibel, d.h. wenn durch ein apoptotisches Signal die Caspase-Kaskade ausgelöst wird (s. 1.1.1) und demzufolge CAD aktiviert wird, erfolgt die DNA-Spaltung. Wenn es nun möglich wäre diese beiden Vorgänge, das Aktivieren des Komplexes durch Inhibitor-Spaltung und die Nuklease-Aktivität selbst, zu kontrollieren, könnte man in bestimmten Zellen künstlich Apoptose hervorrufen und die DNA-Spaltung regulieren.

Hier wurde nun mit einem speziellen System versucht, dies zu erreichen. Das verwendete Proteo TunerTM System (Clontech) beinhaltet neben einem Vektor (pPTuner, s. 2.2.3), der eine FKBP (L10P) Destabilisierungsdomäne (DD) enthält, einen Stabilisierungsliganden *Shield1*. Die cDNAs für CAD bzw. DFF45 wurden folglich mit Hilfe des pPTuner Vektors kloniert, wodurch nach Transfektion von HEK293T-Zellen ein DD-fusioniertes Protein exprimiert werden konnte. Die DD bewirkt eine schnelle Degradation des DD-Proteins, wohingegen in Anwesenheit des Stabilisierungsliganden *Shield1* das DD-Protein stabilisiert wird und somit die Proteinmenge reguliert werden kann (s. Abb. 4.1).

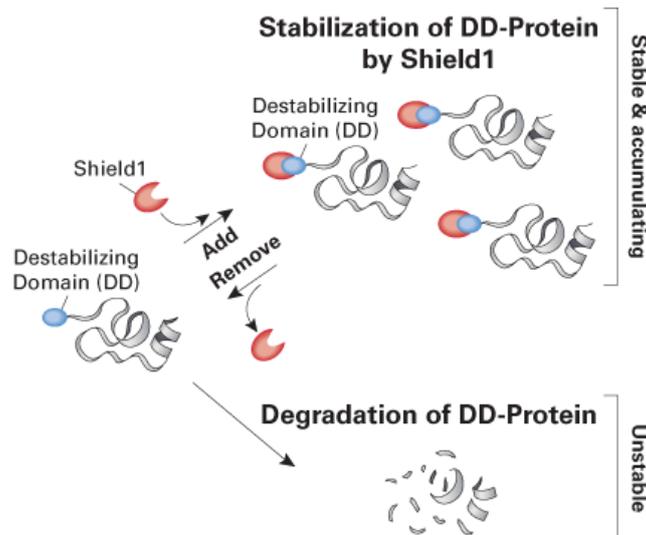


Abb. 4.1: Ligand-abhängige, gezielte und reversible Protein-Stabilisierung. Eine kleine Destabilisierungsdomäne (DD; blau) ist an das zu untersuchende Protein fusioniert. Der kleine Membran-permeable Ligand *Shield1* (rot) bindet an DD und schützt damit das Protein vor proteasomalem Abbau. Wird *Shield1* entfernt, kommt es zu einem schnellen Abbau des gesamten Fusionproteins (ProteoTuner™ Systems User Manual).

4.4.1 Induzierter proteasomaler Abbau von CAD/DD-DFF45

Zunächst wurde nur der Inhibitor DFF45 auf seine Eigenschaft bezüglich des proteasomalen Abbaus untersucht. In Anwesenheit von *Shield1* ist zu erkennen, dass bei beiden DD-fusionierten Proteinen, sowohl DFF45 als auch CAD, der Komplex stabilisiert vorliegt und demzufolge keine Degradation erfolgte (s. Abb 3.19). Im Gegensatz dazu kann in Abwesenheit des Liganden kein Protein mehr detektiert werden, weder DD-DFF45 noch CAD. Dieses Ergebnis korreliert auch mit den Resultaten von Untersuchungen, die mit Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) durchgeführt wurden⁷². Hier wurden ZFN ebenfalls mit einer DD fusioniert, wodurch das Expressionslevel der ZFN reguliert werden konnte. Somit konnte eine hohe Rate an *gene targeting* gewährleistet werden, während die Toxizität verringert wurde.

Im Fall von DD-DFF45 war die Degradation vorhersehbar, da dieses Protein die DD aufweist und somit ohne stabilisierenden Liganden proteasomal abgebaut wird. Allerdings ist es interessant, dass auch CAD degradiert wird, da dieses keine DD enthält. Man kann davon ausgehen, wenn im DFF-Komplex der Inhibitor eine DD-Fusion besitzt und somit der proteasomale Abbau dieses Proteins vorprogrammiert ist, die Nuklease ebenfalls abgebaut wird. Wie man allerdings anhand der weiteren Ansätze, bei denen das Ligand-enthaltende Medium nach unterschiedlichen Zeitpunkten entfernt und durch normales Medium ersetzt wurde, erkennen kann, erfolgt der Abbau des Inhibitors schneller als der Abbau der Nuklease. Dies kann damit erklärt werden, dass der Inhibitor auch die DD enthält und somit

für die Degradation „gekennzeichnet“ wurde. Es ist allerdings auch möglich, dass es sich nicht um einen Abbau von CAD handelt, sondern dass keine Nuklease gebildet werden kann. Das zu Beginn exprimierte Chaperon kann zwar noch einer sehr geringen Menge an CAD zur korrekten Faltung verhelfen, sobald jedoch DFF45 durch Proteasomen abgebaut wird, fehlt diese Chaperonfunktion und die Bildung von CAD wird demzufolge gestoppt.

Da in diesem Versuch zwei Western Blots notwendig waren, um die Ergebnisse zu analysieren, wurden für den nächsten Versuch neue Konstrukte generiert, die eine Quantifizierung vereinfachen sollten.

4.4.2 Proteasomaler Abbau von DD-CAD/DFF45 und CAD/DD-DFF45

Da bisher nur der induzierte proteasomale Abbau eines DFF-Komplexes bestehend aus CAD und DD-DFF45 untersucht werden konnte, wurde daraufhin ebenfalls ein DD-CAD-Konstrukt generiert, mit dessen Hilfe die Degradation bezüglich der Nuklease getestet werden sollte.

Obwohl die eukaryotischen Zellen jeweils mit der gleichen Menge an Plasmid (CAD/DFF45) transfiziert wurden, zeigte sich eine stark unterschiedliche Expression der beiden Proteine. Im Fall der Koexpression von DD-DFF45 und CAD (s. Abb. 3.20, unten) konnte man wie im vorherigen Versuch eine Abnahme von CAD erkennen, was entweder durch Abbau der Nuklease oder vielmehr durch geringere CAD-Bildung resultiert (s. 4.4.1). Eine Abnahme von DD-DFF45 ist zwar nur zu erahnen, da die Menge an exprimiertem Inhibitor zu groß war, um einen Unterschied zu erkennen. Doch da DFF45 an DD fusioniert ist, muss es zu einem proteasomalen Abbau des Inhibitors führen. Auffällig ist allerdings, dass in Abwesenheit von *Shield1* relativ viel DD-DFF45 zu sehen ist, was einmal durch dessen langsamen Abbau, aber auch durch starke Expression zustande kommt. Denn obwohl versucht wurde mittels geringerer Gendosis das Expressionslevel von DD-DFF45 zu reduzieren, konnte dies nicht erreicht werden. Auch die *loading control* zeigt, dass die Abnahme nicht auf einen Fehler in der Durchführung zurückzuführen ist, da die Detektion von Actin relativ gleichmäßig ist. Betrachtet man die Kontrolle, in der nur CAD exprimiert wurde, fällt auf, dass die Nuklease allein nicht exprimiert werden konnte und somit nicht genügend endogenes DFF45 bereits in den Zellen vorhanden ist, um dies zu gewährleisten.

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit den Ergebnissen, die aus den Versuchen mit DD-CAD/DFF45 resultierten, kann man sehen, dass es auch hier zu einer Abnahme von CAD kam, die allerdings schwer zu erkennen ist (s. Abb. 3.20, oben). Es ist auch hier zu beobachten, dass zum einen in Abwesenheit von *Shield1* eine große Menge an DFF45 detektiert wurde und zum anderen, dass bei gleicher Plasmidmenge, mit denen die Zellen transfiziert wurden, die beiden Proteine (DD-CAD/DFF45) stark unterschiedliche Expression zeigen. Der proteasomale Abbau des DD-CAD ist eine Folge der DD-Fusion (s.o.). Jedoch

kann auch in diesem Fall keine Degradation des Inhibitors detektiert werden, da die exprimierte Proteinmenge zu groß ist, um einen Unterschied zu erkennen. Wie bereits im vorherigen Versuch zeigt sowohl die *loading control* eine relativ gleichmäßige Verteilung der Proben als auch die Kontrolle mit einzeln exprimiertem DD-CAD keinerlei Proteinbanden.

Anhand dieser Versuche kann man davon ausgehen, dass in einem DFF-Komplex in dem DFF45 an die Destabilisierungsdomäne DD fusioniert wird, der Inhibitor proteasomal abgebaut wird. Die Expression der Nuklease wird wiederum stark reduziert, da kein Faltungshelfer mehr vorhanden ist. Im Gegensatz dazu kann man bei einem DFF-Komplex, bestehend aus DD-CAD/DFF45, lediglich sagen, dass die Nuklease degradiert wird. Bezüglich des Inhibitors kann ein Abbau nur erahnt werden, da die exprimierte Proteinmenge zu groß ist.

Um dies jedoch besser zeigen zu können, erfolgte die Visualisierung dieser Ergebnisse mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen.

4.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des proteasomalen Abbaus von DD-DFF-Komplexen

Um den proteasomalen Abbau der DD-DFF-Komplexe besser sichtbar zu machen, wurden neue Konstrukte generiert, die zusätzlich ein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-Fusionsprotein enthielten.

In beiden Kontrollen (CAD/EGFP-DFF45 und EGFP-CAD/DFF45) kann man eine grüne Fluoreszenz beobachten, die allerdings im Fall von EGFP-DFF45 stärker ist als bei EGFP-CAD. Ist die destabilisierende Domäne DD mit CAD fusioniert und EGFP mit DFF45 so ist zu beobachten, dass in Anwesenheit von *Shield1* eine starke Fluoreszenz des Inhibitors zu erkennen ist. Wird dem Medium der Ligand entzogen, kommt es bei DD-CAD zu einem proteasomalen Abbau, der zwar nicht visuell jedoch mit Hilfe eines Western blots nachzuweisen ist (s.o.). Der Inhibitor erfährt zwar auch einen minimalen Abbau, wie man aufgrund verringerter Fluoreszenzstärke beobachten kann, allerdings weit weniger drastisch. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Vorhergehenden, da man auch hier kaum eine Degradation des Inhibitors nachweisen konnte, da die Menge an neu exprimiertem Inhibitor zu groß ist. Im Gegensatz dazu zeigt aber die andere DFF-Komplex Variante EGFP-CAD/DD-DFF45 ein anderes Ergebnis. In Anwesenheit von *Shield1* ist zwar ebenfalls Fluoreszenz erkennbar, doch nachdem auch hier dem Medium der Ligand entzogen wurde, ist diese Fluoreszenz verschwunden. Das bedeutet, wenn DFF45 an DD fusioniert ist und dadurch in Abwesenheit von *Shield1* durch Proteasen abgebaut wird, so wird die Nuklease CAD, die in diesem Fall mit EGFP fusioniert war, entweder ebenfalls abgebaut oder durch das Fehlen des Chaperons erst gar nicht gebildet.

Um diese Ergebnisse besser quantifizieren zu können, wurden pro *well* 120 Zellen gezählt und deren Fluoreszenzintensität bestimmt. Im Säulendiagramm (s. Abb. 3.22) kann man zwar nur einen kleinen Unterschied zwischen der leichten und mittleren Intensität der Fluoreszenz bezüglich An- und Abwesenheit von *Shield1* erkennen, doch wenn man die Balken der starken Fluoreszenzintensität betrachtet, sieht man einen deutlichen Unterschied. Im Fall des DD-CAD/EGFP-DFF45-Komplexes ist zu erkennen, dass ohne *Shield1* die Fluoreszenz und somit die Menge an exprimiertem EGFP-DFF45 verringert ist. Im Gegensatz dazu zeigt bei EGFP-CAD/DD-DFF45 das Entfernen des Liganden einen weitaus drastischeren Effekt. In diesem Fall zeigen weniger Zellen eine starke Fluoreszenz, was durch einen proteasomalen Abbau des Inhibitors und der damit reduzierten Expression der Nuklease erklärt werden kann.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Region identifiziert werden, die am C-Terminus der Nuklease CAD lokalisiert ist und möglicherweise als *chaperone target region* für den Inhibitor bzw. das Chaperon ICAD-L/DFF45 dient. Diese vermutlich intrinsisch unstrukturierte Region (IUR) übt eine intramolekulare Interaktion mit einem loop zwischen den α -Helices 7 und 8 aus. Um nun die Spaltaktivität einzelner CAD-Varianten besser charakterisieren zu können, sollte eine Kinetik durchgeführt werden, mit deren Hilfe sich die Unterschiede bezüglich Spaltaktivität zwischen Wildtyp und Variante genauer analysieren ließen. Eine weitere Idee wäre ein Peptid zu synthetisieren, welches dem C-terminalen loop von CAD entspricht und dieses hinsichtlich ICAD-L/DFF45-Bindung zu untersuchen. Würde das synthetisierte Peptid an den Inhibitor binden, wäre dies ein weiteres Indiz für die Interaktion der beiden DFF-Untereinheiten und dafür, dass es sich um eine mögliche *chaperone target region* handelt. Es wäre ebenfalls möglich CAD-Varianten zu generieren, die jeweils eine der drei Aminosäurereste ²⁸⁴EVN²⁸⁶ und ³²²IYR³²⁴ durch ein Cystein ersetzt hätten, wobei der Abstand der beiden Cysteine nicht zu groß sein darf. Denn durch milde Oxidation im Beisein geringer Mengen an DTT bildet sich zwischen diesen beiden Cysteinen eine Disulfidbrücke aus und vermittelt somit den Kontakt zwischen dem C-terminalen *loop* und dem *loop* zwischen den α -Helices 7 und 8. Wären diese CAD/DFF40- Varianten auch ohne Koexpression mit ICAD-L/DFF45 aktiv, würde die Vermittlung des Kontakts innerhalb der intramolekularen Interaktionsregion der Chaperonfunktion von ICAD-L/DFF45 entsprechen. Es wäre außerdem wünschenswert, einen CAD-Faltungsassay zu etablieren, mit dessen Hilfe man die Auswirkung der vermittelten Interaktion zwischen dem C-terminalen *loop* und dem *loop* zwischen den α -Helices 7 und 8 auf die Struktur der C3-Domäne mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersuchen kann. In Bezug auf den Inhibitor wäre es interessant

die Region innerhalb des Proteins zu lokalisieren, welche an die intramolekulare Interaktionsregion bindet. Dies ließe sich vermutlich durch C-terminale Deletionsvarianten von CAD/DFF40 untersuchen, da ab einer bestimmten Aminosäure wohl keine Interaktion mehr möglich ist.

Um einen Erfolg bezüglich der Generierung künstlicher CAD Heterodimere zu erlangen, gibt es mehrere Möglichkeiten, die in der Zukunft durchgeführt werden können. Eine Möglichkeit für die zukünftige Arbeit wäre die C-terminale Fusion der *tags* für die Reinigung von CAD, um eine mögliche Behinderung der Heterodimerisierung durch die N-terminalen *tags* zu umgehen. Zudem könnte anstelle der Generierung und Reinigung künstlicher Heterodimere durch eine Doppelaffinitätsreinigung auch ein *single chain* Protein erstellt werden, bei welchem die beiden Protomere über verschieden lange Linker-Regionen zu einem einzigen Protein verknüpft werden. Dies hätte den Vorteil, dass die Heterodimerisierung nicht erzwungen werden muss und zudem könnte die Reinigung über einen einzelnen *tag* erfolgen.

Für weitere Untersuchungen hinsichtlich des induzierten proteasomalen Abbaus des DFF-Komplexes wäre es interessant, inwiefern die DNA-Spaltaktivität der Nuklease beeinträchtigt ist. Denn durch die DD-Fusion an CAD ist die Nuklease in Anwesenheit des Stabilisierungsliganden (*Shield1*) zwar vor Degradation geschützt, aber wie verhält es sich mit der Nuklease-Aktivität? Ist es möglich, durch Entfernen und Zugabe des Liganden CAD „an- und auszuschalten“? Dies könnte mit einfachen Nuklease-Aktivitätsassay herausgefunden werden. Ebenso wäre es möglich, die Nuklease mit einem Inhibitor zu koexprimieren, der bspw. durch eine TEV (*tobacco etch virus*)-Spaltstelle aktivierbar ist. Somit könnte durch die Spaltung von TEV im Inhibitor ICAD-L/DFF45 der DFF-Komplex aktiviert und durch *Shield1* die Aktivität der Nuklease gesteuert werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen eine Region in der Nuklease CAD zu identifizieren, die intrinsisch unstrukturiert vorliegt, wichtig für die Stabilität der Nuklease ist und somit als eine potentielle *chaperone target region* für den Inhibitor DFF45 gesehen werden kann. Wie bereits zuvor bekannt war, benötigt CAD zur korrekten Faltung u.a. die Hilfe von DFF45, der neben der inhibitorischen Funktion auch eine Chaperonfunktion aufweist. Durch sogenannte Prädiktoren konnte im Vorfeld eine intrinsisch unstrukturierte Region (IUR) am C-Terminus der Nuklease vorhergesagt werden. Um diese Region deutlich eingrenzen zu können, wurden sechs CAD-Varianten generiert, die jeweils einen Aminosäurerest ausgetauscht haben. Die CAD-Varianten wurden nach erfolgreicher Expression über Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie gereinigt und schließlich in einem Nuklease-Aktivitätsassay und einem DNA-Bindungsassay eingesetzt, um die jeweilige Eigenschaft bezüglich des Aminosäureaustausches zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass zunächst die Stabilität der DFF-Komplexe stark reduziert war, da bereits während der Reinigung die Komplexe zerfielen und somit kaum noch Nuklease gereinigt werden konnte. Da in darauffolgenden Versuchen unterschiedliche CAD-Konzentrationen eingesetzt wurden, konnte demzufolge keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein AS-Austausch die DNA-Spalt- oder Bindungseigenschaft von CAD beeinflusst. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Aminosäurereste ³²²IYR³²⁴ im C-terminalen *loop* der C3-Domäne für die Stabilität der Nuklease und eine Interaktion zwischen Nuklease und Chaperon wichtig sind.

CAD liegt in nicht apoptotischen Zellen als heterodimerer Komplex mit dem Inhibitor DFF45 vor, der über eine Chaperonfunktion verfügt. Sobald durch ein apoptotisches Signal eine Enzymkaskade in Gang gesetzt wird und Caspase-3 den Komplex aktiviert, wird DFF45 gespalten und somit CAD aktiviert, das dann als Homodimer seine Nuklease-Aktivität ausübt. In dieser Arbeit sollten artifizielle Heterodimere von CAD generiert, exprimiert und gereinigt werden, um diese schließlich in Nuklease-Aktivitätsassays einsetzen zu können. Dies sollte Aufschluß über den Spaltmechanismus der Nuklease geben. Die Konstrukte konnten zwar erfolgreich generiert, exprimiert und gereinigt werden, jedoch konnten keine künstlichen Heterodimere von CAD erhalten werden. Im Gegensatz dazu zeigten aber die Koimmunopräzipitationsversuche andere interessante Ergebnisse. So konnte eine Dimerisierung der beiden Inhibitor-Protomere sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von CAD beobachtet werden, was für einen trimären DFF-Komplex (CAD/ICAD-L₂) sprechen würde. Nachdem diese Methode zur Generierung von CAD-Heterodimeren fehl schlug, wurde nun mit Hilfe eines Rapamycin-Analogs versucht eine Heterodimerisierung zu erzwingen. Dazu wurde CAD durch Verwendung von zwei speziellen Vektoren kloniert, mit deren Hilfe eine Dimerisierung zweier CAD-Proteine erzwungen

werden sollte. Auch in diesem Fall konnte eine erfolgreiche Generierung und Expression der Proteine verzeichnet werden. Allerdings konnte nach der Reinigung der Proteine nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich um CAD-Heterodimere handelt, was man schließlich auch im Nuklease-Aktivitätsassay beobachten konnte. Somit konnte in diesem Teil der Arbeit leider kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ergab die Untersuchung des DFF-Komplexes bezüglich des induzierten proteasomalen Abbaus. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proteine CAD und DFF45 mit einer destabilisierenden Domäne DD fusioniert, durch die eine schnelle Degradation erfolgt. In Anwesenheit eines Stabilisierungsliganden (*Shield1*) wird jedoch das DD-fusionierte Protein vor einem Abbau geschützt. Es konnte gezeigt werden, dass in einem CAD/DD-DFF45-Komplex der Inhibitor, der DD enthält, von Proteasen abgebaut wird. Die Nuklease wird aufgrund des fehlenden Chaperons nur noch in sehr geringen Mengen exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigt ein Komplex bestehend aus DD-CAD/DFF45 lediglich eine Degradation der Nuklease, die in diesem Fall DD besitzt. Ein Abbau des Inhibitors ist nur schwer zu erkennen, da die Expression von DFF45 zu stark war und demzufolge mehr Inhibitor nachgeliefert als abgebaut wurde. Somit konnte durch die Fusion von DD an CAD und die Zugabe von *Shield1* die intrazelluläre Nuklease-Konzentration reguliert werden.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	vollständiger Name	Abkürzung	vollständiger Name
Δ	delta	d.h.	das heißt
°C	Grad Celsius	DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Ω	Ohm	DMSO	Dimethylsulfoxid
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen	DNA	Desoxyribonukleinsäure
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
A	Alanin oder Ampere	ds	doppelsträngig
AAP	Agaroseauftragspuffer	DTT	1,4-Dithiothreitol
Abb.	Abbildung	E	Glutaminsäure
abs.	absolut	ECL	<i>enhanced luminol-based chemiluminescent</i>
<i>ad</i>	auffüllen auf	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>	EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
AP21967	Rapamycin-Analog	EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
Apaf-1	<i>apoptosis-activating factor 1</i>	EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
APS	Ammoniumperoxosulfat	Endo G	Endonuklease G
AS	Aminosäure	<i>et al.</i>	und andere
Asp	Asparaginsäure	etc.	et cetera
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	EtOH	Ethanol
bp	Basenpaare	F	Farad
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
bzw.	beziehungsweise	FasL	Fas Ligand
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>	FCS	Fötales Kälberserum
CHO	Chinese hamster ovary	g	Gramm oder
CIDE	<i>cell death-inducing DFF45-like effector</i>	G	Gravitationskonstante
cm	Zentimeter	Glycin	Glycin
CMV	Cyto-Megalie-Virus	GST	Glutathion-S-Transferase
CTR	<i>Chaperone target region</i>	h	Stunde
Cys	Cystein	H/His	Histidin
d	desoxy-	HA	Hämagglutinin
D	Asparaginsäure	HEK	<i>human embryo kidney</i>
DA	Dalton	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
DD	<i>Destabilization domain</i>	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor		
DFF40	40 kDa Untereinheit von DFF (Nuklease)		
DFF45	45 kDa Untereinheit von DFF (Inhibitor)		

Abkürzung	vollständiger Name	Abkürzung	vollständiger Name
Hsp	<i>heat shock protein</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
I	Isoleucin	RPMI	Roswell Park Memorial Institut
ICAD	Inhibitor von CAD	RT	Raumtemperatur
IP	Immunopräzipitation	s.	Siehe
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid	s.o.	siehe oben
IUR	Intrinsisch unstrukturierte Region	s.u.	siehe unten
k	Kilo- (10^3)	sc	<i>supercoiled</i>
l	Liter oder linear	SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
LAP	Laemmliigel-Auftragspuffer	sec	Sekunde
LB	Luria-Bertani (Medium)	t	Zeit
lin	linear	T	Temperatur oder Threonin
Mg ²⁺	Magnesium	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
n	nano- (10^{-9})	TBE	Tris-Borat-EDTA
N	Asparagin	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
NaAc	Natriumacetat	Tet	Tetracyclin
NaCl	Natriumchlorid	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
NaOH	Natriumhydroxid	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing factor</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
oc	<i>open circle</i>	Trp	Tryptophan
OD ^{xnm}	optische Dichte bei x nm Lichtwellenlänge	TSS	<i>transformation-storage-solution</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	Tyr	Tyrosin
PBS	Phosphate Buffered Saline	U	units
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline Tween-20</i>	u.a.	unter anderem
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	ü.N.	über Nacht
PEG	Polyethylenglycol	UV	Ultraviolett
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	V	Volt oder Valin
PI3P	Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat	Vol.	Volumen
PVDF	Polyvinylidenfluorid	W	Watt
R	Arginin	wt	Wildtyp
		Y	Tyrosin
		z.B.	zum Beispiel
		ZE	Zellextrakt

Als Dezimaltrennzeichen wird in dieser Arbeit ein Punkt verwendet. Aminosäuren werden mit den international üblichen Drei-Buchstaben- bzw. Ein-Buchstaben-Codes abgekürzt. Veränderte Enzym-Varianten werden nach folgendem Schema benannt: Alte Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code), Positionsnummer, neue Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code).

6.2 Pufferverzeichnis

Lösungen für mikrobiologische Arbeiten

- **LB-Medium**
10 g Caseinhydrolysat
5 g Hefextrakt
10 g NaCl
mit NaOH auf pH 7.5 einstellen
ad 1l H₂O
- **STE-Puffer**
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
- **TSS-Lösung**
LB-Medium mit:
40 % (w/v) PEG 6000
5 % (v/v) DMSO
50 mM MgCl₂
pH 6.0-6.5

Puffer für Gelelektrophoresen

- **Agaroseauftragspuffer (AAP)**
250 mM EDTA
25 % (w/v) Saccharose
1.2 % (w/v) SDS
0.1 % (w/v) Bromphenolblau
mit NaOH auf pH 8.0 einstellen
- **Coomassie-Färbelösung**
0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue-G25
2% (w/v) Phosphorsäure
5% (w/v) Aluminiumsulfat
10% (v/v) Ethanol
- **Laemmli-Auftragspuffer (LAP)**
160 mM Tris-HCl, pH 6.8
2 % (w/v) SDS
5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
40 % (v/v) Glycerin
0.1% (w/v) Bromphenolblau
- **Laemmli-Laufpuffer**
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
- **TBE-Puffer**
100 mM Tris, pH 8.3
100 mM Borsäure
2.5 mM EDTA
- **TPE-Puffer**
80 mM Tris-Phosphat, pH 8.0
2 mM EDTA

Puffer für Western blots

- **Blockpuffer**
4 % (w/v) Magermilch gelöst in TTBS
- **Transferpuffer**
50 mM Tris
40 mM Glycin
0.05 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Methanol
- **Waschpuffer (TTBS)**
100 mM Tris-HCl, pH 7.5
150 mM NaCl
0.1 % Tween 20

Reinigungspuffer für DFF

- **Aufschluss- und Waschpuffer**
20 mM HEPES, pH 7.4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 % Glycerin
5 mM DTT
0.01 % Tritron X 100
- **Dialysepuffer**
20 mM HEPES, pH 7.4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
- **Elutionspuffer**
20 mM HEPES, pH 7.4
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 % Glycerin
5 mM DTT
0.01 % Tritron X 100
20 mM Glutathion
10 % Glycerin
5 mM DTT
0.01 % Chaps

Puffer für MonoQ 5/5

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

Puffer für eukaryotische Zellen

- **Aufschluss- und Waschpuffer**
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent mit:
250 mM NaCl
1 mM DTT
- **Elutionspuffer**
Aufschluss- und Waschpuffer
mit dem jeweiligen Peptid

Puffer für Assays

- **Shiftpuffer**
20 mM HEPES, pH 7.4
2 mM EDTA
100 mM NaCl
10 % Glycerin
0.01 % Chaps
- **Spaltpuffer**
20 mM HEPES, pH 7.4
2 mM EDTA
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
10 % Glycerin
0.01 % Chaps

Allgemeine Puffer

- **Bradford-Puffer**
10 mM Tris pH 8.0
50 mM NaCl
- **PBS**
10 mM Na₃PO₄ * 2H₂O, pH7.4
1.7 mM KH₂PO₄
137 mM NaCl
2.7 mM KCl

7. Literaturverzeichnis

1. Kerr, J.F. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* **90**, 419-35 (1965).
2. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
3. Jacobson, M.D., Weil, M. & Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-54 (1997).
4. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-65 (1997).
5. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62 (1995).
6. White, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* **10**, 1-15 (1996).
7. Henke, K. & Eigsti, J. Self-annihilation: a cell's story of suicide. *Dimens Crit Care Nurs* **24**, 117-9 (2005).
8. Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-19 (2004).
9. Susin, S.A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-80 (2000).
10. Kihlmark, M., Imreh, G. & Hallberg, E. Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 3643-53 (2001).
11. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-6 (1980).
12. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-8 (2000).
13. Itoh, N. et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-43 (1991).
14. Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. & Krammer, P.H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* **127**, 15-20 (1994).
15. Green, D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1-4 (2000).
16. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922-33 (2001).
17. Nagata, S. Biddable death. *Nat Cell Biol* **1**, E143-5 (1999).
18. Daniel, P. Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren. (2002).
19. Samejima, K. & Earnshaw, W.C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 677-88 (2005).
20. Li, L.Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-9 (2001).
21. Shiokawa, D., Shika, Y. & Tanuma, S. Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity. *Biochem J* **376**, 377-81 (2003).
22. Widlak, P. & Garrard, W.T. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* **94**, 1078-87 (2005).
23. Liu, X. et al. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8461-6 (1998).
24. Enari, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
25. Sakahira, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J Biol Chem* **275**, 8091-6 (2000).
26. Sakahira, H. & Nagata, S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* **277**, 3364-70 (2002).

27. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-84 (1997).
28. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-9 (1998).
29. Thomas, D.A., Du, C., Xu, M., Wang, X. & Ley, T.J. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* **12**, 621-32 (2000).
30. Sharif-Askari, E. et al. 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 (2001).
31. Widlak, P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* **47**, 1037-44 (2000).
32. Lechardeur, D. et al. Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol* **150**, 321-34 (2000).
33. Korn, C. et al. Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *J Biol Chem* **280**, 6005-15 (2005).
34. Widlak, P. et al. The histone H1 C-terminal domain binds to the apoptotic nuclease, DNA fragmentation factor (DFF40/CAD) and stimulates DNA cleavage. *Biochemistry* **44**, 7871-8 (2005).
35. Ahn, J.Y. et al. Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol Cell* **18**, 435-45 (2005).
36. Woo, E.J. et al. Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell* **14**, 531-9 (2004).
37. Widlak, P., Li, P., Wang, X. & Garrard, W.T. Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem* **275**, 8226-32 (2000).
38. Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Benedict, M.A. & Nunez, G. Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J Biol Chem* **274**, 270-4 (1999).
39. Scholz, S.R. et al. The effect of ICAD-S on the formation and intracellular distribution of a nucleolytically active caspase-activated DNase. *Nucleic Acids Res* **30**, 3045-51 (2002).
40. Durrieu, F. et al. DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* **10**, 923-6 (2000).
41. Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Nunez, G. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* **17**, 2526-33 (1998).
42. Li, T.K. et al. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes Dev* **13**, 1553-60 (1999).
43. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L, and ICAD-S. *J Biol Chem* **274**, 15740-4 (1999).
44. Chen, D. et al. Characterization of the rat DNA fragmentation factor 35/Inhibitor of caspase-activated DNase (Short form). The endogenous inhibitor of caspase-dependent DNA fragmentation in neuronal apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 38508-17 (2000).
45. Masuoka, J., Shiraishi, T., Ichinose, M., Mineta, T. & Tabuchi, K. Expression of ICAD-L 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 (2001).
46. Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R.B. & Garrard, W.T. Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 26915-22 (2003).

47. Kanouchi, H., Nishizaki, H., Minatogawa, Y. & Tone, S. Large complex formation of the inhibitor of caspase-activated DNase. *Apoptosis* **10**, 651-6 (2005).
48. Fukushima, K. et al. Solution structure of the DFF-C domain of DFF45/ICAD. A structural basis for the regulation of apoptotic DNA fragmentation. *J Mol Biol* **321**, 317-27 (2002).
49. Slepnev, S.V., Patchen, B., Peterson, K.M. & Witt, S.N. Importance of the D and E helices of the molecular chaperone DnaK for ATP binding and substrate release. *Biochemistry* **42**, 5867-76 (2003).
50. Meiss, G., Gimadutdinov, O., Haberland, B. & Pingoud, A. Mechanism of DNA cleavage by the DNA/RNA-non-specific *Anabaena* sp. PCC 7120 endonuclease NucA and its inhibition by NuiA. *J Mol Biol* **297**, 521-34 (2000).
51. Kirsch, R.D. & Joly, E. An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res* **26**, 1848-50 (1998).
52. Korn, C., Scholz, S.R., Gimadutdinov, 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* **30**, 1325-32 (2002).
53. Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172-5 (1989).
54. Hames, B.D. & Rickwood, D. Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach. *Oxford University Press, New York* (1990).
55. Ausubel, F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, New York, N.Y., U.S.A.* (1989).
56. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
57. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).
58. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23 (1979).
59. Mullis, K.B., Ferré, F. & Gibbs, R.A. PCR-The Polymerase chain reaction. *Birkhäuser Boston* (1994).
60. Wallace, R.B. et al. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* **6**, 3543-3557 (1979).
61. Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**, 2411-23 (1995).
62. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
63. Neimanis, S., Albig, W., Doenecke, D. & Kahle, J. Sequence elements in both subunits of the DNA fragmentation factor are essential for its nuclear transport. *J Biol Chem* **282**, 35821-30 (2007).
64. Uversky, V.N., Oldfield, C.J. & Dunker, A.K. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J Mol Recognit* **18**, 343-84 (2005).
65. Lechardeur, D., Dougaparsad, S., Nemes, C. & Lukacs, G.L. Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *J Biol Chem* **280**, 40216-25 (2005).
66. Sakahira, H., Takemura, Y. & Nagata, S. Enzymatic active site of caspase-activated DNase (CAD) and its inhibition by inhibitor of CAD. *Arch Biochem Biophys* **388**, 91-9 (2001).
67. Reh, S., Korn, C., Gimadutdinov, O. & Meiss, G. Structural basis for stable DNA complex formation by the caspase-activated DNase. *J Biol Chem* **280**, 41707-15 (2005).

68. Tsuruta, T., Oh-hashii, K., Kiuchi, K. & Hirata, Y. Degradation of caspase-activated DNase by the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 793-9 (2008).
69. Vainberg, I.E. et al. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **93**, 863-73 (1998).
70. Siegers, K. et al. Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J* **18**, 75-84 (1999).
71. Ageichik, A.V., Samejima, K., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. Genetic analysis of the short splice variant of the inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD-S) in chicken DT40 cells. *J Biol Chem* **282**, 27374-82 (2007).
72. Pruett-Miller, S.M., Reading, D.W., Porter, S.N. & Porteus, M.H. Attenuation of zinc finger nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels. *PLoS Genet* **5**, e1000376 (2009).