

Identifizierung eines spezifischen  
Protein-Inhibitors für die Endonuklease G in  
*Drosophila melanogaster*

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

**Rebekka Weißbach**

geboren am 06.06.1981 in Radebeul

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. PD Dr. Ralph Golbik
3. Dr. Gregor Meiss

verteidigt am 24.04.2009 in Halle (Saale)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1. Die Endonuklease G . . . . .	5
2.1.1. NucA und NuiA aus <i>Anabaena spec.</i> . . . . .	11
2.1.2. Rolle der EndoG in der Apoptose . . . . .	13
2.2. Zielsetzung . . . . .	17
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1. Material . . . . .	18
3.1.1. Bakterienstämme . . . . .	18
3.1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> -Zellen . . . . .	18
3.1.3. Enzyme, Proteine und Antikörper . . . . .	18
3.1.4. Nukleinsäuren und Nukleotide . . . . .	19
3.1.5. Oligonukleotide . . . . .	19
3.1.6. Plasmide . . . . .	20
3.1.7. Kits und Standards . . . . .	20
3.1.8. Säulen und Säulenmaterial . . . . .	21
3.1.9. Feinchemikalien . . . . .	21
3.1.10. Sonstiges . . . . .	22
3.2. Methoden . . . . .	23
3.2.1. Mikrobiologische Methoden . . . . .	23
3.2.1.1. Sterilisierung . . . . .	23
3.2.1.2. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	23
3.2.1.3. Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> - Zellen . . . . .	23
3.2.1.4. Elektroporation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	23
3.2.1.5. Kultivierung von <i>Drosophila</i> -Schneider2-Zellen . .	24
3.2.1.6. Bestimmung der Lebendzellzahl . . . . .	24
3.2.1.7. Transfektion von Plasmid-DNA durch Calciumphos- phatfällung . . . . .	24
3.2.1.8. Immunfluoreszenz in Schneider2-Zellen . . . . .	25
3.2.2. Molekularbiologische Methoden . . . . .	26
3.2.2.1. Plasmidpräparation . . . . .	26
3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	26
3.2.2.3. 5´-Dephosphorylierung . . . . .	27

3.2.2.4.	Ligation . . . . .	27
3.2.2.5.	Verdau mit Restriktionsenzymen . . . . .	27
3.2.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	27
3.2.2.7.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
3.2.2.8.	DNA-Sequenzierung . . . . .	28
3.2.2.9.	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese .	28
3.2.2.10.	Klonierungen . . . . .	29
3.2.3.	Proteinchemische Methoden . . . . .	30
3.2.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	30
3.2.3.2.	Coomassie-Färbung . . . . .	30
3.2.3.3.	<i>Western Blotting</i> . . . . .	30
3.2.3.4.	Silberfärbung . . . . .	31
3.2.3.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	32
3.2.3.6.	Expression und Reinigung von EndoG $\Delta$ N53 . . . . .	33
3.2.3.7.	Expression und Reinigung von 14-3-3 $\epsilon$ und 14-3-3 $\zeta$ , EndoGI und EndoGI-Varianten . . . . .	33
3.2.3.8.	Expression und Reinigung von EndoG $\Delta$ N55 . . . . .	34
3.2.3.9.	Expression und Renaturierung von EndoG $\Delta$ N53 DAGA	35
3.2.3.10.	Massenspektrometrie . . . . .	36
3.2.3.11.	Analytische Ultrazentrifugation . . . . .	36
3.2.3.12.	Messung des Circular dichroismus . . . . .	37
3.2.4.	Herstellung radioaktiv markierter Substrate . . . . .	37
3.2.4.1.	Herstellung von homogen markiertem Poly(A) . . .	37
3.2.4.2.	<i>In-vitro</i> -Transkription . . . . .	38
3.2.4.3.	Radioaktive 3'-Markierung . . . . .	38
3.2.4.4.	Radioaktive 5'-Markierung . . . . .	39
3.2.5.	Aktivitätstests . . . . .	39
3.2.5.1.	TCA-Fällungsexperimente . . . . .	39
3.2.5.2.	Analyse mittels denaturierender PAGE . . . . .	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1.	Der Endonuklease G-Inhibitor . . . . .	43
4.1.1.	EndoGI liegt als Monomer vor . . . . .	44
4.1.2.	EndoGI befindet sich im Zellkern . . . . .	46
4.1.3.	EndoGI wird in allen Entwicklungsstadien der Taufliege expri- miert . . . . .	46
4.2.	Die Nuklease EndoG . . . . .	48
4.2.1.	Klonierung und Expression von rekombinanter EndoG . . .	49

4.2.2.	Reinigung von rekombinanter EndoGΔN53 . . . . .	50
4.2.3.	Reinigung von rekombinanter EndoGΔN53 DAGA . . . . .	51
4.2.4.	Reinigung von rekombinanter EndoGΔN55 N187K . . . . .	53
4.2.5.	EndoGΔN53 DAGA besitzt eine native Struktur . . . . .	54
4.2.6.	Die Charakterisierung der <i>Drosophila</i> -EndoG . . . . .	55
4.2.6.1.	Sowohl Poly(A), als auch Oligo(A) werden durch EndoG hydrolysiert . . . . .	55
4.2.6.2.	EndoG ist eine Endonuklease . . . . .	57
4.2.6.3.	Sowohl einzel-, als auch doppelsträngige DNA wird durch EndoG abgebaut . . . . .	59
4.2.6.4.	Poly(A), ein bevorzugtes Substrat? . . . . .	60
4.2.6.5.	Oligo(dA) und Oligo(dT) werden bevorzugt geschnitten . . . . .	62
4.2.6.6.	Die EndoG-Aktivität ist abhängig von divalente Metallionen . . . . .	63
4.2.6.7.	EndoG wird durch hohe Konzentrationen an KCl inhibiert . . . . .	64
4.2.6.8.	EndoG weist einen hohen $K_m$ -Wert für Poly(A) auf . . . . .	65
4.2.6.9.	EndoGΔN55 N187K ist ein dimeres Protein . . . . .	66
4.2.6.10.	EndoG befindet sich in den Mitochondrien . . . . .	67
4.3.	Der EndoG-EndoGI-Komplex . . . . .	69
4.3.1.	EndoGΔN53 wird durch EndoGI unmittelbar und komplett gehemmt . . . . .	69
4.3.2.	Der EndoG-EndoGI-Komplexes besitzt eine 2:1-Stöchiometrie . . . . .	71
4.3.3.	EndoGI bindet EndoGΔN53 mit hoher Affinität . . . . .	72
4.3.4.	Die rekombinante EndoGΔN53 ist nur teilweise aktiv . . . . .	74
4.3.5.	Beide EndoGI-Domänen sind aktiv . . . . .	75
4.3.6.	EndoGΔN53 DAGA kann EndoGI nicht binden . . . . .	77
4.3.7.	EndoGΔN55 N187K konkurriert mit EndoG um EndoGI . . . . .	79
4.3.8.	Der EndoG-EndoGI-Komplex dissoziiert extrem langsam . . . . .	80
4.4.	Die <i>Drosophila</i> -14-3-3-Proteine und EndoGI . . . . .	83
4.4.1.	Die 14-3-3-Proteine sind gleichmäßig in der Zelle verteilt . . . . .	83
4.4.2.	EndoGI bindet mit niedriger Affinität an 14-3-3ε . . . . .	85
4.4.3.	Der Inhibitor-Nuklease-Komplex wird nicht durch die beiden 14-3-3 Proteine <i>in-vitro beeinflusst</i> . . . . .	87
4.5.	EndoGI verlässt den Zellkern während der Apoptose in Schneider2-Zellen . . . . .	88

<b>5. Diskussion</b>	<b>92</b>
5.1. Die Expression von <i>Drosophila</i> -Endonuklease G in Bakterien . . . . .	93
5.2. Charakterisierung der <i>Drosophila</i> -EndoG . . . . .	95
5.3. Die Quartärstruktur von EndoG, EndoGI und des EndoG-EndoGI-Komplexes . . . . .	99
5.4. Lokalisation von EndoG und EndoGI innerhalb der Zelle . . . . .	100
5.5. Der EndoG-EndoGI-Komplex . . . . .	101
5.6. Der EndoGI-14-3-3 $\epsilon$ -Komplex . . . . .	107
5.7. EndoG und EndoGI während der Apoptose . . . . .	108
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>A. Literatur</b>	<b>115</b>
<b>B. Anhang</b>	<b>127</b>
B.1. Sequenzen der verwendeten RNA- und DNA-Substrate . . . . .	127
B.2. Lebenslauf . . . . .	128
B.3. Eidesstattliche Erklärung . . . . .	129
B.4. Danksagung . . . . .	130

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-(5´)-diphosphat
AMP	Adenosin-(5´)-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-(5´)-triphosphat
BLAST	<i>basic local alignment sequence tool</i>
b bzw. bp	Basen bzw. Basenpaare
bov.	bovin
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie (3,7 · 10 <sup>10</sup> Bequerel)
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
CTP	Cytosin-(5´)-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient (M <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoG	Endonuklease G
EndoGI	Endonuklease G-Inhibitor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GMP	Guanosin-(5´)-monophosphat

---

h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
HSP	Hochsalzpuffer
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
Da	Dalton
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
MgAc	Magnesiumacetat
min	Minute
MLU	Martin-Luther-Universität
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mS	Millisiemens
Ni-NTA	Nickel-nitrilo-tri-acetic-säure
NP-40	Nonidet P40
NSP	Niedrigsalzpuffer
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Poly(A)-Polymerase
PARN	Poly(A)-spezifische Ribonuklease
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
S2-Zellen	Schneider2-Zellen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
t	Zeit
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

---

⊖	Elliptizität (mdeg)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen

#### Anmerkung zur Terminologie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Anglizismen sind kursiv gedruckt. Für Aminosäuren wurde der Dreibuchstaben-, für Nukleinsäuren der übliche Einbuchstaben-Code verwendet. Der Begriff Expression wird in dieser Arbeit auch auf die Proteine verwendet, welche mit rekombinanten Genen hergestellt wurden. Für nahezu alle Experimente in dieser Arbeit wurden verschiedene EndoG-Varianten verwendet, dabei bezieht sich innerhalb eines Absatzes der Begriff EndoG auf die jeweils dort abgehandelte Variante.

## 2. Einleitung

DNA ist der Träger der Erbinformation. Im Zuge der Zellteilung muss diese Information effektiv und sicher vervielfacht und weitertransportiert werden. Für Prozesse wie z. B. Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur sind Nukleasen daher unerlässlich. Nukleasen hydrolysieren Phosphodiesterbindungen in Nukleinsäuren und kommen ubiquitär in allen Organismen vor [Rangarajan & Shankar, 2001].

Die zuerst identifizierten Nukleasen sind Proteinnukleasen [Araki, 1903, Iwanoff *et al.*, 1903]. Neben den Proteinnukleasen gibt es noch die sogenannten chemischen Nukleasen [Cowan, 2001]. Als chemische Nukleasen werden sowohl organische Verbindungen wie Uracil und Hydrazin, als auch Metallverbindungen wie  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{OsO}_4$  und die Eisen- und Kupferkomplexe Kupfer-*o*-Phenanthrolin und EDTA-Fe bezeichnet [Gravert & Griffin, 1996, Perrin *et al.*, 1996]. Dabei erfolgt die Spaltung ohne Sequenzspezifität. Eine weitere Form von Nukleasen sind Ribozyme, welche aus RNA bestehen und als Ribonukleasen wirken [Kruger *et al.*, 1982].

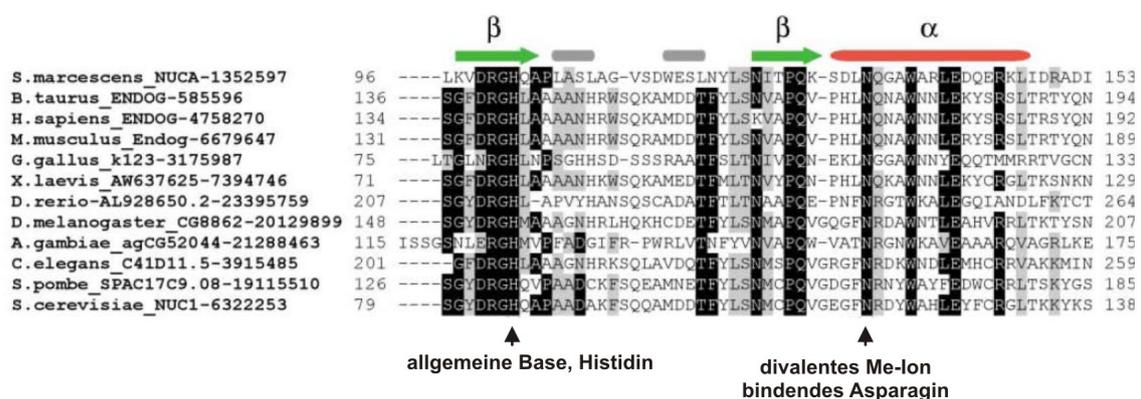
Nukleasen werden zur besseren Klassifizierung nach verschiedenen Kriterien eingeteilt, die sich manchmal aufgrund der großen Bandbreite an Enzymen überschneiden können [Rangarajan & Shankar, 2001]. Man unterscheidet:

1. nach Art des bevorzugten Substrats, DNasen oder RNasen
2. nach der Lage der zu spaltenden Phosphodiesterbindung, Endo- oder Exonukleasen
3. nach Struktur- oder Sequenzpräferenzen (Einzel- oder Doppelstrang)

Dieses System ermöglicht z. B. die Unterscheidung zwischen bakteriellen Restriktionsendonukleasen, welche DNA innerhalb einer streng definierten Nukleinsäuremotivs spalten [Wilson, 1991], und sequenzunspezifischen Nukleasen, wie der RNase A. Die in dieser Dissertation charakterisierte Endonuklease aus *Drosophila melanogaster* gehört zu den RNA/DNA-unspezifische Endonukleasen. Bisher wurden mehr als 30 RNA/DNA-unspezifische Endonukleasen aus einer Vielzahl von pro- und eukaryotischen Organismen isoliert, die sowohl intra- als auch extrazellulär vorliegen [Rangarajan & Shankar, 2001]. Die wohl am besten untersuchte unspezifische Nuklease ist die extrazelluläre Nuklease *Serratia marcescens*, welches ein Homologes zu den eukaryotischen Endonukleasen G und der hier vorgestellten Nuklease darstellt [Rangarajan & Shankar, 2001].

## 2.1. Die Endonuklease G

Die Endonuklease G (EndoG) ist eine evolutionär konservierte Endonuklease (siehe Abbildung 1), die über eine N-terminale, mitochondriale Lokalisationssequenz verfügt. Sie gehört zu der Familie der DNA/RNA-unspezifischen  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Nukleasen [Low, 2003, Kühmann *et al.*, 1999, Schäfer, 2007]. RUIZ-CARILLO und RENAUD isolierten 1987 eine Nuklease aus Hühner-Erythrozyten-Zellkernen und konnten zeigen, dass diese Endonuklease bevorzugt  $(dG)_n \cdot (dC)_n$ -Abschnitte der DNA spaltete. Da der G-Strang 4-10 mal schneller gespalten wurde als der C-Strang wurde das unbekannte Enzym Endonuklease G genannt [Ruiz-Carillo & Renaud, 1987, Schäfer, 2007]. Dieser Name wurde für nahezu alle eukaryotischen Homologe übernommen, nur die EndoGs aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* behielten ihren Namen Nuc1 und Cps-6 [Dake *et al.*, 1988, Parrish *et al.*, 2001]. Bereits 1959 wurde von BEAUFAY *et al.* eine „basische Desoxyribonuklease“ in den Mitochondrien von Rattenlebern gefunden [Beaufay *et al.*, 1959], welche höchstwahrscheinlich mit dem jetzt als Endonuklease G (EndoG) bezeichneten Enzym identisch ist. Seit dieser Zeit wurde in verschiedenen Veröffentlichungen von einer mitochondrialen unspezifischen Endonuklease berichtet. So wurde 1966 sowohl in *Neurospora crassa* als auch in Rattenlebern eine Nukleaseaktivität beschrieben, welche deutlich mit Mitochondrien assoziiert ist [Linn & Lehmann, 1966, Curtis *et al.*, 1966]. Diese wurde in den 1980er Jahren auch in Hefe, Maus und Rind identifiziert [Dake *et al.*, 1988, Tomkinson *et al.*, 1988, Cummings *et al.*, 1987]. Nachfolgend



**Abbildung 1:** Sequenzvergleich der Aminosäuren der aktiven Zentren ausgewählter homologer Vertreter von DNA/RNA-unspezifischen Nukleasen aus der DRGH-Familie. Die streng konservierten Aminosäuren sind dunkel unterlegt. Markiert ist das Histidin im DRGH-Motiv, welches als allgemeine Base die Nukleinsäurehydrolyse katalysiert und das Asparagin, welches direkt das katalytische Metallion bindet. Modifiziert nach Schäfer *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **338**, 217-228, 2004.

wurden auch die EndoG-Homologen in *Homo sapiens* und *Caenorhabditis elegans* untersucht [Widlak *et al.*, 2001, Parrish *et al.*, 2001]. Neben den eukaryotischen Vertretern der Endonukleasen G wurden auch in Prokaryoten homologe Proteine identifiziert, so z.B. die Nuklease aus dem gram-negativen, pathogenen Enterobakterium *Serratia marcescens* und NucA aus dem Cyanobakterium *Anabaena spec.* [Nestle & Roberts, 1969a, Muro-Pastor *et al.*, 1992].

Es wird vermutet, dass die, bereits 1969 identifizierte, *Serratia*-Nuklease und die *Anabaena*-NucA eine nutritive Funktion ausüben [Franke *et al.*, 1999]. Weiterhin wurde spekuliert, dass die Nukleasen als Bakteriocine wirken und damit das Wachstum konkurrierender Mikroorganismen behindern [Franke *et al.*, 1999]. 1993 untersuchten COTE und RUIZ-CARILLO die Endonuklease G und stellten fest, dass die Nuklease murine mitochondriale RNA- und DNA/RNA-Substrate spaltete. Die Autoren spekulierten daher, dass die mitochondrial-lokalisierte EndoG Primer für die mitochondrialer DNA-Replikation generiert [Côté & Ruiz-Carillo, 1993]. Diese Funktion wurde von OHSATO *et al.* bezweifelt, da die mitochondriale DNA-Replikation in der Matrix stattfindet. EndoG hingegen befindet sich im Intermembranraum der Mitochondrien [Ohsato *et al.*, 2002]. 2002 postulierten HUANG *et al.*, dass EndoG möglicherweise die Inversion der L and S Komponenten in der DNA des *Herpes simplex-Virus Typ 1* auslöst [Huang *et al.*, 2002]. Diese Ergebnisse konnten 2006 durch RNAi-*knock-out*-Versuche bestätigt werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zellwachstum in Abwesenheit von EndoG verlangsamt war [Huang *et al.*, 2006]. Da der EndoG-Lokus jedoch mit einem weiteren Gen überlappt, konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Fehlen weiterer Proteine nicht ausgeschlossen werden. In 2001 wurde EndoG erstmals als eine apoptotische Nuklease beschrieben. Bemerkenswert war, dass EndoG, in einem Caspase-unabhängig Weg, in der Lage war, DNA in CAD-defizienten Zellen abzubauen [Li *et al.*, 2001, Schäfer, 2007]. Auf die widersprüchliche Rolle der EndoG in der Apoptose wird in Kapitel 2.1.2 eingegangen.

Bei der EndoG handelt es sich um eine unspezifische Nuklease, die sowohl RNA, als auch einzel- und doppelsträngige DNA hydrolysiert [Widlak *et al.*, 2001]. Daneben besitzen die verschiedenen EndoG-homologen Proteine unterschiedlich schwache Substratpräferenzen, welche vor allem für die *Serratia*-Nuklease intensiv untersucht wurden [Friedhoff *et al.*, 1996b]. Die *Serratia*-Nuklease hydrolysiert doppelsträngige DNA und RNA sowie heterogene einzelsträngige DNA und RNA, wobei hauptsächlich 5'-phosphorylierte Tetra-, Tri-, Dinukleotide entstehen [Nestle & Roberts, 1969b, Yonemura *et al.*, 1983]. Einzelsträngige Homo-

polynukleotide, wie z. B. Poly(dA), Poly(G) und Poly(U) hingegen wurden von der *Serratia*-Nuklease kaum abgebaut [Yonemura *et al.*, 1983]. Von MEISS *et al.* wurde gezeigt, dass die *Serratia*-Nuklease bevorzugt doppelsträngigen Nukleinsäuren mit einer A-Helix-Konformation abbaut [Meiss *et al.*, 1999]. Es wurde gezeigt, dass Poly(dG)·Poly(dC) effizient gespalten wird, wohingegen Poly(dA)·Poly(dT), welches die B-Helix-Konformation annimmt, kaum gespalten wird [Meiss *et al.*, 1995]. Auch für NucA aus *Anabaena spec.*, die EndoG aus Huhn und die bovine EndoG wurde eine bevorzugte Spaltung von Poly(dG)·Poly(dC)-Strängen nachgewiesen [Meiss *et al.*, 1998, Ruiz-Carillo & Renaud, 1987, Côté *et al.*, 1989]. DNA und doppelsträngige RNA können in der A-Helix-Konformation auftreten, wohingegen einzelsträngige RNA bis auf Ausnahme von Poly (A) bevorzugt in der B-Helix-Konformation auftritt [Saenger *et al.*, 1975, Meiss *et al.*, 1999]. Es wurde daher spekuliert, dass die Bindung von Nukleinsäuren in A-Form durch die *Serratia*-Nuklease einen Vorteil darstellt, da sowohl DNA als auch RNA gebunden und hydrolysiert werden können [Meiss *et al.*, 1999]. Aufgrund intensiver Untersuchungen von NESTLE und ROBERTS galten Pentanukleotide als kleinste mögliche Substrate für die *Serratia*-Nuklease [Nestle & Roberts, 1969b]. Jedoch konnte später gezeigt werden, dass sowohl die *Serratia*-Nuklease, als auch die *Anabaena*-NucA in der Lage sind die synthetische Verbindung Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat zu spalten [Friedhoff *et al.*, 1999, Haberland, 2001]. Dieses Minimalsubstrat wird an der 5'-Seite hydrolysiert, wobei *p*-Nitrophenol sowie Desoxythymidin-3'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat entstehen. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat ist dabei um den Faktor  $10^6$  niedriger als mit hochmolekularer DNA [Haberland, 2001]. Neben der Endonukleaseaktivität, die allen EndoGs gemeinsam ist, wurden für Nuc1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und für die Nuklease aus *Neurospora crassa* zusätzlich eine schwache 5'-Exonukleaseaktivität beim Abbau von dsDNA beschrieben [Dake *et al.*, 1988, Fraser *et al.*, 1989]. Durch diese Exonukleasefunktion können Strangbrüche, die in dsDNA eingebracht wurden, effektiv erweitert und auf diese Weise längere ssDNA-Lücken generiert werden, erklärten FRASER *et al.*

Für die EndoG-Aktivität wird ein divalentes Metallion als Kofaktor benötigt. Die Aktivität der *Serratia*-Nuklease ist abhängig von  $Mg^{2+}$  in Konzentrationen von 5 bis 10 mM [Nestle & Roberts, 1969b]. In Gegenwart von dem ebenfalls untersuchten  $Mn^{2+}$  zeigte die Nuklease nur ein Drittel der Aktivität, welche mit  $Mg^{2+}$  erreicht wurde. Die bovine EndoG und die *Anabaena*-NucA hingegen werden am stärksten durch  $Mn^{2+}$  aktiviert [Cummings *et al.*, 1987, Muro-Pastor *et al.*, 1992]. Wohingegen die humane EndoG eine maximale Aktivität in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  aufweist

[Widlak *et al.*, 2001]. Die EndoG aus *Mus musculus* kann gleichermaßen durch  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$  stimuliert werden und zeigt, genauso wie die humane EndoG, keine Aktivität mit  $Ca^{2+}$  [Tomkinson *et al.*, 1988]. Darüber hinaus konnte die murine EndoG durch  $Zn^{2+}$  aktiviert werden, welches in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  die katalytische Aktivität von humaner EndoG inhibiert [Widlak *et al.*, 2001]. Die benötigten Konzentrationen der divalenten Metallionen liegen dabei, abhängig von Enzym und Ion, zwischen 0,5-5 mM.

Hohe Konzentrationen an monovalenten Salzionen wirken inhibierend auf die EndoG-Aktivität. So wurde für nahezu alle eukaryotischen Proteine berichtet, dass bereits Konzentrationen von 100-150 mM die katalytische Aktivität beeinträchtigen [Low, 2003]. Besonders stark ist die Inhibierung im Falle der humanen EndoG, welche schon bei Kaliumkonzentrationen von 80-100 mM keine DNA mehr hydrolysiert [Widlak *et al.*, 2001]. Auch für die *Anabaena*-NucA wurde beschrieben, dass NaCl-Konzentrationen über 100 mM die nukleolytische Aktivität deutlich beeinträchtigen [Meiss *et al.*, 1998].

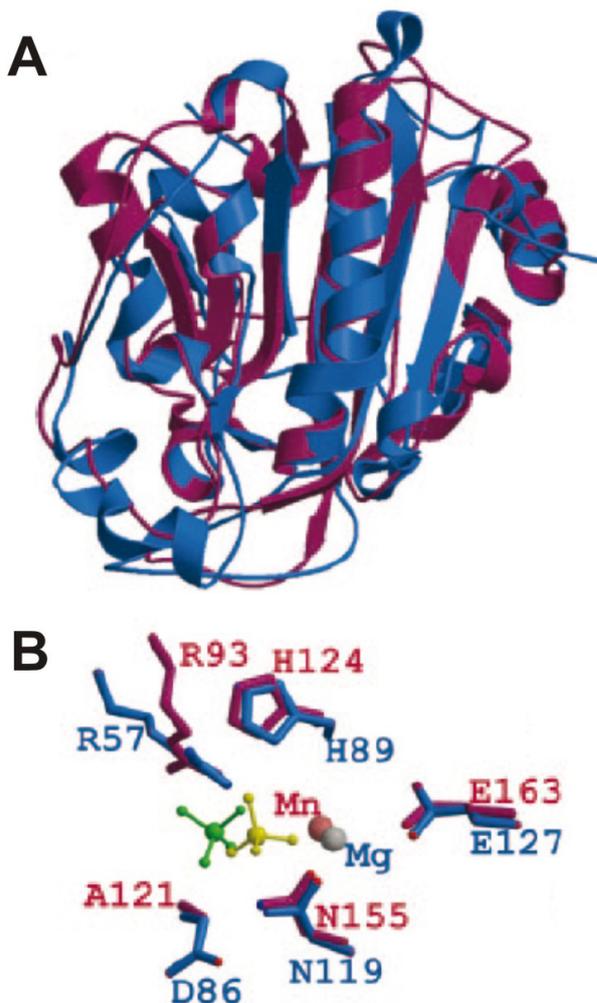
Das Enzym aus *Serratia marcescens* ist in einem Bereich von 4-50°C aktiv [Ahrenkoltz *et al.*, 1994]. Ein Temperaturoptimum von 35°C wurde für die Nuc1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und die *Anabaena*-NucA [Dake *et al.*, 1988, Meiss *et al.*, 1998] bestimmt. Die *Serratia*-Nuklease ist einem pH-Bereich von 7-10 aktiv. Die größte Aktivität wurde von NESTLE und ROBERTS bei pH 8.5 gemessen, YONEMURA *et al.* beobachteten hingegen eine Maximalaktivität bei pH 8.0 [Nestle & Roberts, 1969b, Yonemura *et al.*, 1983]. Auch die humane EndoG ist in diesem pH-Bereich aktiv und das pH-Optimum von 7-8 wurde auch für die bovine EndoG, das Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* und die *Anabaena*-NucA beobachtet [Widlak *et al.*, 2001, Gerschenson *et al.*, 1995, Dake *et al.*, 1988, Meiss *et al.*, 1998].

Von zwei Vertretern der DRGH-Nukleasen, der *Serratia*-Nuklease und der *Anabaena*-NucA, konnten bisher die Kristallstrukturen ermittelt werden [Miller *et al.*, 1994, Shlyapnikov *et al.*, 2000, Ghosh *et al.*, 2005]. Die Sekundärstruktur der *Serratia*-Nuklease kann in drei Regionen unterteilt werden [Shlyapnikov *et al.*, 2000]. Die *Serratia*-Nuklease besteht zunächst aus einem 6-strängigen zentralen  $\beta$ -Faltblatt, welches von einer  $\alpha$ -helikalen Domäne und einer  $\alpha/\beta$ -Region flankiert wird (siehe Abbildung 2A). Das Enzym liegt, genauso wie alle homologen Enzyme bis auf die *Anabaena*-NucA, als Homodimer vor [Miller & Krause, 1996]. Dabei zeigten MILLER und KRAUSE, dass die elektrostatischen Felder beider aktiver Zentren nicht interagieren und schlussfolger-

ten, dass sie dadurch unabhängig voneinander Nukleinsäuren spalten können [Miller & Krause, 1996]. FRANKE *et al.* konnten zeigen, dass beide Untereinheiten in der dimeren *Serratia*-Nuklease funktionell unabhängig voneinander sind [Franke *et al.*, 1999]. Weiterhin wurde postuliert, dass durch simultane Bindung von einer Nukleinsäure, durch beide aktiven Zentren in einem dimeren Molekül, die Aktivität beeinflusst wird. Die Autoren konnten anhand einer inaktiven Nukleasevariante zeigen, dass ein riesiges Netzwerk zwischen Nuklease und makromolekularer DNA gebildet wird, welches multiple Bindestellen bereitstellt und somit zu einem prozessiven Abbau führt [Franke *et al.*, 1999]. Dabei wird die Dimerisierung der *Serratia*-Nuklease über das Histidin 184 vermittelt, welches nicht in anderen EndoGs konserviert ist. So liegt die *Anabaena*-Nuklease als einzige bisher beschriebene EndoG-homologe Nuklease als Monomer vor [Meiss *et al.*, 1998] und besitzt an der entsprechenden Position ein Arginin. Da gezeigt wurde, dass durch Austausch von His 184 zu Arg, Thr, Ala oder Asp die *Serratia*-Nuklease keine Homodimere mehr bilden konnte, erklärt das in der *Anabaena*-NucA vorliegende Arginin möglicherweise die fehlende Dimerisierung [Franke *et al.*, 1999]. Da die bisher beschriebenen eukaryotischen Endonukleasen G ebenfalls als Homodimere auftreten und an der dem Histidin 184 in der *Serratia*-Nuklease entsprechenden Position ebenfalls kein Arginin besitzen, wird dort die Dimerisierung offenbar über andere Aminosäuren vermittelt. Auch die *Anabaena*-NucA besteht aus einem 6-strängigen  $\beta$ -Faltblatt und einem kleinen 2-strängigen  $\beta$ -Faltblatt [Ghosh *et al.*, 2005]. Obwohl die *Serratia*-Nuklease und *Anabaena*-NucA nur eine 22%ige Sequenzidentität besitzen, ist die Gesamtstruktur beider Proteine sehr ähnlich (siehe Abbildung 2A) [Ghosh *et al.*, 2005]. Dabei besteht das aktive Zentrum aus dem 2-strängigen  $\beta$ -Faltblatt und einer  $\alpha$ -Helix. Diese Form des aktiven Zentrums ist charakteristisch für  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Nukleasen [Kühlmann *et al.*, 1999, Friedhoff *et al.*, 1999]. Die Nukleasen dieser Nuklease-Superfamilie hydrolysieren ihre Substrate entweder unspezifisch, sequenz- oder strukturspezifisch und können in drei Unterfamilien eingeteilt werden, die nach dem charakteristischen Aminosäuremotiv in ihren aktiven Zentren benannt wurden [Kühlmann *et al.*, 1999]: die His-Cys-Box-Nukleasen (z.B. I-PpoI [Flick *et al.*, 1998]), die HNH-Nukleasen (z.B. Colicin E7 und E9 bzw. I-Hmul [Hsieh *et al.*, 1997, Maté & Kleanthous, 2004]) und die DRGH-Nukleasen (mitochondriale EndoG, die *Serratia*-Nuklease, die *Syncephalastrum racemosum*-Nuklease und die Nuklease C1 aus *Cunninghamella echinulata* [Côté *et al.*, 1989, Nestle & Roberts, 1969a, Ho *et al.*, 1998, Ho & Liao, 1999]). Die zweite Gemeinsamkeit, neben der homologen Struktur des aktiven Zentrums dieser Nukleasen, ist die Abhängigkeit der nukleolytischen Funktion von divalenten

Metallionen.

Dieses Metallion wird in der *Anabaena*-Nuklease oktaedrisch von 4 Wassermolekülen umgeben, dem Sauerstoff eines Sulfat-Ions und der Seitenkette des Asparagins 155, welches damit die einzige direkte Koordinationsstelle zwischen Protein und Kofaktor ausbildet (siehe Abbildung 2B und 1) [Ghosh *et al.*, 2005]. Diese Art der Interaktion mit divalenten Metallionen ist typisch für eine ganze Gruppe anderer Nucleasen, deren aktive Zentren ebenfalls für die Bindung eines hydratisierten Ions optimiert sind, so z.B. die homologe *Serratia*-Nuklease und die *homing*-Endonuklease I-*PpoI* [Miller *et al.*, 1999, Galburt *et al.*, 1999]. In diesen Beispielen werden die meisten Interaktionen der aktiven Zentren mit dem divalenten Metallion über Wassermoleküle vermittelt und direkte Kontakte zwischen Aminosäuren und dem Metallion sind eher selten. Dabei befindet sich die Bindestelle für das hydratisierte, zweiwertige Metallion sowohl in der *Serratia*-Nuklease, als auch in



**Abbildung 2:** Vergleich der Struktur von *Serratia*- und *Anabaena*-Nuklease. **A** Dargestellt ist die Überlagerung von Banddiagrammen, welche die Strukturen der *Anabaena*-NucA (violett) und einem Monomer der *Serratia*-Nuklease (blau, Kette A) wiedergeben. Deutlich zu sehen ist die Ähnlichkeit der Strukturen. **B** Struktur der aktiven Zentren der *Anabaena*- (violett) und der *Serratia*-Nuklease (blau), inklusive des betreffenden Metallions  $Mn^{2+}$  in NucA (orange) und  $Mg^{2+}$  in der *Serratia*-Nuklease (grau) und einem Sulfat-Ion: NucA (gelb), *Serratia*-Nuklease (grün). (Aus Ghosh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 27990-27997, 2005.)

der *Anabaena*-NucA in einem überwiegend positiv geladenen Spalt, welcher auch das charakteristische DRGH-Motiv enthält. An der dipolartigen Oberfläche beider Proteine werden Nukleinsäuren gebunden [Miller *et al.*, 1994, Ghosh *et al.*, 2005]. Als Reaktionsmechanismus wird für die *Serratia*-Nuklease postuliert, dass mit Hilfe der allgemeinen Base Histidin 89 (aus dem DRGH-Motiv) einem Wassermolekül ein Proton entzogen wird (siehe Abbildung 2). Dieses greift dann nukleophil die Phosphordiesterbindung am Rückgrat der Nukleinsäuren an [Friedhoff *et al.*, 1996a]. Dabei unterstützen eine Reihe von Aminosäuren die Positionierung des Substrats entlang des Spalts und auch die Stabilisierung des Übergangszustands. Auch für die *Anabaena*-NucA konnte nachgewiesen werden, dass das Histidin 124 aus dem DRGH-Motiv als allgemeine Base die Nukleinsäurehydrolyse katalysiert [Ghosh *et al.*, 2005].

Bei den zuerst identifizierten prokaryotischen DRGH-Nukleasen handelt es sich um sezernierte Proteine. So wird die *Serratia*-Nuklease als Präprotein gebildet, wobei das reduzierende Milieu des Zytoplasmas die Ausbildung der Disulfidbrücken verhindert [Ball *et al.*, 1992]. Erst bei der Sezernierung in den Extrazellularraum wird ein Signalpeptid abgespalten. Weiterhin kommt es zur Ausbildung zweier Disulfidbrücken, welche notwendig sind für die nukleolytische Aktivität. [Ball *et al.*, 1992]. Da die Disulfidbrücken erst im oxidativen, Periplasma ausgebildet werden, wird der Abbau Zell-interner Nukleinsäuren verhindert. Die eukaryotischen Endonukleasen G hingegen liegen alle mitochondrial vor [Cummings *et al.*, 1987, Dake *et al.*, 1988, Schäfer *et al.*, 2004]. Die intrazellulären Nukleinsäuren werden so durch die Sequestrierung der EndoG im mitochondrialen Intermembranraum geschützt. Diese Lokalisation wird über eine N-terminal-codierte mitochondriale Lokalisationssequenz vermittelt, die nicht sehr stark konserviert ist. Weiterhin konnte für mehrere EndoGs gezeigt werden, dass im reifen Protein die Signalsequenz abgespalten wird [Côté *et al.*, 1989, Widlak *et al.*, 2001].

### **2.1.1. NucA und NuiA aus *Anabaena spec.***

Spezifische Nukleaseinhibitoren wurden bisher für mehrere Mitglieder der  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Familie beschrieben, so liegen in *Escherichia coli* für die toxischen Colicine spezifische inhibierende Immunproteine vor [Kleanthous *et al.*, 1999]. Der einzige bisher beschriebene Inhibitor für eine DRGH-Nuklease ist NuiA, der die *Anabaena*-NucA inhibiert (siehe 2.1.1) [Muro-Pastor *et al.*, 1997].

Denn während sich Eukaryoten durch die Sequestrierung ihre Endonuklease G im mitochondrialen Intermembranraum schützen, verfügt die *Anabaena*-NucA über den spezifischen Inhibitor NuiA [Muro-Pastor *et al.*, 1997], welcher keine Homologen in anderen Organismen besitzt. Dabei weist der NucA-NuiA-Komplex eine 1:1-Stöchiometrie auf [Meiss *et al.*, 1998]. Im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen Endonukleasen G und homologen Proteinen, welche als Homodimere auftreten, liegt NucA als Monomer vor. FRANKE *et al.* konnten zeigen, dass die dimeren *Serratia*-Nuklease dem monomeren *Anabaena*-Enzym beim Abbau polymerer Substrate überlegen ist [Franke *et al.*, 1999]. Warum in den DRGH-Nukleasen die Aminosäuren, welche die Dimerisierung vermitteln, im Gegensatz zu Aminosäuren, welche die katalytische Domäne bilden, nicht konserviert sind, bleibt unklar. Es wird jedoch argumentiert, dass das Cyanobakterium *Anabaena* aufgrund des autotrophen Energiegewinns einem geringeren Selektionsdruck ausgesetzt ist als *Serratia marcescens*, welche von externen Energiequellen abhängig ist. Es bestand daher keine Notwendigkeit für *Anabaena* ein dimeres Enzym zu evolvieren. In Abwesenheit von NuiA ist die Expression von NucA aufgrund der stark toxischen Wirkung nicht möglich [Meiss *et al.*, 1998]. Es handelt sich um eine sehr starke Interaktion zwischen NucA und NuiA, für welche ein  $K_D$ -Wert von  $1 \cdot 10^{-12}$  M bestimmt wurde [Meiss *et al.*, 2000]. Durch Analyse der Kristallstruktur des Komplexes konnten die Aminosäuren, welche die Interaktion zwischen NucA und NuiA vermitteln, identifiziert werden [Ghosh *et al.*, 2007]. Insgesamt werden 13 Wasserstoffbrücken zwischen NucA und NuiA ausgebildet. Die Struktur von NuiA wird als „offener Kiefer“ bezeichnet, wobei der obere Teil aus den Aminosäuren Threonin 195<sub>NuiA</sub> und Glutaminsäure 24<sub>NuiA</sub> besteht, welche in das aktive Zentrum von NucA eintreten. Der untere Teil besteht aus Asparaginsäure 75<sub>NuiA</sub> und Tryptophan 76<sub>NuiA</sub>, welche einen vorstehenden Bereich von NucA umhüllen. Die Bindung der *Anabaena*-Nuklease-NucA durch ihren spezifischen Inhibitor NuiA geschieht direkt im katalytischen Zentrum [Ghosh *et al.*, 2007]. Dabei dringt das C-terminale Threonin 195 des NuiA in das aktive Zentrum von NucA, bindet dort das katalytische divalente Metallion und ersetzt dadurch ein koordiniertes Sulfatmolekül (siehe Abbildung 2B). Dieses war bereits in der Struktur der NucA allein gefunden worden und imitiert wahrscheinlich die 5'-Phosphatabgangsgruppe. Dies ist die erste Struktur eines Komplexes, in der das katalytische Metallion direkt sowohl mit der Nuklease, als auch mit dem Inhibitor interagiert. Auch Glutaminsäure 24<sub>NuiA</sub> dringt in das aktive Zentrum ein und die Seitenketten dieser Aminosäure imitieren dabei die Ladung eines DNA-Phosphats. Somit wird die Bindung von NuiA offenbar durch Nachbildung der Enzym-Substrat-Interaktion vermittelt.

Durch Untersuchungen an C-terminalen Deletionsmutanten war bereits zuvor gezeigt worden, dass der C-Terminus von NuiA an der Bindung beteiligt sein muss [Meiss *et al.*, 2000], denn diese Varianten zeigten einen stark erhöhten  $K_D$ -Wert und waren nur bei einem 50- bis 100-fachem molaren Überschuss in der Lage, NucA bei nanomolaren Konzentrationen komplett zu hemmen.

### 2.1.2. Rolle der EndoG in der Apoptose

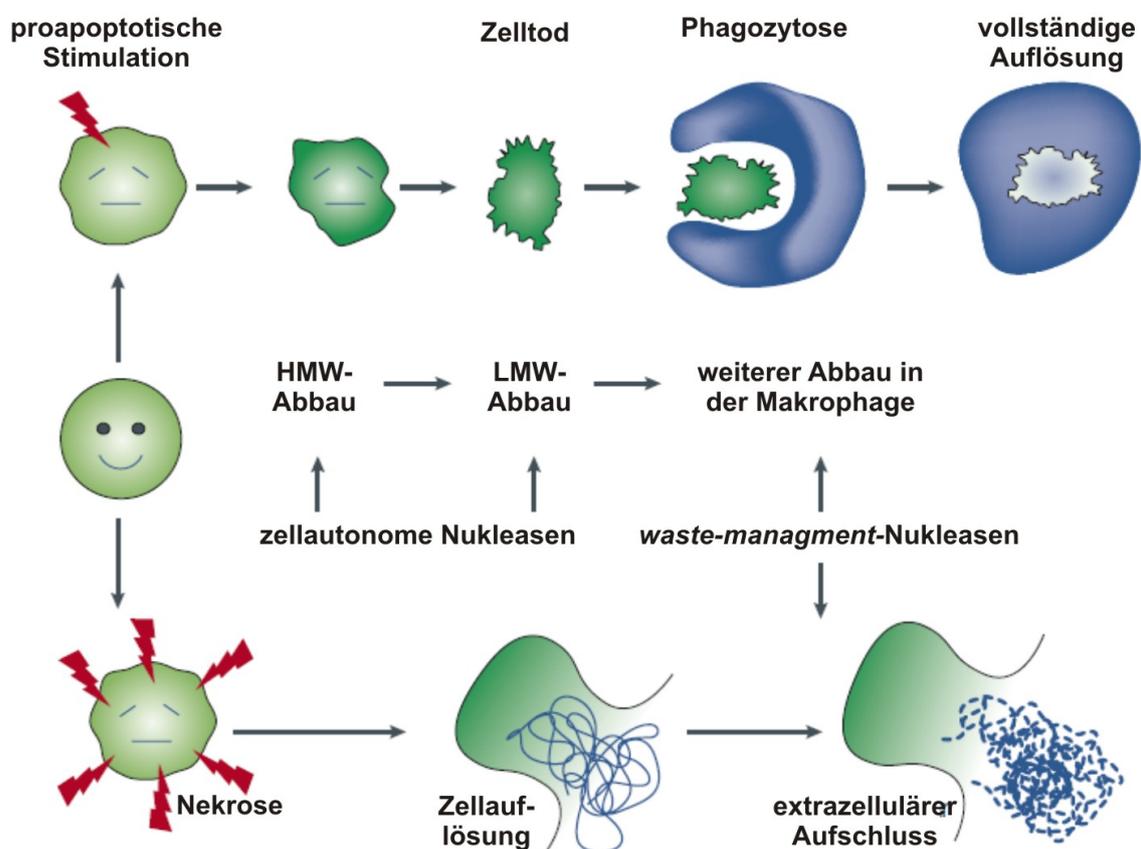
Als Apoptose wird der evolutionär konservierte, programmierte Zelltod verstanden. Die Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Geweben. So können, mittels Apoptose, infizierte oder beschädigte Zellen beseitigt werden [Vaux & Korsmeyer, 1999, Samejima & Earnshaw, 2005, Schäfer, 2007].

Apoptotische Zellen weisen charakteristische Merkmale auf. Solche Kennzeichen der Apoptose sind das Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern, Chromatinkondensation und -fragmentierung, Plasmamembranausstülpungen und abschließender Zerfall in Vesikel, den sogenannten *apoptotic bodies* [Wyllie *et al.*, 1980]. Die entstandenen apoptotischen Zellreste werden dann mittels Resorption durch benachbarte Zellen beseitigt [Raff, 1998, Schäfer, 2007]. Im Gegensatz zur Apoptose ist die zweite Form des Zelltods, die Nekrose, ein passiver Prozess, der unkontrolliert abläuft. Charakteristisch ist das Anschwellen der nekrotischen Zellen, wobei deren Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zum Platzen der Zellen, wobei das Zytoplasma und die Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt und anschließend durch Makrophagen beseitigt werden [Schäfer, 2007].

Die apoptotische Hydrolyse der chromosomalen DNA wird durch Endonukleasen katalysiert, welche die DNA in drei Stufen abbauen [Samejima & Earnshaw, 2005]. An diesen Abbauprozessen sind zwei Klassen von Nukleasen beteiligt: zum Einen die sogenannten zellautonomen Nukleasen und zum Anderen die *waste-management*-Nukleasen (siehe Abbildung 3). Die zellautonomen Nukleasen haben während der Apoptose direkten Zugang zum Kernplasma und sind wesentlicher Bestandteil des apoptotischen Programms, wobei ihre Aktivität direkt das Fortschreiten der Apoptose beeinflusst [Samejima & Earnshaw, 2005]. Die *waste-management*-Nukleasen hingegen sind in gesunden Zellen am Abbau von DNA beteiligt, die nicht aus dem eigenen Zellkern stammt. Diese Nukleasen werden entweder im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert oder in den extrazellulären Raum sezerniert, wobei die lysosomalen Nukleasen an der Phagozytose-vermittelten DNA-Hydrolyse beteiligt sind

[Samejima & Earnshaw, 2005, Schäfer, 2007].

Der apoptotische Abbau der chromosomalen DNA geschieht in zwei unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Phasen, die beide nacheinander stattfinden [Samejima & Earnshaw, 2005]. Zunächst findet eine DNA-Fragmentierung statt, bei der die zellautonomen Nukleasen der apoptotischen Zelle die DNA hydrolysieren. Nach der phagozytotischen Aufnahme der Zellvesikel der apoptotischen Zelle durch Nachbarzellen findet in diesen der abschließende DNA-Abbau durch lysosomale Nukleasen statt (siehe Abbildung 3) [Samejima & Earnshaw, 2005]. Der zellautonome DNA-Abbau wird wiederum in zwei Stufen unterteilt, zunächst wird die chromosomale DNA an Positionen



**Abbildung 3:** Übersicht über zellautonome und *waste-management*-Nukleasen während der Apoptose und der Nekrose. Zellkompartimente, wie auch die DNA, bleiben innerhalb der apoptotischen Zelle, bis sie phagozytotisch aufgenommen werden. Dabei sind zellautonome Nukleasen für den initialen Abbau der DNA während der Apoptose verantwortlich (*high-* und *low-molecular-weight*-Abbau). Nach der phagozytotischen Aufnahme der apoptotischen Zelle wird die verbleibende DNA durch *waste-management*-Nukleasen hydrolysiert. Nekrotische Zellen lysieren und entlassen ihre intrazellulären Bestandteile in den Extrazellularraum, wo DNA und RNA durch *waste-management*-Nukleasen abgebaut werden. Modifiziert nach Samejima & Earnshaw, *J Biol. Chem.*, **276**, 45427-45432, 2005.

innerhalb der internukleosomalen *linker* in etwa 50-300 kb große Fragmente gespalten [Walker *et al.*, 1994], was auch als *high-molecular-weight*-Abbau (HMW) bezeichnet wird. Im Anschluss erfolgt der Abbau dieser Fragmente zu Oligonukleotiden, was als *low-molecular-weight*-Abbau (LMW) bezeichnet wird [Samejima & Earnshaw, 2005]. Die Hydrolyse dieser Oligonukleotide geschieht dann in den lysosomalen Vesikeln durch DNase I [Liu *et al.*, 1999b]. Die zellautonomen Nukleasen sind die Caspase-anhängige Nuklease (CAD), EndoG, DNase II und DNase  $\gamma$ , die durch eine Vielzahl von Faktoren stimuliert werden, wie z.B. Histon H1, HSP70, DNA-Topoisomerase II und AIF [Samejima *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2001, Candé *et al.*, 2002, Samejima & Earnshaw, 2005], wobei CAD als die *major nuclease* bezeichnet wird. Dabei ist noch nicht restlos geklärt, welche Proteine die nukleolytische Aktivität haben und welche nur als Kofaktoren wirken [Samejima & Earnshaw, 2005].

Auch die apoptotische Rolle der EndoG ist umstritten. In *CAD-knock-out*-Mäusen konnte in apoptotischen Zellen die Fragmentierung nukleärer DNA beobachtet werden [Li *et al.*, 2001]. Dabei war der Phänotyp der Mäuse unauffällig. Es konnte festgestellt werden, dass die verbleibende DNaseaktivität mit den Mitochondrien assoziiert war und durch Fraktionierung mitochondrialer Mausextrakte wurde die für den DNA-Abbau verantwortliche Nuklease identifiziert, Endonuklease G. Es konnte in weiteren Untersuchungen festgestellt werden, dass EndoG nach apoptotischer Stimulation aus den Mitochondrien entlassen wird und in den Zellkern eindringt. Darüber hinaus konnten Li *et al.* zeigen, dass ein spezifischer EndoG-Antikörper die DNA-Fragmentierung in apoptotischen CAD-defizienten Zellextrakten vollständig inhibiert, während durch Zugabe eines Präimmunserums DNA-Fragmentierung beobachtet werden konnte. Auch konnten sie *in-vivo* nachweisen, dass die apoptotische DNase in CAD-defizienten Zellen tatsächlich aus den Mitochondrien entlassen wird. Aus all diesen Beobachtungen schlussfolgerten Li *et al.*, dass EndoG die für die apoptotische DNA-Fragmentierung verantwortliche DNase in CAD-defizienten Zellen sei [Li *et al.*, 2001].

Doch später wurden nach drei verschiedenen Untersuchungen an *EndoG-knock-out*-Mäusen widersprüchliche Daten veröffentlicht. So wurde in der ersten Studie berichtet, dass die EndoG-defizienten Mäuse bereits in frühen Stadien der Embryogenese sterben [Zhang *et al.*, 2003]. Auch zeigten *EndoG*<sup>+/-</sup>-Zellen eine erhöhte Apoptoseresistenz und eine Reduktion der Caspaseaktivierung, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation. Wurden *EndoG*<sup>+/-</sup>-Mäuse mit CAD-defizienten Mäusen gekreuzt, konnte nach Apoptoseinduktion nahezu keine DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation in *EndoG*<sup>+/-</sup>-*CAD*<sup>-/-</sup>-Zellen mehr be-

obachtet werden. IRVINE *et al.* hingegen zeigten, dass EndoG-defiziente Mäuse lebensfähig sind [Irvine *et al.*, 2005]. Darüber hinaus zeigten EndoG<sup>-/-</sup>-Zellen eine mit dem Wildtyp vergleichbare DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation während der Apoptose. Diese Beobachtungen konnten auch durch DAVID *et al.* bestätigt werden [David *et al.*, 2006], welche zeigten dass die Maus-Embryogenese und Entwicklung in EndoG-*knock-out*-Mäusen normal verlief. Auch in dieser Studie konnte keine Veränderungen während der Apoptose in diesen EndoG-defizienten Mäusen beobachtet werden. Dabei unterschieden sich die EndoG-*knock-out*-Mäuse in der ersten Studie von den beiden anderen Studien nur darin, dass in der ersten Studie neben EndoG zusätzlich noch ein unbekanntes Gen unterbrochen wurde. Falls das Produkt dieses Gens essentiell ist, könnte dies die widersprüchlichen Beobachtungen erklären. Auch könnten in EndoG-defizienten Zellen die anderen apoptotischen Nukleasen die Funktion der EndoG übernehmen, was den unauffälligen Phänotyp in den zwei anderen Studien erklären könnte.

In *Caenorhabditis elegans* wurde bisher kein dem CAD/ICAD-System entsprechendes Äquivalent gefunden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das EndoG-homologe Cps-6 mit verschiedenen Proteinen interagiert und einen Enzymkomplex bildet, das sogenannte Degradosom [Parrish *et al.*, 2001, Parrish & Xue, 2006], welches neben Cps-6 noch das AIF-homologe Wah-1 und sechs andere Nukleasen enthält. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine RNAi-induzierte Reduktion der Cps-6-Aktivität die DNA-Fragmentierung beeinträchtigt. Desweiteren wurde ein verzögertes Auftreten apoptotischer Zellen beobachtet [Parrish *et al.*, 2001].

Dass EndoG Apoptose induzieren kann, wurde durch SCHÄFER *et al.* gezeigt. Durch Überexpression von aktiver boviner EndoG in Säugetierzellen kam es zu einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen, während durch Überexpression einer inaktiven EndoG-Variante die Zellen weiterhin lebensfähig waren [Schäfer *et al.*, 2004]. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die mitochondrial lokalisierte EndoG nach Apoptoseinduktion die Mitochondrien verließ und im Zellkern nachzuweisen war. Dies war zuvor auch schon für die murine EndoG gezeigt worden [Li *et al.*, 2001].

## 2.2. Zielsetzung

Apoptose ist als aktiv durchgeführtes „Selbstmordprogramm“ der Zelle ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Geweben.[Wyllie *et al.*, 1980]. Dabei wird das Fortschreiten der Apoptose in Zellen durch das Schrumpfen des Zytoplasmas, Chromatinkondensation und - fragmentierung, Plasmamembranausstülpungen und abschließenden Zerfall in Vesikel charakterisiert. Es wurden bisher mehrere Nukleasen identifiziert, die für den Abbau der chromosomalen DNA verantwortlich sind [Samejima & Earnshaw, 2005], unter anderem CAD und Endonuklease G [Samejima *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2001]. Dabei wird die katalytische Aktivität von CAD durch den spezifischen Inhibitor ICAD reguliert [Samejima & Earnshaw, 1998]. Für die eukaryotische Endonuklease G wurde jedoch bisher kein spezifischer Inhibitor identifiziert. Obwohl EndoG und EndoG-Homologe bereits in *Serratia marcescens*, *Neurospora crassa*, *Anabaena spec.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, *Bos taurus* und *Homo sapiens* untersucht wurden, gibt es bisher keine Veröffentlichungen zur EndoG in *Drosophila melanogaster*.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das während meiner Diplomarbeit als *Drosophila*-Homologes der Endonuklease G identifizierte Protein und sein spezifischer Inhibitor funktionell charakterisiert werden [Weißbach, 2005]. Dabei sollten beide Proteine sowohl einzeln, als auch der gebildete EndoG-EndoGI-Komplex untersucht werden. Des Weiteren sollte die Rolle von EndoGI während der Apoptose untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine mögliche Assoziation der bei der massenspektrometrischen Identifizierung von EndoGI ebenfalls identifizierten *Drosophila*-14-3-3-Proteine untersucht werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Bakterienstämme

##### ***Escherichia coli* BL21(DE3) Codon+**

*E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS<sub>b</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ(DE3) Codon+

##### ***Escherichia coli* XL1-blue**

*E. coli* recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup> Δ M15(lacZ) Tn10(tet<sup>r</sup>)]

#### 3.1.2. *Drosophila melanogaster*-Zellen

##### **Schneider2-Zelllinie**

Die Zelllinie stammt von einer Primärkultur aus 20-24 h alten *Drosophila melanogaster*-Embryonen ab [Schneider, 1972]. Sie wurde von Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

#### 3.1.3. Enzyme, Proteine und Antikörper

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
bovine Poly(A)-Polymerase (PAP 531)	Dr. CLAUDIA TEMME (MLU Halle)
BSA	Merck, Darmstadt
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Leupeptin	Roche Diagnostics, Mannheim
methyliertes BSA	ANKE LIEPELT, MLU Halle
MitoTracker® Orange CM-H2 TMRos	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Poly(L)-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PegLab, Erlangen
Restriktionsenzyme und Puffer	NEB, Frankfurt/Main
RNase A	Roth, Karlsruhe
RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega, Mannheim
<i>swine</i> -anti- <i>rabbit</i> -IgG HRP	DAKO, Glostrup (Dänemark)

SP6-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt/Main
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Frankfurt/Main
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Ni-NTA HRP Konjugat	Qiagen, Hilden
monoklonales <i>mouse</i> -anti-flag-tag-IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cy3-gekoppeltes anti- <i>mouse</i> -IgG	Dianova, Hamburg
FITC-gekoppeltes anti- <i>mouse</i> -IgG	Dianova, Hamburg

### 3.1.4. Nukleinsäuren und Nukleotide

ATP, $\alpha$ - <sup>32</sup> P	Hartmann Analytic, Braunschweig
ATP, $\gamma$ - <sup>32</sup> P	Hartmann Analytic, Braunschweig
UTP, $\alpha$ - <sup>32</sup> P	Hartmann Analytic, Braunschweig
dNTPs, NTPs	GE Healthcare, München
m7GpppG	NEB, Frankfurt/Main
OligoA <sub>26</sub>	Dr. SYLKE MEYER, MLU Halle
Poly(A)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>D. melanogaster</i> cDNA-Klon	BACPAC, Oakland (Ca, USA)

### 3.1.5. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR- und Sequenzierprimer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Name	Länge (nt)	Sequenz (5'-3')
EndoG 574-593 intern <i>forward</i>	20	AAC ACg CTg gAg gCA CAC gT
EndoG 820-839 intern <i>forward</i>	20	CCA TCA gTg TgT TTC Agg Tg
EndoG1 612-631 intern <i>forward</i>	20	TCT gTC Tgg CgA ATT TgA gg
pETM-11 <i>reverse</i>	20	ggT ggT gCT CgA gTg Cgg CC
pETM-11 <i>forward</i>	20	gAg ATA TAC CAT gAA ACA TC
T7 Promotor	20	TAA TAC gAC TCA CTA TAg gg
T7 Terminator	19	gCT AgT TAT TgC TCA gCg g

**Tabelle 1:** Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung.

Name	Länge (nt)	Sequenz (5'-3')
EndoG DAGA <i>forward</i>	47	CCg ACg ATC ggg CTA TgA Tg <b>C</b> Cgg gg <b>C</b> CAT ggC CgC CgC Tgg AAA TC
EndoG DAGA <i>reverse</i>	47	gAT TTC CAg Cgg Cgg CCA Tgg <b>CCC</b> Cgg <b>CAT</b> CAT AgC CCg ATC gTC ggT

**Tabelle 2:** Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide zur ortsgerichteten Mutagenese. Ausgetauschte Nukleotide sind fett gedruckt dargestellt.

Name	Länge (nt)	Sequenz (5'-3')
EndoG start <i>NcoI</i>	29	CAT <u>gCC</u> ATg <u>gCT</u> ATg AgT gCT CCT CgA gT
EndoG stop <i>KpnI</i>	30	gAC <u>Tgg</u> TAC <u>CgC</u> TAg ACT TTC TTg CCA TTg
EndoG DAGA start	28	gCg <u>gTA</u> CCA TgA gTg CTC CTC gAg Tgg g
EndoG DAGA stop	55	<u>CCg</u> <u>AAT</u> <u>TCC</u> TAT TTA TCA TCA TCA TCT TTA TAA TCg ACT TTC TTg CCA TTg ATg g
EndoGΔDAGA start	30	CGG <u>gAT</u> CCA TAT ggC TGc CAg TTT gAT TCC
EndoGΔDAGA stop	28	gCC <u>ggA</u> <u>ATT</u> <u>CCT</u> AgA CTT TCT TgC CAT T
EndoGΔN start <i>NcoI</i>	30	CAT <u>ACC</u> <u>ATg</u> <u>gCT</u> gCC AgT TTg ATT CCC CgC
EndoGIΔHis start <i>NdeI</i>	30	ATA <u>gTA</u> CTT <u>CAT</u> <u>ATg</u> TCC AAg CgC AAg gCC
EndoGIΔHis stop <i>EcoRI</i>	30	CAT ggC gCT <u>CgA</u> <u>ATT</u> <u>CCT</u> AAT CAT CAT TTA

**Tabelle 3:** Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide zur Klonierung. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

### 3.1.6. Plasmide

pBR322	[Bolivar <i>et al.</i> , 1977]
pCoHygro	Invitrogen, Karlsruhe
pET21d	Novagen, Darmstadt
pETM-11	EMBL, Heidelberg
pMT/V5-His C	Invitrogen, Karlsruhe
pRSETc	Invitrogen, Karlsruhe
pSP6-L3pre A <sub>45</sub>	[Kerwitz <i>et al.</i> , 2003]

### 3.1.7. Kits und Standards

1 kb DNA <i>ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA <i>ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Big Dye</i> <sup>™</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>High Pure PCR Purification Kit</i>	Roche Biosciences, Mannheim
peqGOLD <i>Plasmid Miniprep Kit</i>	PeqLab, Erlangen
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

Proteinstandard SDS-6H	Roche Diagnostics, Mannheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.1.8. Säulen und Säulenmaterial

AutoSeq™ G50 spin column	GE Healthcare, München
MonoQ™ HR 5/5	GE Healthcare, München
Sephadex™ G-50	GE Healthcare, München
Hydroxylapatit Bio-Gel® HTP Gel	Bio-Rad Laboratories, München
DEAE-Sepharose	GE Healthcare, München
Phenyl-Superose® HR 5/5	GE Healthcare, München
Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare, München
Superdex 200 prep grade HiLoad 16/60	GE Healthcare, München
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden

### 3.1.9. Feinchemikalien

Alle Standardchemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* von Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen.

40% Acrylamid/bis-Acrylamid (19:1)	Roth, Karlsruhe
30% Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Gerbu, Gaiberg
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	PeqLab, Erlangen
SDS	Fluka, Steinheim
Nonidet P-40	Fluka, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol, TE-gesättigt	Roth, Karlsruhe
PMSF	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reagenzien für Bakterienmedien	Gibco, Karlsruhe
TEMED	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

**3.1.10. Sonstiges**

Biorad *Protein Assay* (Bradford)  
Nitrocellulosemembran, Protran  
Dialyseschläuche  
Membranfilter

*PhosphorImager*-Screens  
Röntgenfilme  
Scintillationscocktail  
*Western blot*-Detektion

Bio-Rad Laboratories, München  
Schleicher & Schüll, Dassel  
SERVA, Heidelberg  
RC 58, Porengröße 0,2 µm,  
Schleicher & Schüll, Dassel  
Molecular Dynamics, Fuji  
Kodak  
Lumasafe™ Plus, LSC  
Super Signal, Pierce

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1.1. Sterilisierung

Hitzestabile Lösungen und Glasgeräte wurden für 30 min bei 121°C und Überdruck in einem Autoklaven sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden hingegen sterilfiltriert (0,2 µm Filter, Nalgene).

#### 3.2.1.2. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli*-Kulturen erfolgte in LB-Medium bei 37°C. Zu Selektionszwecken wurden LB-Agarplatten (1,5% Agar) mit entsprechenden Antibiotikazusätzen genutzt.

##### Luria-Bertani (LB)-Medium

1% (w/v) Bactotrypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) NaCl

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt

ggf. 1,5% Agar

#### 3.2.1.3. Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 400 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nach dem die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 erreicht hatte, wurden die Zellen für 10 min bei 4000g und 4°C geerntet. Nacheinander wurde das Zellpellet mit 400 ml, 200 ml und 50 ml eiskaltem, sterilem 10%-igem (v/v) Glycerin gewaschen und letztlich in 1 ml derselben Lösung aufgenommen. Abschließend wurden die Zellen in 50 µl-Aliquots pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.4. Elektroporation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Um Plasmid-DNA in *Escherichia coli* zu transformieren, wurde die Elektroporation verwendet. 50 µl der elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis mit 0,5-2 µl eines Ligationsansatzes bzw. 20-100 ng

Plasmid-DNA gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen) pipettiert. Der Strompuls wurde mit folgenden Eigenschaften ausgelöst: 2500 V, 25  $\mu$ F, 5 ms, 201  $\Omega$ . Die Zellen wurden in 700  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Abschließend wurden die Zellen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert oder zum Heranziehen einer Vorkultur direkt in 100 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben.

### **3.2.1.5. Kultivierung von *Drosophila*-Schneider2-Zellen**

Schneider2-Zellen wurden in *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, Steinheim) bei 25-26°C kultiviert [Schneider, 1972]. Dem Medium wurde zusätzlich 5-10% hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin) und eine Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Gibco, Karlsruhe) zugegeben. Die semiadhärenten Zellen wurden standardmäßig in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen gezogen. In Vorbereitung einer Transfektion erfolgte die Kultivierung in 6-well-Platten. Alle 5 Tage wurden die Schneider2-Zellen in eine neue Kulturflasche, welche frisches Medium enthielt, überführt. Dabei wurden die Zellen 1:10 verdünnt, ohne dass zuvor die Zellzahl bestimmt wurde.

### **3.2.1.6. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Mit Hilfe von Trypanblau kann die Anzahl toter Zellen in einer Kultur bestimmt werden. Bei toten Zellen ist die Zellmembran nicht mehr vollständig intakt und der Farbstoff gelangt in die Zellen, welche unter dem Mikroskop dann blau erscheinen. 20  $\mu$ l einer verdünnten Zelllösung wurden mit 180  $\mu$ l Trypanblau-Lösung gemischt. Die Anzahl der toten Zellen wurde anschließend in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass während der logarithmischen Wachstumsphase die Anzahl der toten Zellen 5% nicht überstieg.

#### Trypanblau-Lösung

0,4% (w/v) Trypanblau in 1x PBS pH 7,4

### **3.2.1.7. Transfektion von Plasmid-DNA durch Calciumphosphatfällung**

Die Transfektion erfolgte in 6-well-Platten mit einem Durchmesser von 3,5 cm. Einen Tag vor der Transfektion wurde eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 3 ml eingestellt. Pro Transfektion wurden 19  $\mu$ g Plasmid-DNA mit 36  $\mu$ l einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt und dann mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l

gebracht. Sollte eine stabile Zelllinie hergestellt werden, wurde noch 1 µg des Selektionsvektors pCoHygro, der für eine Hygromycin-Resistenz codiert, hinzugefügt. Anschließend wurde die CaCl<sub>2</sub>/DNA-Lösung tropfenweise unter ständigem Rühren in 300 µl 2xHBS-Puffer gegeben. Nach 30 bis 40 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die wiederum tropfenweise Zugabe der Transfektionslösung in die 6-well-Platten. Nach 16-24 Stunden wurde durch zweimaliges Waschen mit komplettem Schneider2-Zellmedium nicht aufgenommenes Präzipitat entfernt. Bei einer transienten Transfektion mit einem induzierbaren Expressionsplasmid erfolgte die Induktion nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden mit 500 µM CuSO<sub>4</sub>, in der Regel für weitere 24 h. Nach Ablauf von weiteren 24 h wurden die Zellen entweder geerntet oder für die Immunfluoreszenz (3.2.1.8) weiter bearbeitet. Um stabile Zelllinien herzustellen, wurde 3 Tage nach der Transfektion dem Komplettmedium noch 350 µg/ml Hygromycin zur Selektion zugegeben.

#### 2xHBS-Puffer

50 mM HEPES pH 7,1

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1% (w/v) NaCl

### **3.2.1.8. Immunfluoreszenz in Schneider2-Zellen**

Für Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz wurden stabil oder transient transfizierte Schneider2-Zellen verwendet (3.2.1.7). 24 Stunden nach der Induktion mit 500 µM CuSO<sub>4</sub> wurden die Schneider2-Zellen auf Deckgläschen, die mit 1 mg/ml Poly(L)-Lysin beschichtet waren, in 12-well-Platten zentrifugiert. Mit Ausnahme der Inkubationen mit dem primären und sekundären Antikörpern erfolgten alle folgenden Inkubations- und Waschschrte in den wells bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden kurz mit mit PBS gewaschen und dann für 15 min in 3,7% Paraformaldehyd in PBS (Accustain, Sigma-Aldrich, Steinheim) fixiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS wurden die Zellen 5 min mit 0,3%(v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert und anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nach 30 min Inkubation in der Block-Lösung wurden die Deckgläschen aus den wells entnommen und mit der Zellseite auf einen 30 µl Tropfen primären Antikörpers gelegt, welcher sich auf Parafilm befand. In der Regel wurde der primäre Antikörper 1:1000 in Block-Lösung und der sekundäre Antikörper 1:500 in PBS mit 0,1%(v/v) Triton X-100 verdünnt. Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei 37°C statt. Alle weiteren Waschschrte erfolgten mit 0,1%(v/v) Triton X-100 in PBS. Nach dreimaligen Waschen folgte die Inkubation mit dem sekundären

Antikörper für 1 Stunde in der feuchten, dunklen Kammer. Nach nochmaligem dreimaligem Waschen im Dunklen wurden die Deckgläschen nacheinander kurz in Wasser und 100% Ethanol getaucht und anschließend getrocknet. Abschließend wurde das Deckglas mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger, welcher mit 10  $\mu\text{l}$  *ProLong® Gold Antifade Reagent* mit DAPI (Invitrogen, Karlsruhe) beschichtet war, fixiert. Die Aushärtung erfolgte im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur. Für die Färbung der Mitochondrien wurden die induzierten Zellen in frischem Komplettmedium, welches 100-500  $\mu\text{M}$  MitoTracker® enthielt, für 15-30 min inkubiert. Anschließend wurden sie genauso behandelt wie zuvor beschrieben.

#### 1xPBS

80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
100 mM NaCl

#### Blocklösung

2,5% Milchpulver in 1xPBS  
0,1%(v/v) Triton X-100

### **3.2.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.2.1. Plasmidpräparation**

Zur Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA [Birnboim & Doly, 1976] wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit präpariert. Für größere Mengen Plasmid-DNA wurden des Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet.

#### **3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifizierung von DNA-Fragmente erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Mullis & Faloona, 1987]. In einer 50  $\mu\text{l}$ -Reaktion wurden 50 ng Plasmid-DNA oder 0,5-2  $\mu\text{l}$  einer RT-Reaktion (Reverse-Transkriptions-Reaktion) als *template* eingesetzt. Im Falle einer Kolonie-PCR wurde keine Plasmid-DNA eingesetzt, sondern direkt eine *E. coli*-Kolonie von der LB-Agarplatte gepickt und im Reaktionsmix resuspendiert. Der PCR-Ansatz enthielt des Weiteren den PCR-Puffer, 50 pmol der entsprechenden Primer, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM einer dNTP-Mischung sowie 0,5-2,5 U thermostabile DNA-Polymerase. Nach einer Initialdenaturierung bei 94°C für 2 Minuten erfolgten 25-30 Reaktionszyklen. Ein Reaktionszyklus bestand aus 45 s Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 45 s Hybridisierung bei einer primer-abhängigen Temperatur und DNA-Elongation bei

72°C. Die Elongationszeit war dabei abhängig von der Länge des DNA-Fragments und der verwendeten Polymerase. Die Hybridisierungstemperatur für Primer bis 20 nt Länge wurde mittels der „2+4-Regel“ berechnet, dabei wurden ca. 5-10 K vom errechneten Wert abgezogen. Für längere Primer wurde die Formel  $T_M = 69,3^\circ\text{C} + 41 \cdot \frac{nG+nC}{S} - \frac{650}{S}$  verwendet, wobei S für die Gesamtlänge der Primers und n für die Anzahl an entsprechenden Nukleotiden steht. Aufgrund ihrer *proof-reading*-Aktivität wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die direkt zum Klonieren verwendet wurden, benutzt. Für Kolonie-PCRs wurde dagegen *Taq*-DNA-Polymerase verwendet.

### 3.2.2.3. 5'-Dephosphorylierung

Plasmide, die für eine Klonierung genutzt werden sollten, wurden nach dem Verdau dephosphoryliert. Dabei wurden 1-10 µg DNA für eine Stunde mit 2 U Alkalischer Phosphatase im mitgelieferten Puffer bei 37°C inkubiert. Nach der anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die linearisierten Plasmide mit Ethanol gefällt und in Wasser gelöst.

### 3.2.2.4. Ligation

Das zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten DNA-Fragment wurde in einen Vektor, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen inkubiert wurde, ligiert. Dafür wurde ein 10facher molarer Überschuss des DNA-Fragments mit 20-100 ng Plasmid im Ligationspuffer mit 400 U T4-Ligase gemischt (Endvolumen 15 µl) und entweder für 5 min bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht inkubiert. 1 bis 3 µl des Ligationsansatzes wurden dann zur Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt.

### 3.2.2.5. Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von PCR-Fragmenten und Plasmiden mittels Restriktionsendonukleasen wurde in der Regel nach den Empfehlungen des Herstellers mit Hilfe des mitgelieferten Puffersystems durchgeführt.

### 3.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten wurden Agarose-Gele verwendet. Die Agarosekonzentration war dabei abhängig von der Größe der zu trennenden

Nukleinsäuren und betrug zwischen 0,5-2% (w/v) in 1x TBE. Zur Detektion der geladenen DNA wurden der Agaroselösung vor dem Gießen der Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Um die Proben auftragen zu können, wurden sie mit Ladepuffer gemischt. Als Marker wurden die 1 kb und 100 bp *ladder* (Gibco) verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht und wurde mit einem Videosystem dokumentiert.

#### TBE-Puffer

89 mM Tris pH 8,3  
89 mM Borsäure  
2 mM EDTA

#### Ladepuffer

30% (v/v) Glycerin  
0,25% (v/v) Bromphenolblau  
0,25% (v/v) Xylencyanol  
in 1x TBE

### **3.2.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente zu reinigen, wurden sie aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem *High Pure PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben behandelt.

### **3.2.2.8. DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden durchgeführt, um die korrekte DNA-Sequenz vom Plasmiden nach der Klonierung sicherzustellen. Dabei wurde die Methode des enzymatischen Kettenabbruchs durch Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden angewendet [Sanger *et al.*, 1977]. Durchgeführt wurde die Sequenzierungsreaktion mit dem *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben. Es wurde Plasmid-DNA sowohl aus Mini-, als auch Midi-Präparationen verwendet. Die Analyse erfolgte mit dem *Genetic Analyser* (ABI) mittels Kapillarelektrophorese.

### **3.2.2.9. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese**

Als hochauflösendes Gelsystem zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurde die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Die PAA-Gele setzten sich aus 5-20% Polyacrylamid (Acrylamid:bis-Acrylamid 19:1) und 8,3 M Harnstoff in 1xTBE zusammen. Sie wurden durch Zugabe von 30 µl TEMED und 160 µl 10% APS je 25 ml Gellösung polymerisiert. Vor dem Laden wurden die Nukleinsäureproben mit dem doppelten Volumen an Formamid-Ladepuffer gemischt und 5 min

bei 95°C denaturiert. Die PAA-Gele wurden nach einem Vorlauf von 30 min (Laufpuffer 1xTBE) beladen. Als Marker dienten partiell hydrolysiertes A<sub>16</sub> und *Hpa*I-verdauter, radioaktiv 5'-markierter pBR322-Vektor<sup>35</sup>.

#### Formamid-Ladepuffer

80% (w/v) Formamid

1 mM EDTA

0,2 mg/ml Xylencyanol

0,2 mg/ml Bromphenolblau

### **3.2.2.10. Klonierungen**

EndoGI, EndoGI 1-192, EndoGI 193-359, 14-3-3 $\epsilon$  und 14-3-3 $\zeta$  wurden von Dr. CLAUDIA TEMME kloniert. Die Sequenz von EndoGI, 14-3-3 $\zeta$  und EndoG wurde von den cDNA-Klonen 16I11, 66H2 und 21H12 amplifiziert, während 14-3-3 $\epsilon$  aus S2-Zell-cDNA gewonnen wurde. Entsprechende Restriktionsschnittstellen wurden durch Primer eingefügt. Dabei wurden 14-3-3 $\epsilon$  und 14-3-3 $\zeta$  mit Hilfe von *Bam*HI/*Eco*RI und EndoGI und die verkürzten EndoGI-Varianten mit *Cl*aI/*Eco*RI in den pRSET C-Vektor eingeführt. Um EndoGI $\Delta$ His herzustellen, wurde die amplifizierte cDNA mit Hilfe von *Nde*I/*Eco*RI in den pRSET C-Vektor eingebracht. EndoG und EndoG $\Delta$ N53 wurden mit den Restriktionsenzymen *Nco*I/*Kpn*I in den pETM-11-Vektor [Sauter *et al.*, 2003] ligiert. Um die EndoG $\Delta$ N53 DAGA-Variante herzustellen, wurde die ortsgerichtete Mutagenese an der kompletten cDNA durchgeführt und anschließend mittels *Bam*HI/*Eco*RI in den pRSET C-Vektor eingefügt.

Für die flag-EndoG DAGA-Variante wurde ebenfalls eine ortsgerichtete Mutagenese an der kompletten cDNA durchgeführt, welche dann mit einem 3'-Primer amplifiziert wurde, der das natürliche Stop-Codon durch einen flag-tag ersetzte. Das Produkt wurde über *Kpn*I/*Eco*RI-Schnittstellen mit dem Schneider2-Zell-Expressionsplasmid pMT/V5-His C fusioniert.

Für die EndoGI 1-191 und die EndoG DAGA-Variante wurde ein künstliches Stop-Codon eingebracht. Bei der Klonierung von EndoGI 192-359, EndoG $\Delta$ N53 und EndoG $\Delta$ N53 DAGA wurde entsprechend ein Start-Codon eingeführt.

Die Klonierung und Proteinreinigung von EndoG $\Delta$ N55 wurde von Dr. ANTON MEINHART (MPI Heidelberg) durchgeführt. Das gereinigte Protein wurde mir freundlicherweise von ihm zur Verfügung gestellt. EndoG $\Delta$ N55 wurde in einem bicistronischen Vektor mit EndoGI kloniert. Dabei wurde EndoGI amplifiziert und über die *Nco*I/*Eco*RI-Schnittstellen in den pET21d-Vektor ligiert. EndoG $\Delta$ N55 wurde mit Hilfe eines 5'-Primers amplifiziert, welcher für eine Ribosomenbindestelle und ein

Start-Codon kodiert. Das Produkt wurde über die *EcoRI/NotI*-Schnittstellen in das pET21d-EndoGI-Expressionskonstrukt *in frame* mit einem C-terminalen His-tag kloniert. Alle Konstrukte wurde mittels Sequenzierung überprüft.

### 3.2.3. Proteinchemische Methoden

#### 3.2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurde mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt [Laemmli, 1970]. Zur Denaturierung und vollständigen Entfaltung wurden die Proteinproben vor dem Laden mit SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert.

##### 2x SDS-Probenpuffer

10 mM Tris pH 6,8

20% (v/v) Glycerin

6% (w/v) SDS

5% Mercaptoethanol

0,01% (w/v) Bromphenolblau

#### 3.2.3.2. Coomassie-Färbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde mit Coomassielösung angefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel bis zur Sichtbarkeit der Banden in Entfärber geschüttelt. Dabei liegt die Nachweisgrenze für Coomassie-gefärbte Banden bei 200-400 ng/0,5 cm Bande.

##### Färbelösung

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

0,4 g/l Coomassie Brilliant Blue G 250

0,4 g/l Coomassie Brilliant Blue R 250

##### Entfärber

30% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

#### 3.2.3.3. Western Blotting

Die mittels einer SDS-PAGE (3.2.3.1) aufgetrennten Proteine, wurden in Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Bei dem Verfahren nach KYHSE-ANDERSEN wurde eine *semi-dry*-Blotapparatur (Hoefler, CA, USA) verwendet

[Kyhse-Andersen, 1984]. Um zu überprüfen ob der einstündige Transfer erfolgreich war, wurden die gebundenen Proteine mit Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend die Markerproteine gekennzeichnet. Das gebundene Ponceau S wurde durch TN-Tween-Lösung abgewaschen. Durch Inkubation in 2,5% (w/v) BSA bzw. Milchpulver für 30-60 min wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt (Blocken). Nachfolgend wurde der spezifische primäre Antikörper (Titer 1:1000) direkt in die Blocklösung gegeben und für 1-2 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal für je 5 min mit TN-Tween gewaschen. Der sekundäre Peroxidasegekoppelte Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper (Titer 1:10000 in TN-Tween) wurde für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Im Anschluss wurde erneut je fünfmal 5 min in TN-Tween gewaschen. Nach Inkubation mit dem Super-Signal-Substrat (Pierce) für 5 min wurde die entstandene Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Zum Nachweis von Proteinen mit His-tag wurde ein Ni-NTA-Konjugat verwendet, welches mit Peroxidase gekoppelt ist. Dabei wurde nach dem Blocken die Membran dreimal gewaschen und anschließend mit dem Konjugat (Titer 1:1000) für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Detektion.

<u>Transferpuffer</u>	<u>Ponceau S-Lösung</u>	<u>TN-Tween</u>
48 mM Tris pH 9,2	0,5% (w/v) Ponceau S	50 mM Tris pH 7,5
39 mM Glycin	1% (v/v) Essigsäure	0,2% (v/v) Tween
1,3 mM SDS		150 mM NaCl
20% (v/v) Methanol		

#### **3.2.3.4. Silberfärbung**

Um geringer konzentrierte Proteinbanden in SDS-Gelen zu detektieren, wurde die Silberfärbung angewendet [Nesterenko *et al.*, 1995]. Die Methode ist zur besseren Übersicht in Tabelle 4 wiedergegeben.

Aktion	Lösung	Zeit
Fixieren	60 ml 50% (v/v) Aceton + 1,5 ml 50 % (w/v) TCA + 25 µl 37 % (v/v) HCHO	5 min
Waschen	H <sub>2</sub> O	5 min
Vorbehandeln (1)	60 ml 50% (v/v) Aceton	5 min
Vorbehandeln (2)	60 ml H <sub>2</sub> O + 0,1 ml 10% (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	1 min
Waschen	H <sub>2</sub> O	3 x 5 sec
Imprägnieren	60 ml H <sub>2</sub> O + 0,8 ml 20% (w/v) AgNO <sub>3</sub> + 0,6 ml 37% (v/v) HCHO	8 min
Waschen	H <sub>2</sub> O	2 x 5 sec
Entwickeln	60 ml H <sub>2</sub> O + 1,2 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 25 µl 37% (v/v) HCHO + 25 µl 10% (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	10-60 sec
Stoppen	1% (v/v) Essigsäure	30 sec
Waschen	H <sub>2</sub> O	3 x 5 sec

**Tabelle 4:** Silberfärbung von SDS-PAGE nach [Nesterenko *et al.*, 1995]

### 3.2.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

#### Bradford-Test

Die Proteinbestimmung erfolgte standardmäßig nach BRADFORD [Bradford, 1976]. Bovines Serumalbumin (BSA) diente als Proteinstandard zur Herstellung einer Eichkurve. Das Reagenz von BioRad wurde mit der Proteinlösung für 5 min inkubiert. Die Detektion des entstandenen Farbkomplexes erfolgte durch Messung der Absorption bei 595 nm.

#### Absorptionsmessung

Bei reinen Proteinlösungen wurde die Konzentration durch Messung der Absorption ermittelt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz. Dabei entspricht E der Extinktion, c der Konzentration der absorbierenden Substanz, d der Schichtdicke und ε der molaren Absorptionskoeffizienten.

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

Gleichung 1

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm Protean™ von DNASTAR, Inc. ermittelt.

#### SDS-PAGE

War die Konzentration des Proteins unter der Nachweisgrenze für den BRADFORD-Test bzw. war die Lösung nicht völlig frei von Kontamination wurde diese mit Hilfe eines SDS-Gels (3.2.3.1) bestimmt. Dafür wurden verschie-

dene Mengen der zu bestimmenden Proteinlösung und für eine Eichreihe definierte Mengen BSA auf einem SDS-Gel getrennt. Nach der Coomassie-Färbung wurde das Gel dann gescannt und die Proteinmengen mit der Eichreihe bestimmt.

### 3.2.3.6. Expression und Reinigung von EndoG $\Delta$ N53

Zur Expression von EndoG $\Delta$ N53 wurden *E. coli* BL21(DE3) Codon+ gleichzeitig mit dem EndoG und dem EndoGI $\Delta$ His Plasmid transformiert. Um die Expression beider Proteine sicherzustellen, wurde sowohl mit Ampicillin (EndoGI), als auch Kanamycin (EndoG) selektiert. Anzucht der Zellen, Induktion, Aufschluss und Ni-NTA-Chromatographie erfolgten wie für EndoGI beschrieben (siehe 3.2.3.7). Nach der Ni-NTA-Chromatographie wurden die EndoG $\Delta$ N53-enhaltenden Fraktionen vereinigt und gegen Phenylsuperose-Puffer dialysiert. Im Anschluss erfolgte eine Fällung mit 10% Ammoniumsulfat im Eisbad für 1 h. Mittels Zentrifugation wurden ausgefällte Proteine entfernt und der Überstand auf eine 1 ml-Phenylsuperose-Säule geladen. Die Elution erfolgte in einem Volumen von 20 ml mit einem sinkendem Ammoniumsulfat-Gradienten. Alle EndoG $\Delta$ N53-enhaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen Hydroxylapatit-Puffer dialysiert. Das Protein wurde auf eine 1 ml Hydroxylapatit-Säule geladen und mit einem 10 ml-Gradienten bis zu 0,2 M Kaliumphosphat im gleichen Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> eluiert.

<u>Phenylsuperose-Puffer</u>	<u>Hydroxylapatit-Puffer</u>
50 mM Tris pH 7,5	20 mM Imidazol pH 7,4
20% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin
20 mM KCl	50 mM KCl
0,02% (v/v) NP40	1 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5 mM DTT	1 mM DTT

### 3.2.3.7. Expression und Reinigung von 14-3-3 $\epsilon$ und 14-3-3 $\zeta$ , EndoGI und EndoGI-Varianten

Zur rekombinanten Überexpression wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) Codon+ mit dem jeweiligen Expressionskonstrukt transformiert. Die Anzucht erfolgte anschließend bei 37°C in LB-Medium. Erreichte die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8, wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Temperatur auf 25°C gesenkt. Nach 3 h wurden die Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer, der mit 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml Pepstatin und 2  $\mu$ g/ml Leupeptin versetzt war, resuspendiert und durch Ultraschall

aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation bei 30000g, 4°C für 30 min wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die folgende Proteinreinigung erfolgte bei 4-8°C. Ni-NTA-Agarose wurde zunächst in Lysepuffer äquilibriert und 1 ml Ni-NTA-Agarose mit den Proteinextrakten gemischt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation im Kühlraum auf einem Rollschüttler. Das Säulenmaterial wurde dann zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Ni-NTA-Agarose wurde nacheinander mit 20 ml Lysispuffer und mit 10 ml Lysepuffer, der 10 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Die Proteinelution erfolgte in einer Leersäule von Bio Rad, in welche die Ni-NTA-Agarose nach dem letzten Waschschrift gefüllt wurde. Es erfolgte eine Stufenelution mit je 2 ml Lysepuffer, welcher 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol enthielt. Für den nächsten Reinigungsschritt wurden die Eluate mit KCl-freiem MonoQ-Puffer 1:3 verdünnt und auf eine 1 ml MonoQ FPLC-Säule geladen. Nach einem 10 ml Waschschrift mit MonoQ-Puffer erfolgte die Elution gebundener Proteine in einem 20 ml Salzgradienten von 100 bis 500 mM KCl. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen, die das überexprimierte Protein enthielten, wurden vereinigt und mit einem *Amicon Ultra Centrifugal Filter Device* (Millipore, Schwalbach) durch Zentrifugation konzentriert. Im Anschluss wurden 2-4 ml des konzentrierten Proteins auf eine mit Puffer äquilibrierte Superdex 200 *prep grade* 10/60 Säule geladen. In einem separaten Lauf wurden Blue Dextran, BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Ribonuklease A als Marker analysiert.

<u>Lysepuffer</u>	<u>MonoQ-Puffer</u>	<u>Puffer der Gelfiltration</u>
50 mM Tris pH 7,5	50 mM Tris pH 7,5	50 mM Kaliumphosphat pH 7,4
10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin
300 mM KCl	100 mM KCl	100 mM NaCl
0,02% (v/v) NP40	0,02% (v/v) NP40	
	1 mM DTT	

### 3.2.3.8. Expression und Reinigung von EndoG $\Delta$ N55

Expression und Reinigung von EndoG $\Delta$ N55 und EndoGI aus dem bicistronischen Konstrukt erfolgte durch Dr. ANTON MEINHART (MPI, Heidelberg). Das gereinigte Protein wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Expression erfolgte in BL21 (DE3) CodonPlus RIL (Stratagene, Waldbronn). Die Zellen wurden in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (OD<sub>600</sub>) angezogen und anschließend auf 20°C abgekühlt. Die mit 0,5 mM IPTG induzierte Expression erfolgte über Nacht. Die Zellen wurden geerntet und in 50 mM Tris (pH 8,0), 250 mM NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und durch Ultraschall

aufgeschlossen. Das Lysat wurde zentrifugiert und der Überstand in 50 mM Tris (pH 8,0), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM DTE verdünnt und auf eine MonoQ-Säule geladen. Während EndoGI an die Säule gebunden wurde, befand sich EndoGΔN55 komplett im Durchfluss und wurde anschließend auf eine äquilibrierte 1 ml-*HiTrap*-Heparin-Säule (50 mM Tris (pH 8,0), 2 mM DTE) geladen. Das gebundene EndoGΔN55 wurde mit einem 20 ml Gradienten bis 1 M NaCl eluiert und durch eine Gelfiltration auf einer Superdex 75 in 50 mM Hepes (pH 7,5), 100 mM NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM DTE vollständig gereinigt.

### 3.2.3.9. Expression und Renaturierung von EndoGΔN53 DAGA

Zur Gewinnung von EndoGΔN53 DAGA wurden die Transformation, Expression und der Aufschluss genauso wie für EndoGI beschrieben durchgeführt (siehe 3.2.3.7). Das nach dem Aufschluss und der Zentrifugation gewonnene Pellet wurde in Harnstoffpuffer aufgenommen und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 30000g für 15 min wurde der Überstand mit 1 ml Ni-NTA-Agarose, welche zuvor in Harnstoff-Puffer äquilibriert wurde, gemischt und anschließend im Kühlraum auf dem Rollschüttler für 2h inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wurde nacheinander mit 20 ml Harnstoff-Puffer und mit 10 ml Harnstoff-Puffer pH 7,0 gewaschen. Die Proteinelution erfolgte wiederum in einer Leersäule (Biorad), in welche die Ni-NTA-Agarose nach dem letzten Waschschrift gefüllt wurde. Zur Elution wurde 3x2 ml Harnstoff-Puffer mit pH 4,0 auf die Säule gegeben. Anschließend wurden die Eluate mit Harnstoff-Puffer auf eine Konzentration unter 0,5 mg/ml verdünnt und dann stufenweise im Kühlraum mittels Dialyse renaturiert. Dafür wurden die Proteine jeweils für 12 h nacheinander in folgenden Puffern dialysiert: Renaturierungspuffer mit 0,7 M bzw. 0,4 M L-Arginin und Renaturierungspuffer ohne Zusätze. Die Proteinlösung wurde anschließend durch Zentrifugation (20000g, 4°C, 30 min) von präzipitierten Proteinen befreit. Der Überstand wurde mittels einer *Amicon Ultra Centrifugal Filter Device* (Millipore, Schwalbach) konzentriert und auf eine Superdex 200 *prep grade* 10/60-Säule geladen und wie für EndoGI beschrieben chromatographiert (siehe 3.2.3.7).

<u>Harnstoff-Puffer</u>	<u>Renaturierungspuffer</u>
8 M Harnstoff	20 mM Tris pH 8,0
10 mM Tris pH 8,0	10% (v/v) Glycerin
100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM KCl
	0,02% (v/v) NP40
	1 mM DTT

### 3.2.3.10. Massenspektrometrie

Die Messung und Auswertung der Molmassenbestimmungen erfolgte freundlicherweise durch Frau Dr. ANGELIKA SCHIERHORN von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle. Zur Identifizierung von EndoGI und EndoG wurden Coomassie-gefärbte ausgeschnittene Proteinbanden mit Trypsin verdaut. Das entstandene Peptidgemisch wurde in ein CapLC injiziert und auf einer *Symmetry300-C<sub>18</sub>-trap*-Säule entsalzt. Nach der Trennung auf einer *dC<sub>18</sub>-Atlantis-NanoEase*-Säule wurden die Peptide nach Elektrospray-Ionisation mit einem Q-TOF-2-Massenspektrometer (Micromass) analysiert. MS/MS Messungen wurden an doppelt und dreifach geladenen Ionen ausgeführt. Die entstanden Daten wurden mittels MASCOT mit der MSDB-Datenbank verglichen.

Für die Überprüfung der mutierten EndoG $\Delta$ N55 wurde das Protein mit einer *ZipTip-C4*-Säule entsalzt und anschließend mittels des Q-TOF-2-Massenspektrometers analysiert. Für die Peptidanalyse wurde das entsalzte Protein mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide wurde mit DTT reduziert und die Cysteine mit Jodacetamid carbamidomethyliert. Die anschließenden Peptid-*fingerprint*-Massenspektren wurden mit einem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker) aufgenommen.

### 3.2.3.11. Analytische Ultrazentrifugation

Alle Proteine wurden in UZ-Puffer dialysiert. Alle Sedimentationsgleichgewichtsexperimente wurden an der Optima XL-A (Beckman Instruments) und in einem An50Ti Rotor, ausgestattet mit Doppelsektorzellen, durch Dr. HAUKE LILIE (MLU Halle) durchgeführt. Die Daten wurden bei 10000 rpm, 20°C und bei Detektionswellenlängen von 230, 280 und 290 nm aufgenommen. Die apparente molekulare Masse der Proteine wurde mittels der von Beckman Instruments bereitgestellten Software berechnet. Die Pufferdichte wurde wegen des Glyceringehalts auf 1,026 g/ml festgelegt.

#### UZ-Puffer

50 mM Kaliumphosphat pH 7,4

100 mM KCl

10% (v/v) Glycerin

### 3.2.3.12. Messung des Circular dichroismus

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Spektropolarimeter J-710 (Jasco) aufgenommen. Es wurden Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0,01 beziehungsweise 0,05 cm verwendet. Zur Verminderung der auftretenden Rauschens wurden von jeder Probe 50 Spektren akkumuliert. Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität  $\Theta$  in die mittlere molare Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  erfolgte mit Hilfe der Gleichung 1.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Gleichung 2

Dabei sind  $\Theta$  die gemessene Elliptizität in mdeg,  $[\Theta]_{MRW}$  die mittlere molare Elliptizität in  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$ ,  $M$  die Molmasse in Dalton,  $c$  die Proteinkonzentration in  $\text{mg/ml}$ ,  $d$  die Schichtdicke der Küvette in  $\text{cm}$  und  $N_A$  die Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül.

### 3.2.4. Herstellung radioaktiv markierter Substrate

#### 3.2.4.1. Herstellung von homogen markiertem Poly(A)

Durch Verlängerung von Oligo(A) durch eine unspezifische Polyadenylierungsreaktion wurde homogen markiertes Poly(A) hergestellt [Körner & Wahle, 1997]. In einer 50  $\mu\text{l}$  Reaktion wurden 1 ng Oligo(A) in Polyadenylierungspuffer mit 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0,5 mM DTT, 1 mM ATP, 30  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP, 20 U RNasin und 2 pmol PAP531 1 h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Ethanolfällung wurde das Pellet in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Nicht eingebaute Mononukleotide wurden mittels einer Sephadex G-50 *spin column* abgetrennt (3.1.8). Durch Messung der Radioaktivität eines Aliquots konnte die spezifische Aktivität berechnet werden. Das hergestellte Poly(A) war durchschnittlich 500 nt lang.

#### 2xPolyadenylierungspuffer

50 mM Tris pH 7,5  
20% (v/v) Glycerin  
80 mM KCl  
0,02% (v/v) NP40  
0,1 mM EDTA  
0,2 mg/ml mBSA

### 3.2.4.2. *In-vitro*-Transkription

Um die Spezifität der EndoG zu untersuchen wurden radioaktiv markierte RNAs durch *in-vitro*-Transkription synthetisiert. In einer 50 µl Reaktion wurden 2-5 µg linearisiertes Plasmid mit je 0,5 mM ATP und CTP, 0,1 mM UTP und GTP, 0,1 mg/ml mBSA, 10 mM DTT, 30-50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP, 1 mM m<sup>7</sup>GpppG, 52 U RNasin und 20 U SP6-RNA-Polymerase im mitgelieferten Puffer für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Transkripte mit 2,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2,5x Volumen Ethanol gefällt und das Pellet direkt in Formamid-Ladepuffer (3.2.2.9) gelöst. Nach einer 5 minütigen Denaturierung bei 95°C wurden die radioaktiv markierten RNAs auf ein 8%iges denaturierende Harnstoff-Gel (3.2.2.9) geladen. Nach Beendigung des Laufes wurde die Lage der Transkripte durch kurzes Auflegen eines Röntgenfilms bestimmt und jene mit korrekter Länge aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden über Nacht bei 37°C und konstanten Schütteln in Elutionspuffer inkubiert. Anschließend wurden die eluierten RNAs Phenol-Chloroform-extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das entstandene Pellet wurde in DEPC-Wasser gelöst.

#### Elutionspuffer

500 mM Ammoniumacetat  
10% (v/v) Phenol  
0,5% (v/v) SDS  
1 mM EDTA

Als Matrize für die Transkription wurde das Plasmid pSP6-L3preA<sub>45</sub> verwendet. Dieses Plasmid enthält die L3-Polyadenylierungssequenz der Adenovirus 2 *major-late*-Transkriptionseinheit und einen Plasmid-kodierten Poly(A)-Schwanz von 45 Nucleotiden [Kerwitz *et al.*, 2003]. Um L3preA<sub>45</sub>-RNA herzustellen wurde das Plasmid mit *BbsI* linearisiert. Zur Produktion von L3preA<sub>45</sub>N<sub>63</sub> wurde das Plasmid mit *MbiI* geschnitten. Die anschließende Transkription erfolgte mit SP6-RNA-Polymerase.

### 3.2.4.3. Radioaktive 3'-Markierung

Eine in [Körner & Wahle, 1997] beschriebene Methode wurde verwendet um 3'-markiertes Poly(A) herzustellen. In einer unspezifischen Polyadenylierungsreaktion wurden 9 pmol PolyA<sub>200</sub>, 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 20 U RNasin und 2 pmol PAP531 in Polyadenylierungspuffer (3.2.4.1) für 40 min bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Ethanolfällung wurde das Pellet in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und zur Abtrennung nicht eingebauter Mononucleotide über eine Sephadex G-50 *spin column* gereinigt.

#### 3.2.4.4. Radioaktive 5'-Markierung

Um RNA bzw. DNA radioaktiv am 5'-Ende zu markieren, wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet (3.1.3). In einer 50 µl-Reaktion wurden 2-5 µg RNA bzw. DNA, 10-20 µCi [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP und 5 U PNK im mitgelieferten Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Ethanol-fällung wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst. Mittels einer Sephadex G50 *spin column* wurden nicht eingebaute Mononukleotide abgetrennt.

#### 3.2.5. Aktivitätstests

##### 3.2.5.1. TCA-Fällungsexperimente

Um die Nukleaseaktivität von EndoG quantitativ zu verfolgen, wurde der TCA-Fällungstest eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach KÖRNER [Körner & Wahle, 1997]. In einer 20 µl-Reaktion wurden 54 µM nicht fraktioniertes, unmarkiertes Poly(A) (Konzentration bezüglich Mononukleotide), 20000-50000 cpm homogen markiertes Poly(A), 150 mM KCl, 1 mM DTT und 1 mM Magnesiumacetat in Reaktionspuffer mit 1 µl einer EndoG-Fraktion bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EndoG gestartet. Wenn nötig, wurde die EndoG-Konzentration mit Verdünnungspuffer angepasst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. 75 µl eiskalte 16%ige TCA wurden unmittelbar vor der Zentrifugation (4°C, 20800g, 10 min) zugegeben. Während Polynukleotide durch TCA gefällt werden, sind Mono- und Oligonukleotide bis 20 nt Länge, welche während der Inkubation mit EndoG entstehen, säurelöslich und verbleiben im Überstand. 75 µl des Überstands wurden mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit gemischt und die enthaltene Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen. Die Radioaktivität einer Kontrolle ohne Enzym diente als Leerwert. Die entstandene Menge an Mono- und Oligonukleotiden wurde dann mit Hilfe der spezifische Radioaktivität des Poly(A)s berechnet. Erfolgte eine Vorinkubation von mehreren Proteinen wurde die Reaktion durch Zugabe von Poly(A) gestartet.

##### Reaktionsspuffer

20 mM HEPES pH 7.4  
10% (v/v) Glycerin  
0,02% (v/v) NP40  
0,2 g/l mBSA

##### Verdünnungspuffer

20 mM HEPES pH 7.4  
10% (v/v) Glycerin  
0,02% (v/v) NP40  
0,2 g/l mBSA  
1 mM Magnesiumacetat  
1 mM DTT  
150 mM KCl

Die Affinität der EndoG-EndoGI-Interaktion wurde durch Titration von EndoG (konstante Konzentration) mit EndoGI beziehungsweise EndoGI-Varianten bestimmt. Dabei erfolgte eine Vorinkubation für 90 min in Verdünnungspuffer (3.2.5.1). Die Daten wurden nach Gleichung 3 ausgewertet.

$$I = \frac{(C_{\text{EndoG}} + C_{\text{EndoGI}} + K_D) - \sqrt{(C_{\text{EndoG}} + C_{\text{EndoGI}} + K_D)^2 - 4 \cdot C_{\text{EndoG}} \cdot C_{\text{EndoGI}}}}{2 \cdot C_{\text{EndoG}}} \cdot I_{\text{max}}$$

Gleichung 3

I bedeutet die Inhibierung in Prozent. Da die tatsächliche EndoG-Konzentration von der gemessenen abwich (siehe 4.3.4), wurden alle Variablen frei angepasst. Dabei wurden  $K_D$ -Werte bestimmt, die sehr unabhängig gegenüber der eingesetzten EndoG-Konzentration waren. Alle berechneten  $K_D$ -Werte basieren auf mindestens vier unabhängigen Titrationsen.

Die Affinität der fast inaktiven Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K (EndoG<sup>var</sup>) für EndoGI wurde mittels eines Konkurrenzexperimentes bestimmt. Eine konstante Menge EndoG $\Delta$ N53 wurde mit steigenden Konzentrationen EndoG<sup>var</sup> inkubiert, bevor eine konstante Konzentration EndoGI zugegeben wurde. Die resultierende Nukleaseaktivität wurde nach 90 min Vorinkubation zur Komplexbildung bestimmt. Es wurde angenommen, dass während des Experiments keine gemischten EndoG-Dimere auftraten. Für die EndoG $\Delta$ N53-EndoGI-Interaktion wurde ein zuvor experimentell bestimmter  $K_D^1$ -Wert von 0,2 pM festgelegt. Durch diesen Ansatz konnte der  $K_D^2$ -Wert für die inaktive EndoG $\Delta$ N55 N187K (EndoG<sup>var</sup>) und EndoGI berechnet werden. Dabei wurde der Umsatz durch EndoG $\Delta$ N53 bei einer Anfangskonzentration von 50  $\mu$ M Substrat (circa  $K_m$ ) mit steigenden Konzentrationen EndoG<sup>var</sup> bestimmt. Die aus den Progresskurven ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die eingesetzte Substratkonzentration nach Gleichung 4 zur Bestimmung von  $K_m$ -Werten nach DIXON aufgetragen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{max}} \cdot S_0 \cdot K_D^1} \cdot \left( I_0 - \frac{I_0 + [\text{EndoG}^{\text{var}}]_0 + K_D^2}{2} + \sqrt{\frac{(I_0 + [\text{EndoG}^{\text{var}}]_0 + K_D^2)}{4} - I_0 + [\text{EndoG}^{\text{var}}]_0} \right) + \frac{1}{V_{\text{max}}} \cdot \left( 1 + \frac{K_m}{S_0} \right)$$

Gleichung 4

Es wurde eine kompetitive Inhibierung angenommen. Dabei ist v die Geschwindigkeit des Substratumsatzes bei einer bestimmten initialen Substratkonzentration,  $V_{\text{max}}$  die maximale Geschwindigkeit des Substratumsatzes,  $K_m$  die Substratkon-

zentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit,  $S_0$  die initiale Substratkonzentration,  $I_0$  die initiale Konzentration von EndoGI und  $[\text{EndoG}^{\text{var}}]_0$  die initiale Konzentration von dimerem  $\text{EndoG}^{\text{var}}$ , welches mit EndoG um EndoGI konkurriert. Alle Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Die Geschwindigkeitskonstante für die Inhibitor-Freisetzung aus dem EndoG-EndoGI-Komplex ( $k_{\text{off}}$ ) wurde durch den Anstieg an Nukleaseaktivität nach Zugabe von  $\text{EndoG}^{\text{var}}$  zum vorinkubierten EndoG-EndoGI-Komplex ermittelt. Um die Irreversibilität der Reaktion sicherzustellen, wurde  $\text{EndoG}^{\text{var}}$  im Überschuss eingesetzt. Die Gleichung 5 beschreibt die Proportionalität der Geschwindigkeitsänderung des Substratumsatzes und die Zunahme an aktivem Enzym. Wobei  $v(c)$  die Geschwindigkeit nach Erreichen des Gleichgewichts,  $v(t)$  die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t$  und  $k_{\text{off}}$  die Geschwindigkeitskonstante der Inhibitorfreisetzung vom EndoG-EndoGI-Komplex ist.

$$v(c) - \frac{v(t)}{v(c)} = \exp(-k_{\text{off}} \cdot t)$$

Gleichung 5

Die Integration der Gleichung 5 ergibt die Zeitabhängigkeit der Produktbildung und erlaubt die Berechnung von  $k_{\text{off}}$  (siehe Gleichung 6). Dabei ist  $P$  die Produktkonzentration und  $n$  der *offset*. Die Progresskurve der Zunahme des Substratumsatzes wurde unter Berücksichtigung des maximalen Substratumsatzes für die simultane Inkubierung aller Komponenten ausgewertet.

$$P(t) = n + v(c) \cdot t + \frac{v(c)}{k_{\text{off}}} \cdot \exp(-k_{\text{off}} \cdot t)$$

Gleichung 6

### 3.2.5.2. Analyse mittels denaturierender PAGE

Um die Substratspezifität der Endonuklease G zu ermitteln, wurden verschiedene RNAs, Poly(A) und DNA getestet. In einer 20  $\mu\text{l}$ -Reaktion wurden 100-500 fmol radioaktives Substrat, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM Magnesiumacetat und 20 U RNasin in Reaktionspuffer (3.2.5.1) mit  $\text{EndoG}\Delta\text{N53}$  bei 30°C inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden je 2  $\mu\text{l}$  aus dem Reaktionsansatz entnommen und in 4  $\mu\text{l}$  Formamid-Ladepuffer gegeben. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C

wurden die RNAs mit Hilfe einer 15% denaturierenden Harnstoff-PAGE (3.2.2.9) aufgetrennt und mittels *PhosphorImaging* detektiert.

## 4. Ergebnisse

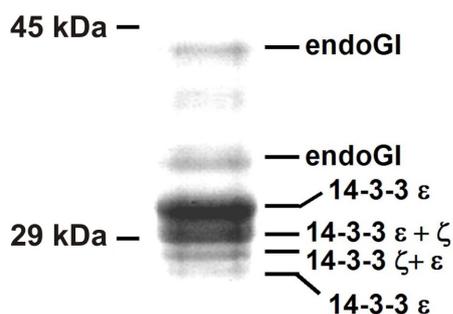
### 4.1. Der Endonuklease G-Inhibitor

Während der Untersuchung des mRNA-Abbaus in *Drosophila melanogaster*, wurde ein Inhibitor einer Poly(A)-hydrolysierenden Aktivität in Schneider2-Zellextrakt gefunden [Temme, 2004].

In Fortsetzung dieser Arbeit konnte dieser endogene Inhibitor so weit gereinigt werden, dass eine Identifizierung des betreffenden Proteins mittels Massenspektrometrie möglich war [Weißbach, 2005]. Es wurden drei mögliche Proteine identifiziert: die beiden *Drosophila* 14-3-3 Proteine,  $\epsilon$  und  $\zeta$ , und ein unbekanntes Protein, welches durch das *Drosophila*-Gen CG4930 kodiert wird (siehe Abbildung 4). Der *open-reading-frame* aller drei Proteine wurden in Expressionsplasmide kloniert, in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt (3.2.3.7). Auf ihre Fähigkeit untersucht, die Poly(A)-abbauende Aktivität zu inhibieren, zeigte sich, dass die beiden 14-3-3-Proteine dazu nicht in der Lage waren. Das CG4930-Protein hingegen konnte die nukleolytische Aktivität in gleichem Maße wie das gereinigte endogene Protein unterbinden.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde die Nuklease identifiziert, die durch das CG4930-Protein inhibiert wird. Es handelte sich um das *Drosophila*-Homologe der Endonuklease G (EndoG), welche in dem *Drosophila*-Gen CG8862 kodiert ist. Aufgrund der Homologie des CG8862-Proteins zur EndoG-Familie wurde das *Drosophila*-Protein ebenfalls EndoG getauft und ihr Inhibitor als EndoG-Inhibitor (EndoGI) bezeichnet.

Bei EndoGI handelt es sich um ein 359 Aminosäuren großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 40,6 kDa, was in Übereinstimmung mit dem identifizierten Protein liegt (Abbildung 4). Es konnten Orthologe in allen 12 sequenzierten Genomen der *Drosophila*-Gattung gefunden werden. Die Sequenz-



**Abbildung 4:** 10%iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der finalen Gelfiltrationssäule von der Reinigung des endogenen Inhibitors aus Schneider2-Zellen. Vorhandene Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie ausgewertet. Die identifizierten Proteine und die Größe des Proteinmarkers sind angezeigt. Dabei wurden je Proteinbande mehrere Proteine identifiziert, angezeigt ist jedoch jeweils nur das Protein, von welchem die meisten Peptide gefunden wurden. Die zweite EndoGI-Bande ist wahrscheinlich auf Proteolyse zurückzuführen.

identität liegt zwischen 60-96%. Allerdings konnten keine Proteine mit homologen Sequenzen in anderen Genomen gefunden werden. Es gibt auch keine Sequenz-Homologie zu NuiA, dem Inhibitor der NucA aus *Anabaena spec.*, der einzigen anderen EndoG-homologen Endonuklease, zu dem ein spezifischer Inhibitor vorliegt [Meiss *et al.*, 1998].

Durch Analyse der Primär-Sequenz konnte festgestellt werden, dass EndoGI aus zwei tandemartig angeordneten, homologen Domänen besteht. Diese weisen eine 50%ige Sequenzidentität über 140 Aminosäuren (29-168 und 213-352) auf. Diese Struktur ist in allen Orthologen von EndoGI konserviert. In Abbildung 5 sind die beiden Hälften von EndoGI miteinander verglichen.

1	MSKRKAEDTQSDKMTAEKVAQNDYTIGLV--DFVKDYQKLIETRVQVDEIVDDDV	EndoGI 1
192	TTPGELSADDAALSGEFEATLTKENPLEEYRTLMKRFVLTKIIVPDSV	EndoGI 2
55	TKENFDRTAAAAARDVIWRLLFDEAGTSQSNTKASQLLEFYRGDACFYDPTPYNEW	EndoGI 1
241	HQASVKKIAAAAAREIIWKLLFDGTPSAE-DQNKAAELIQEYKGDAGFYGPDDYNSW	EndoGI 2
111	IVKLRDEVLLKELLDFWRDVLVKKQLGPCWSRSDSLEFSDDTPPLEFYAHAGCTAP	EndoGI 1
296	IFNLRDEVLLKELLDFWRDKMVKMELGSPCARDSDYYDNEPLPFEFYEKAGCKAP	EndoGI 2
167	FAASLKVRAALEEQASLDQGPATP	EndoGI 1
352	FEQPVNDD	EndoGI 2

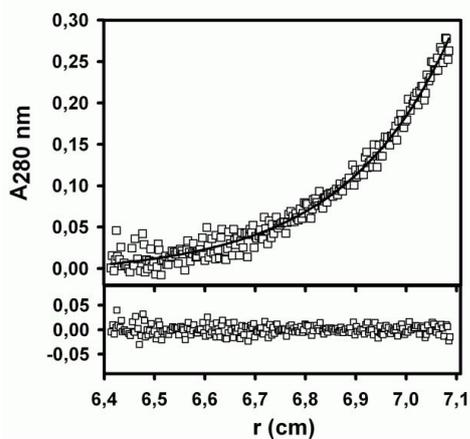
**Abbildung 5:** Vergleich der zwei EndoGI-Domänen. Die Nummern der Aminosäuren stehen links. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

#### 4.1.1. EndoGI liegt als Monomer vor

NuiA, der Inhibitor der *Anabaena*-Nuklease NucA, wurde als Monomer beschrieben [Meiss *et al.*, 2000]. Um festzustellen, ob auch EndoGI natürlicherweise eine monomere Struktur besitzt, wurde EndoGI mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht.

Die analytische Ultrazentrifugation untersucht die Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte. Dabei wird während der Zentrifugation die Absorption des gelösten Proteins bestimmt. Diese Absorption ist eine der Molekülkonzentration proportionale Größe [Schubert]. Es können zwei verschiedene Verfahren angewendet werden: der Sedimentationsgeschwindigkeits- und der Sedimentationsgleichgewichtslauf.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt. Dabei wird der Sedimentationskoeffizient bestimmt. Dieser entspricht der Geschwindigkeit mit der sich die Proteine unter dem Einfluss von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegen [Pröll, 2005]. Dabei tritt bei niedrigen Drehzahlen ein Gleichgewicht zwischen der Proteinsedimentation und ihrer Diffusion ein. Grundvoraussetzung für das Eintreten dieses Gleichgewichts ist eine genügend lange Laufzeit der Zentrifuge. Diese Methode eignet sich damit zur Bestimmung der Molmasseverteilung [Schubert].

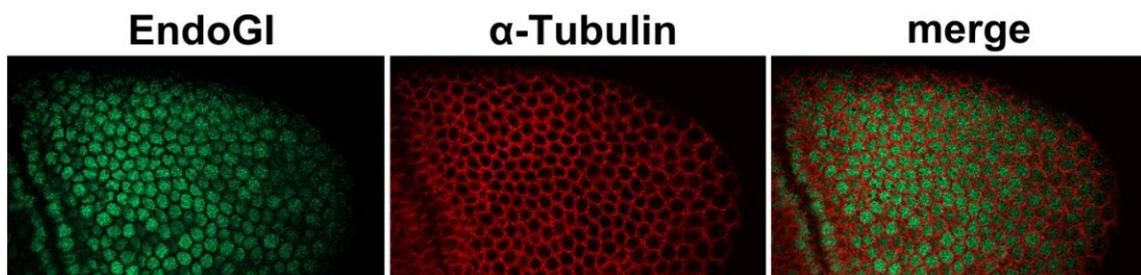


**Abbildung 6:** Ultrazentrifugation von EndoGI. 1  $\mu\text{M}$  EndoGI wurde für 80 h bei 20000 rpm und 20°C zentrifugiert. Nachdem das Gleichgewicht eingetreten war, wurde eine apparente Molekülmasse von  $45 \pm 2$  kDa bestimmt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Abweichung des gemessenen Signals von der, nach der Svedberg-Gleichung berechneten, Anpassung.

EndoGI wurde in Sedimentationsgleichgewichtsläufen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen untersucht. Die Zentrifugation erfolgte bis das Gleichgewicht eingetreten war. Dabei verhielt sich EndoGI bei Konzentrationen von 1-6  $\mu\text{M}$  als Monomer. In Abbildung 6 sind die gemessenen Daten eines Laufes mit 1  $\mu\text{M}$  EndoGI zu sehen. Die Daten wurden bei 280 nm aufgenommen und mit Hilfe der Svedberg-Gleichung konnte ein apparentes Molekulargewicht von  $45 \pm 2$  kDa berechnet werden. Da das erwartete Molekulargewicht des rekombinanten Proteins bei 44,5 kDa liegt, stimmt die apparente Molekularmasse mit einem monomeren Zustand überein.

#### 4.1.2. EndoGI befindet sich im Zellkern

EndoGI, als Inhibitor einer potentiell toxischen Nuklease [Schäfer *et al.*, 2004], könnte möglicherweise eine lebenswichtige Funktion innerhalb der Zelle ausüben. Die eukaryotischen Endonukleasen G wurden als mitochondriale Proteine beschrieben [Dake *et al.*, 1988]. Wenn sich auch die *Drosophila*-EndoG in den Mitochondrien befindet, so stellt sich die Frage, wo EndoGI lokalisiert ist. Daher erfolgte die Bestimmung der Lokalisierung von endogenem EndoGI mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Für EndoGI stand ein Kaninchen-Immuns Serum zur Verfügung, welches im *Western blotting* keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen aufwies. Es wurden *Drosophila*-Embryonen im Stadium 4 für das Experiment verwendet. Die hier gezeigten Aufnahmen wurden von Dr. CLAUDIA TEMME gemacht und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Nukleäre Lokalisierung von EndoGI in *Drosophila*-Embryonen. Es werden konfokale Aufnahmen von *Drosophila*-Embryonen der Phase 4 gezeigt. Die Zellen wurden mit FITC-gekoppeltem anti-EndoGI-Immuns Serum (grün, links) und Tubulin (rot, Mitte) gefärbt. In der Abbildung rechts ist die Überlagerung aller Signale zu sehen.

Unter Verwendung des spezifischen Immuns Serums und eines zweiten FITC-gekoppelten Antikörpers konnte für EndoGI eine Färbung im Zellkern nachgewiesen werden (Abbildung 7, links, EndoGI in grün). Als Bestandteil des Zytoskeletts diente  $\alpha$ -Tubulin als zytoplasmatisches Kontrollprotein, zu sehen in der mittleren Abbildung 7 in Rot. Die Überlagerung beider Signale ergibt keine Kolokalisation (Rechts). Somit konnte die nukleäre Lokalisation von EndoGI bestätigt werden.

#### 4.1.3. EndoGI wird in allen Entwicklungsstadien der Taufliege exprimiert

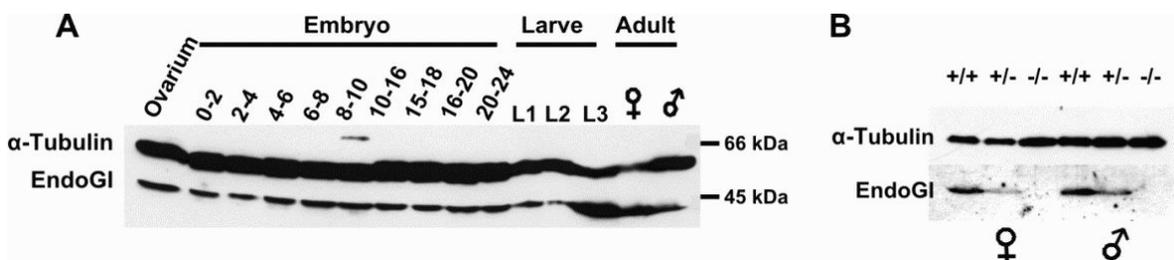
Nicht alle mRNAs werden in allen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* translatiert. So werden z.B. Proteine, die das Entstehen der *anterior-*

*posterior* Achse während der frühen Embryonalentwicklung steuern, streng mittels Translationskontrolle reguliert. Dabei unterdrückt z.B. das Nanos-Protein die Expression des *Hunchback*-Proteins im späteren posterioren Teil des Embryos [Irish *et al.*, 1989].

Da EndoGI als Inhibitor einer potentiell apoptotischen Nuklease (siehe 2.1.2) möglicherweise eine wichtige zelluläre Rolle spielt sollte untersucht werden, ob EndoGI in allen Embryonal- und Larvenstadien exprimiert wird, oder einer spezifischen Regulation unterliegt. Dafür wurden Zellextrakte des *white*<sup>1118</sup>-Stammes aus allen Entwicklungsstadien mittels *Western blotting* mit dem EndoGI-spezifischen Immunsersum untersucht.

In Abbildung 8A ist der *Western blot* abgebildet. Es wurden in jeder Spur identische Proteinmengen aufgetragen. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin.

In allen Entwicklungsstadien war EndoGI präsent. Auch in den 0-2 h alten Embryonen, in denen noch keine eigene Transkription stattfindet, ist EndoGI vorhanden. Die Expression ist dabei während der gesamten Embryogenese und Larvenentwicklung sowie in adulten weiblichen Fliegen konstant. Nur männliche adulte Fliegen zeigen eine leicht reduzierte Expression von EndoGI. Die Spezifität des Antikörpers wurde bestätigt, denn in einem EndoGI-Deletionsstamm konnte kein EndoGI mit *Western blotting* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8B). EndoGI wird daher ubiquitär während aller *Drosophila*-Lebensphasen exprimiert.



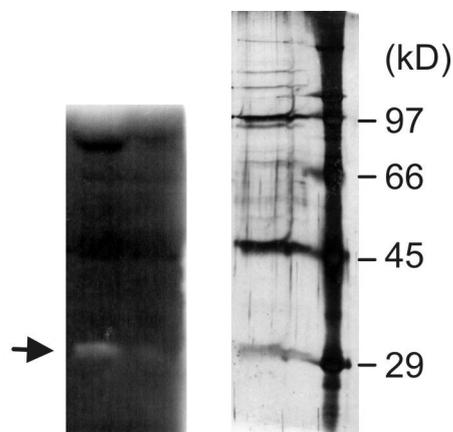
**Abbildung 8:** **A** Expression von EndoGI während der *Drosophila*-Entwicklung. Proteinextrakte aus allen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* wurden mit einem Anti-EndoGI-Immunsersum auf die Gegenwart von EndoGI mittels *Western blotting* getestet. Die Extrakte stammten vom *white*<sup>1118</sup>-Stamm. Geladen wurden je Spur Extrakte von einem Ovarium, 20 Embryonen, 20 bzw. 10 Larven des 1. und 2. Larvenstadiums, einer Larve des 3. Larvenstadiums und einer adulten Fliege. Als Ladekontrolle wurden die Proben auch mit Anti- $\alpha$ -Tubulin behandelt. **B** Ein *Western blot*, der mit anti-EndoGI untersucht wurde, zeigt die Abwesenheit von EndoGI in den EndoGI<sup>e00915</sup>-Deletionsmutanten. 4-5 Fliegen wurden in 10  $\mu$ l SDS-Ladepuffer je Fliege homogenisiert. Geladen wurde das Homogenisat einer Fliege pro Spur. +/+ : *white*<sup>1118</sup>; +/- : EndoGI<sup>e00915</sup>/*balancer*; -/- : EndoGI<sup>e00915</sup>/EndoGI<sup>e00915</sup>.

## 4.2. Die Nuklease EndoG

Wie bereits erwähnt, wurde in Schneider2-Zellextrakt ein Poly(A)-hydrolysierendes Enzym gefunden, welches durch EndoG1 inhibiert wird (siehe 4.1). Die Identifizierung erfolgte dabei durch die massenspektrometrische Analyse einer Proteinbande. Dafür war die Poly(A)-abbauende Aktivität aus Schneider2-Zellextrakt gereinigt worden. Nach dem letzten Reinigungsschritt lagen noch mehrere Proteine in geringer Konzentration vor (siehe Abbildung 9 Rechts). Um das Protein mit der nukleolytischen Aktivität einer Proteinbande zuordnen zu können, wurde ein *in-gel-assay* nach LAGRANDEUR durchgeführt [LaGrandeur & Parker, 1998].

Fraktionen der letzten Reinigungsstufe wurden jeweils zweimal auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches homogen markiertes Poly(A) enthielt, und das Gel nach der Elektrophorese zweigeteilt. Die eine Hälfte wurde silbergefärbt (Abbildung 9 rechts) und die andere Hälfte nach dem Protokoll von LAGRANDEUR renaturiert, in Reaktionspuffer inkubiert und nach dem Trocknen mittels *PhosphorImaging* analysiert (Abbildung 9 links). Durch die renaturierte Nuklease wurde das enthaltene Poly(A) hydrolysiert und die verminderte Radioaktivität detektiert. Die Proteinbande des nukleolytisch aktiven Enzyms befand sich auf Höhe des 29 kDa-Markers im SDS-Gel (siehe Pfeil, Abbildung 9) und wurde im Anschluss mit Hilfe von Massenspektrometrie als unbekanntes Protein CG8862 identifiziert, welches ein Homologes der eukaryotischen Endonukleasen G ist.

Bei der *Drosophila*-EndoG handelt es sich um ein 34,6 kDa Protein, welches aus 310 Aminosäuren besteht (siehe Abbildung 10). Das Protein besitzt 42% Sequenzidentität mit humaner EndoG. Des Weiteren wird es, wie alle anderen EndoGs, durch das katalytisch wichtige DRGH-Motiv im aktiven Zentrum charakterisiert [Schäfer *et al.*, 2004]. Dabei zeigt der N-Terminus keinerlei Homologie zu



**Abbildung 9:** Identifizierung von endogener EndoG mittels *in-gel-assay*. Zu sehen sind die beiden Hälften des für den *in-gel-assay* verwendeten SDS-Gels. **Links** *PhosphorImager* des renaturierten SDS-Gels mit EndoG-Fractionen. Durch den Pfeil wird das abgebaute Poly(A) markiert. **Rechts** Silbergefärbtes SDS-Gel mit EndoG-Fraktion und Proteinmarker (Größen in kDa angegeben).

1	<u>MSAPRVGGV</u> LALGATALGAFYLGTHVERERQHNGSTSGLPRLPGLPTFGT	50
51	<u>VSAASLI</u> PAQENNVSLTATPSRIGQIMKYGFGLDHVRSHSDYVLSYDRR	100
101	NRVPHWVFEHLTAE SVAKNDAVDRSKCDFKQDESIHPFFRSQNTDYRRSG	150
151	<u>YDRGHMAA</u> AGNHRHLHQKHCDETFYLSNMAPQVGQGFNRDAWNTLEAHVRR	200
201	LTKTYSNVYVCTGPLYLPHKEDDGKSYVKYEVIGANTVAVPTHFYKVIVG	250
251	ESADHKLHME SYVMPNQVISNDTPISVVFQVPPE SVERSAGLLFFDQINRK	300
301	QLTTINGKKV.	

**Abbildung 10:** Aminosäure-Sequenz von EndoG. Die mitochondriale *targeting*-Sequenz ist grau unterlegt, und die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind unterstrichen.

den anderen EndoGs. Alle eukaryotische Endonukleasen G wurden bisher als mitochondriale Proteine beschrieben [Low, 2003]. Das Transportsignal ist dabei stets N-terminal kodiert. So konnte durch Vergleiche mit der humanen EndoG und Proteindatenbanken festgestellt werden, dass die N-terminalen ersten 53 Aminosäuren der *Drosophila*-EndoG ein mitochondriales *targeting*-Signal enthalten. Weiterhin wird z.B. für das bovine EndoG-Protein berichtet, dass diese Signalsequenz im endogenen reifen Protein abgespalten wird [Côté & Ruiz-Carillo, 1993]. Da die vollständige *Drosophila*-EndoG eine Größe von 34,6 kDa besitzt, entspricht die in Abbildung 9 detektierte Proteinbande höchstwahrscheinlich prozessierter EndoG mit einer Größe von etwa 29 kDa. Auch wurden bei der massenspektrometrischen Analyse der endogenen EndoG keine Peptide identifiziert, die sich im N-Terminus befinden. Somit wird auch bei dem *Drosophila*-Enzym mit großer Wahrscheinlichkeit das mitochondriale Transportsignal entfernt.

#### 4.2.1. Klonierung und Expression von rekombinanter EndoG

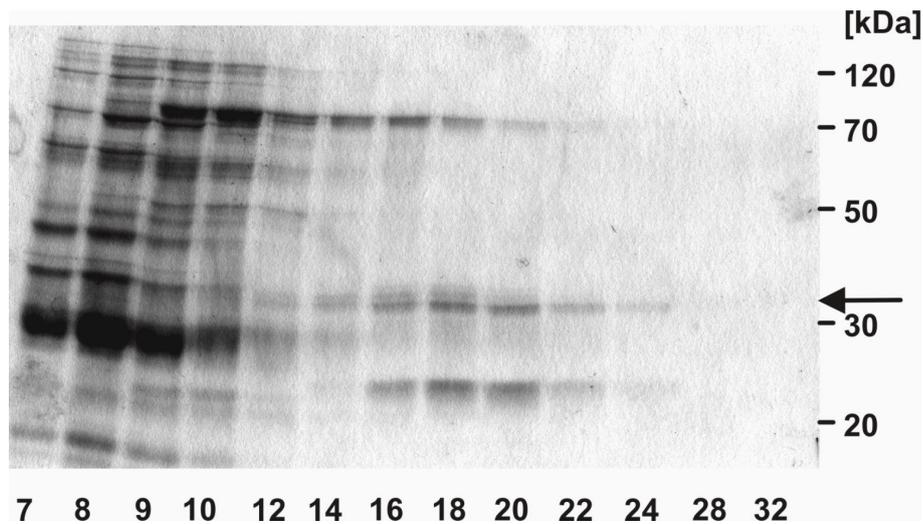
Um sowohl die Interaktion mit EndoGI, als auch die EndoG selbst zu untersuchen, musste EndoG als rekombinantes Protein hergestellt werden. Daher sollte die *Drosophila*-EndoG als vollständiges Protein kloniert und exprimiert werden. Bei der Klonierung konnten jedoch keine Klone mit korrekten Sequenzen isoliert werden. Die sehr wenigen Klone, die isoliert wurden, zeigten alle eine Deletion im Startcodon der EndoG-Sequenz. Offensichtlich war bereits durch die Expression von geringen Mengen EndoG ein großer Selektionsdruck in *E.coli* entstanden, so dass nur Klone mit mutierter EndoG-Sequenz überlebten. Um schließlich korrekte EndoG klonieren zu können, musste EndoGI bicistronisch kotransformiert werden. Auch

die anschließende Expression von EndoG konnte aufgrund der Toxizität nur bei bicistronischer Koexpression von EndoGI erfolgen. Dabei zeigte sich, dass der Großteil von EndoG in *inclusion bodies* vorlag. Versuche die Löslichkeit zu erhöhen, indem zum Beispiel die Expressionszeit verkürzt oder verlängert, bei niedrigeren Temperaturen exprimiert, verschiedene *E.coli*-Expressionstämme oder Zusätze wie Ethanol verwendet wurden, scheiterten.

#### 4.2.2. Reinigung von rekombinanter EndoG $\Delta$ N53

Die ersten N-terminalen 53 Aminosäuren der EndoG enthalten eine mitochondriale *targeting*-Sequenz (siehe 4.2). Da dieses Transportsignal in prozessierter humaner EndoG fehlt, scheint es nicht essentiell für die Nuklease-Aktivität zu sein. Um die Löslichkeit und damit die Ausbeute an rekombinanter EndoG zu erhöhen, wurde daher eine EndoG-Variante mit C-terminalem His-tag kloniert (EndoG $\Delta$ N53), in der diese Aminosäuren deletiert waren. Die Expression von EndoG $\Delta$ N53 war erneut nur bei bicistronischer Koexpression von EndoGI möglich. Die Löslichkeit dieses EndoG-Proteins war geringfügig besser als die der vollständigen EndoG. Um die Trennung der EndoG $\Delta$ N53 von koexprimiertem EndoGI während der anschließenden Reinigung zu erleichtern, wurde eine EndoGI-Variante ohne His-tag (EndoGI $\Delta$ His) kloniert und verwendet.

Die Reinigung der EndoG $\Delta$ N53 erfolgte wie unter 3.2.3.6 beschrieben. Nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Elutionsfraktionen mehrerer Chromatographien vereinigt. Nach Dialyse, Ammoniumsulfatfällung und anschließender Phenylsuperose-Säule wurden die aktiven EndoG $\Delta$ N53-Fraktionen erneut dialysiert und auf eine 1 ml-Hydroxylapatit-Säule gegeben. In Abbildung 11 ist das SDS-Gel dieser finalen Säulenchromatographie dargestellt. EndoG $\Delta$ N53 konnte von nahezu allen anderen Proteinen getrennt werden, denn diese eluierten zu Beginn des Phosphatgradienten. EndoG hingegen eluierte zwischen 90-150 mM Kaliumphosphat (Fraktionen 14-24, Abbildung 11). Durch *Western blotting* konnte nachgewiesen werden, dass verbliebene Spuren von EndoGI $\Delta$ His komplett von den EndoG-enthaltenden Fraktionen getrennt worden waren. Dabei hätten noch Konzentrationen von 5 nM EndoGI in den Fraktionen detektiert werden können. Wie in den Fraktionen 14-24 in Abbildung 11 zu sehen, enthalten die EndoG $\Delta$ N53-Fraktionen noch zwei kontaminierende Proteine. Trotzdem sollte die Nuklease für weitere Messungen benutzt werden. Daher musste die exakte Proteinkonzentration von EndoG $\Delta$ N53 bestimmt werden. Dies geschah durch eine SDS-PAGE mit vergleichenden BSA-Proben, wodurch Protein-Kontaminationen nicht mit einbezogen wur-



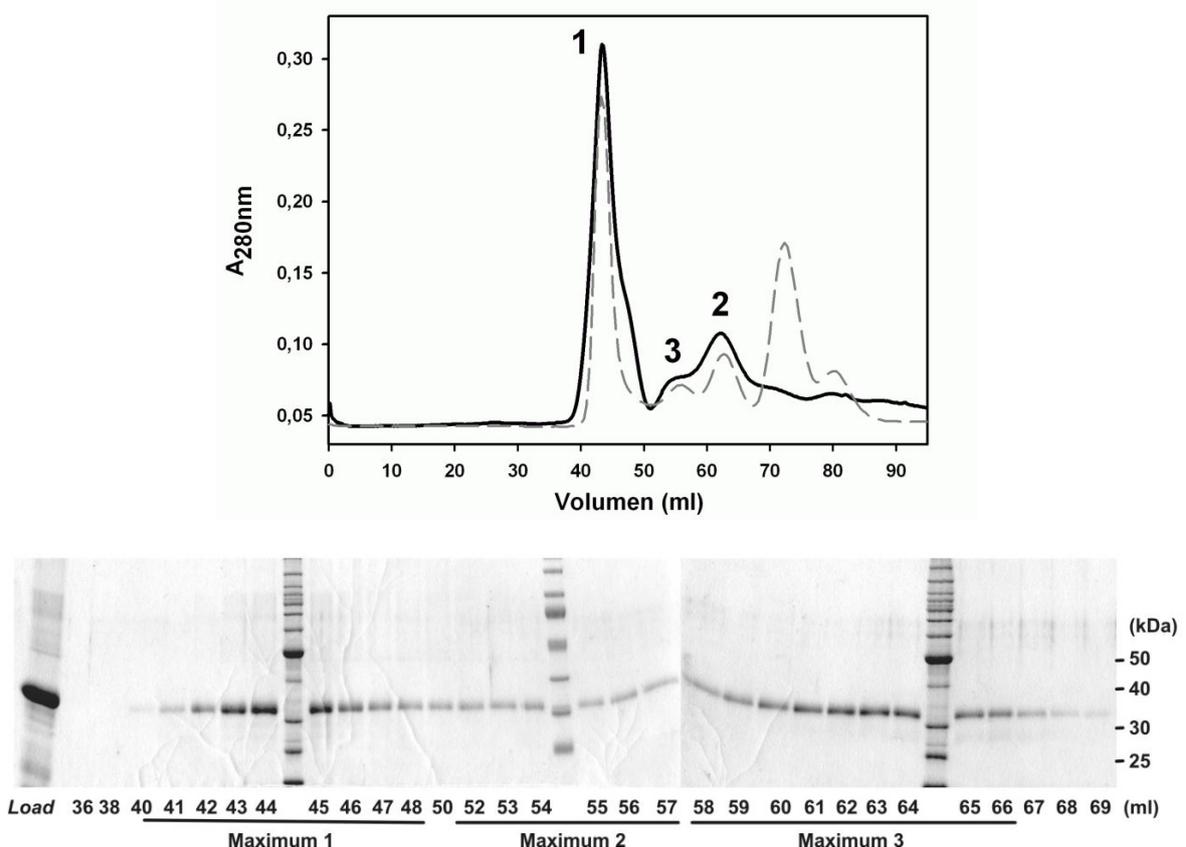
**Abbildung 11:** 10%iges SDS-Gel, auf welchem die Elutionsfraktionen der abschließenden Hydroxylapatit-Säule aufgetrennt sind. EndoG $\Delta$ N53, mit einer Größe von 32,6 kDa, wird durch den Pfeil gekennzeichnet.

den. Es wurden Enzymkonzentrationen von 8-15  $\mu$ g/ml berechnet, die eine spezifische Aktivität von  $1 \cdot 10^9$  pmol AMP/min/ $\mu$ g besaßen. Bei der  $K_D$ -Wert-Bestimmung für den EndoG-EndoGI-Komplex wurde festgestellt, dass die gemessene Proteinkonzentration jedoch nicht der Konzentration an aktiver EndoG entsprechen konnte (4.3.3). Durch eine stöchiometrische Titration von EndoG durch EndoGI wurde bestimmt, dass nur rund 30% der gemessenen Monomer-Konzentration der Konzentration an aktivem monomeren EndoG $\Delta$ N53 entspricht (siehe 4.3.4). Daher ist in nachfolgenden Experimenten jeweils die aus dem SDS-Gel berechnete Monomer- und die stöchiometrisch bestimmte Dimer-Konzentration für EndoG $\Delta$ N53 angegeben. Alle in dieser Arbeit gezeigten Experimente mit aktiver EndoG wurden mit Fraktionen der hier gezeigten Präparation durchgeführt.

#### 4.2.3. Reinigung von rekombinanter EndoG $\Delta$ N53 DAGA

Die Ausbeute und damit die Konzentration an löslicher EndoG $\Delta$ N53 war zu gering für Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge. Um dennoch die Stöchiometrie des Nuklease-Inhibitor-Komplexes bestimmen zu können, musste eine EndoG-Variante kloniert werden, mit der eine größere Proteinausbeute möglich war. Da während der Reinigung von aktiver EndoG zusätzlich EndoGI entfernt werden musste, wurde nun eine inaktive Variante hergestellt. Es war gezeigt worden, dass durch den Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum eine komplette Inhibierung der Nuklease-Aktivität des *Anabaena*-Enzyms möglich ist

[Schäfer *et al.*, 2004]. Dabei waren sowohl das Arginin, als auch das Histidin im DRGH-Motiv durch Alanin ersetzt worden (siehe Abbildung 10). Diese Doppelmutteration wurde in die *Drosophila*-EndoG-Deletionsvariante eingebracht. Das im Folgenden als EndoG $\Delta$ N53 DAGA bezeichnete Protein konnte in Abwesenheit des Inhibitors exprimiert werden, war jedoch ebenfalls zu einem Großteil unlöslich. Bei einer Nukleasekonzentration von 1  $\mu$ M konnte mit einer Substratkonzentration von 50  $\mu$ M Poly(A) über einen Zeitraum von 3 h keine hydrolysierende Aktivität gemessen werden, was einer um einen Faktor  $10^7$  verringerten spezifischen Aktivität entspricht als die der EndoG $\Delta$ N53. Damit war EndoG $\Delta$ N53 DAGA katalytisch inaktiv. Um trotz der geringen Löslichkeit genügende Mengen an Protein für weitere Experimente zu erhalten, wurde dieses nach einer denaturierenden Ni-NTA-Affinitätschromatographie schrittweise renaturiert (siehe 3.2.3.9). Um Aggregate abzutrennen wurde im Anschluss eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Das Elutionsprofil und das SDS-Gel dieser finalen Säulenchromatographie sind in Ab-



**Abbildung 12:** Elutionsprofil und SDS-Gel der Gelfiltration von EndoG $\Delta$ N53 DAGA. **oben** Schwarz das A<sub>280</sub>-Profil der EndoG $\Delta$ N53 DAGA und grau das A<sub>280</sub>-Profil der folgenden Referenzproteine: Blue Dextran, BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Ribonuklease A mit folgenden Molekulargewichten: 2000, 67, 43, 25 und 14 kDa. **unten** SDS-Gel der Gelfiltrationsfraktionen. Markiert wurden die drei im Text beschriebenen Maxima.

bildung 12 dargestellt.

EndoG $\Delta$ N53 DAGA eluierte mit drei Maxima (siehe Abbildung 12, mit 1-3 gekennzeichnet). Das erste Maximum entspricht dem Ausschlussvolumen und enthält daher offensichtlich falsch gefaltetes und aggregiertes EndoG $\Delta$ N53 DAGA. Das zweite Maximum befindet sich bei circa 40 kDa und enthält wahrscheinlich korrekt gefaltete EndoG $\Delta$ N53 DAGA, welche ein Größe von 33,6 kDa hat. Das dritte Maximum befindet sich als Schulter vor dem 40 kDa Maximum. Bei einer Größe von etwas mehr als 67 kDa besteht dieser höchstwahrscheinlich aus dimerem EndoG $\Delta$ N53 DAGA. Anhand des SDS-Gels kann man feststellen, dass sich in den Fraktionen ausschließlich EndoG $\Delta$ N53 DAGA befand. Weiterhin war es gelungen Aggregate abzutrennen und die Elution eines Teils der renaturierten EndoG $\Delta$ N53 DAGA bei der erwarteten Größe indiziert eine korrekte Faltung des Proteins.

#### **4.2.4. Reinigung von rekombinanter EndoG $\Delta$ N55 N187K**

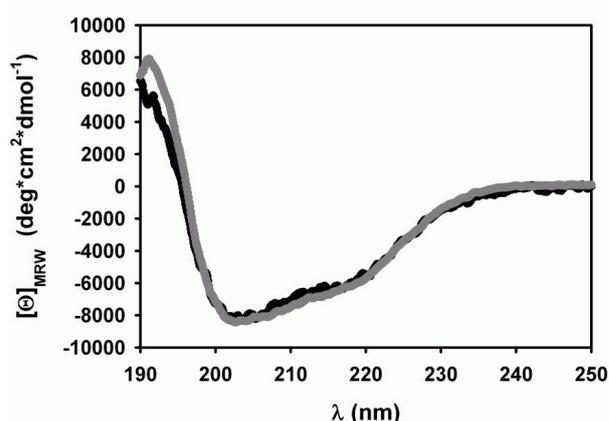
In Kooperation mit Dr. ANTON MEINHART vom Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg soll der EndoG-EndoGI-Komplex kristallisiert werden. Dafür stellte er eine N-terminale Deletionsvariante von EndoG her, deren Primärstruktur des aktiven Zentrum intakt war und deren erste 55 Aminosäuren fehlten. Er konnte große Mengen löslicher EndoG $\Delta$ N55 erhalten und reinigen (siehe 3.2.3.8). Da es uns bisher nicht gelungen war, größere Mengen aktiver EndoG zu produzieren, stellte er für die hier beschriebenen Arbeiten freundlicherweise einen Teil seines gereinigten Proteins zur Verfügung. Durch einen TCA-Fällungstest mit Poly(A) als Substrat konnte die enzymatische Aktivität der EndoG $\Delta$ N55 bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass EndoG $\Delta$ N55 nur eine stark verminderte Aktivität besitzt (spezifische Aktivität ~50.000-fach niedriger als die der EndoG $\Delta$ N53). Bei der erneuten Sequenzierung des Plasmids aus der Expressionskultur wurde eine spontane Punktmutation von Asparagin 187 zu Lysin festgestellt. Diese Mutation wurde durch massenspektrometrische Analyse bestätigt: Eine Masse von 30553 Da wurde für das gesamte Protein ermittelt. Diese stimmt mit der berechneten Masse für EndoG $\Delta$ N55 N187K von 30550 Da überein (ohne posttranslationale Modifikation). Die Masse für EndoG $\Delta$ N55 beträgt 30536 Da. In einer Peptid-*fingerprint*-Analyse (siehe 3.2.3.10) des mutierten Proteins wurde ein Peptid der Größe 2329,43 Da gefunden. Es handelte sich dabei um die Aminosäuren 168-187, wobei dieses Peptid nur entstehen konnte, wenn sich an der Position 187 der Primärstruktur das mutierte Lysin befand. Dieses

Peptid würde bei EndoG $\Delta$ N55 nicht auftreten und das EndoG $\Delta$ N55-Peptid wurde auch nicht detektiert. Somit konnte die Mutation eindeutig nachgewiesen werden. Das Asparagin 187 entspricht dem Asparagin 174 der bovinen EndoG, welches an der Bindung des katalytischen Mg<sup>2+</sup>-Ions beteiligt ist [Schäfer *et al.*, 2004]. Dies erklärt die wesentlich geringere Aktivität der EndoG $\Delta$ N55 N187K-Variante. Da das Protein aber, wie später gezeigt wird, mit EndoGI interagieren kann (siehe 4.3.2), kann man davon ausgehen, dass es in nativer Struktur vorliegt. Seine Struktur konnte daher als Referenz in einer CD-Untersuchung des renaturierten EndoG $\Delta$ N53 DAGA dienen.

#### 4.2.5. EndoG $\Delta$ N53 DAGA besitzt eine native Struktur

Um festzustellen, ob EndoG $\Delta$ N53 DAGA nach der Renaturierung nativ strukturiert ist, wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Als Referenz für eine korrekte Faltung diente die ebenfalls nahezu inaktive Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K, welche nachweislich eine native Struktur aufweist, denn das Protein ist in der Lage, stabile Komplexe mit EndoGI zu bilden (siehe 4.3.2). Die Fern-UV-CD-Spektren wurden im Bereich von 190-250 nm für beide Proteine gemessen und nach Gleichung 2 (3.2.3.12) ausgewertet (siehe Abbildung 13).

Diese CD-Spektren sind nicht vollständig identisch, aber doch sehr ähnlich. Geringe Abweichungen sind auf die niedrigere Konzentration von EndoG $\Delta$ N53 DAGA zurückzuführen, was bei gleichen Messbedingungen ein etwas erhöhtes Rauschen des Signals verursachte. Weiterhin gibt es Unterschiede in den Sequenzen beider Proteine. So besitzt EndoG $\Delta$ N53 DAGA einen relativen langen C-terminalen His-tag und EndoG $\Delta$ N55 N187K hingegen einen sehr kurzen N-terminalen His-tag. Um die



**Abbildung 13:** Fern-UV-CD-Spektren von EndoG $\Delta$ N53 DAGA (schwarz) und EndoG $\Delta$ N55 N187K (grau). Der Puffer bestand aus 50 mM Kaliumphosphat, 10% Glycerin, 100 mM KCl. Die Spektren wurden bei 20°C in einer 0,01 cm Küvette mit einer Auflösung von 0,1 nm und einer Bandbreite von 1 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug für EndoG $\Delta$ N53 DAGA 0,37 mg/ml und für EndoG $\Delta$ N55 N187K 1,0 mg/ml.

strukturelle Integrität von EndoG $\Delta$ N53 DAGA zu bestätigen wurde daher mittels CD-Messung im Fern-UV-Bereich die thermische Entfaltung beider Proteine gemessen. Beide EndoG-Varianten wurden durch Erhöhung der Temperatur irreversibel entfaltet. Dabei lag der Übergangsmittelpunkt von beiden Varianten bei 45°C (Daten nicht gezeigt). Man kann daher davon ausgehen, dass auch EndoG $\Delta$ N53 DAGA eine strukturelle Integrität besitzt.

#### **4.2.6. Die Charakterisierung der *Drosophila*-EndoG**

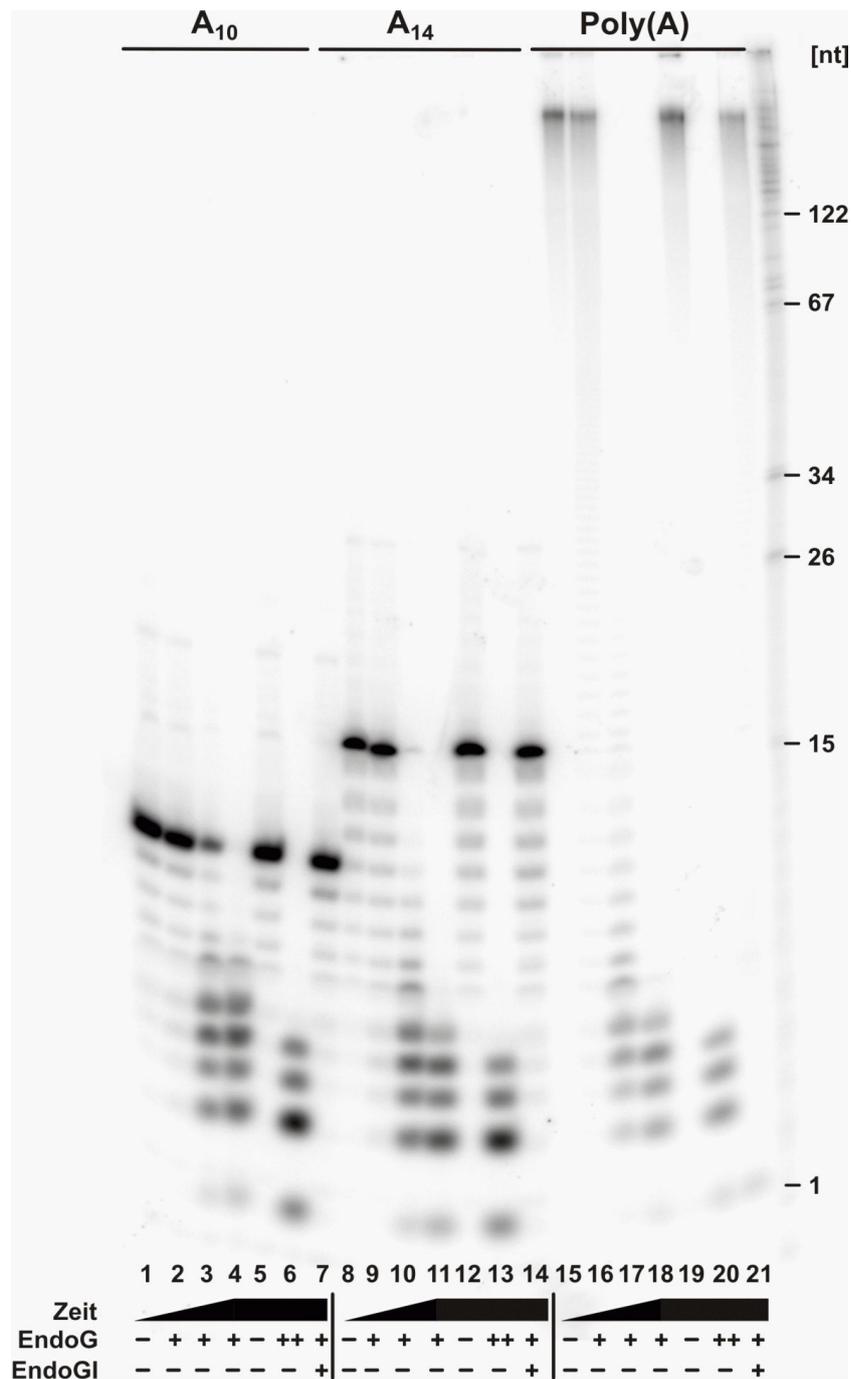
Die ersten Vertreter der EndoG-Familie wurden bereits Mitte der 1960er-Jahre identifiziert [Linn & Lehmann, 1966, Nestle & Roberts, 1969a]. Seitdem wurde von einer Vielzahl pro- und eukaryotischer Endonukleasen G berichtet. Um die *Drosophila*-EndoG mit den bereits charakterisierten EndoGs vergleichen zu können, sollten die im Folgenden beschriebenen spezifischen Eigenschaften, wie z.B. bevorzugte Substrate oder benötigte divalente Metallionen, untersucht werden. Für diese Experimente wurde EndoG $\Delta$ N53 verwendet, welche in Aktivitätspuffer mit dem jeweils zu untersuchenden Faktor inkubiert wurde. Die Aktivität wurde entweder mit dem TCA-Fällungstest oder durch Harnstoffgele bestimmt (3.2.5.1, 3.2.2.9).

##### **4.2.6.1. Sowohl Poly(A), als auch Oligo(A) werden durch EndoG hydrolysiert**

Da EndoG bei der Suche nach einer unbekanntem Deadenylase gefunden wurde, wurde für alle Aktivitätsbestimmungen zunächst homogen markiertes Poly(A) als Substrat verwendet. Auch quantitative Aktivitätsbestimmungen mit Hilfe des TCA-Fällungstests sind damit möglich [Körner & Wahle, 1997].

Um zu bestimmen, wie Poly(A) durch EndoG abgebaut wird und welche Substratlänge ausreichend für die Erkennung ist, wurde EndoG $\Delta$ N53 mit A<sub>10</sub>, A<sub>14</sub> und homogen markiertem Poly(A) inkubiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte auf einem Harnstoff-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mittels *Phosphorimaging* analysiert. In Abbildung 14 ist das Gel dargestellt.

Poly(A) wird durch EndoG abgebaut (Spuren 16-18). Deutlich sichtbar ist eine Akkumulation von Oligomeren von 2-5 nt Länge (Spuren 18 und 20). Dabei ist die Hydrolyse des Poly(A) spezifisch für die Inkubation mit EndoG $\Delta$ N53, denn ohne Zugabe von Enzym kommt es selbst nach 100 min Inkubation bei 30°C zu keiner Hydrolyse des Substrats (Spur 19). EndoG $\Delta$ N53 erkannte nicht nur Poly(A) der Länge 400-600 nt als Substrat, sondern auch die sehr kurzen Nukleinsäuren A<sub>10</sub>



**Abbildung 14:** Hydrolyse von Oligo(A)<sub>10</sub>, Oligo(A)<sub>14</sub> und Poly(A). Für die Kinetik wurden in einem 20 µl-Reaktionsansatz jeweils 75 nM Oligo(A) oder 150 nM markiertes Poly(A) und 200 pM EndoG eingesetzt (dies entspricht 30 pM aktivem Dimer). Nach 10 Sekunden, 10 und 100 min wurden je 2 µl entnommen und mit 4 µl Formamid-Ladepuffer gemischt. Der erste Zeitpunkt zeigt jeweils die Substrate vor Enzymzugabe. Dies entspricht den Spuren 1-4; 8-11 und 15-18. Als Kontrolle wurden die Substrate ohne Enzym für 100 min inkubiert (Spuren 5, 12 und 19). Des Weiteren wurden die Substrate 100 min mit der zehnfachen Menge EndoGΔN53 inkubiert (Spuren 6, 13 und 20). Als weitere Kontrolle wurden in den Spuren 7; 14 und 21 die Substrate für 100 min mit EndoGΔN53 und 30 nM EndoGI inkubiert. Die Proben wurden dann auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

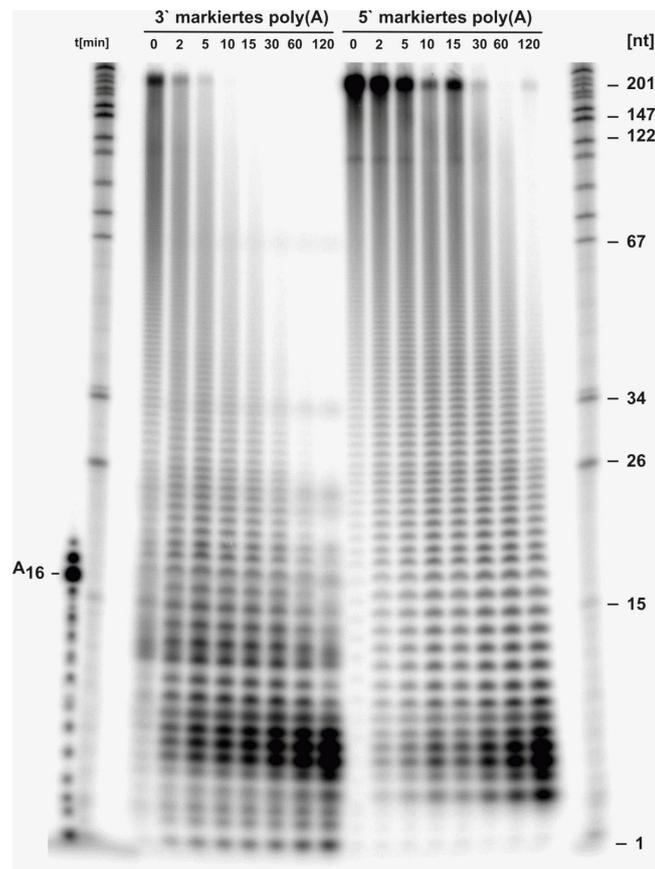
und A<sub>14</sub>. So wurde sowohl A<sub>10</sub>, als auch A<sub>14</sub> über die Zeit hydrolysiert (Abbildung 14, Spuren 3, 4, 6 und 10, 11, 13). Nach 100 min Inkubation sind hauptsächlich Di- bis Tetranukleotide entstanden, aber auch Mononukleotide konnten detektiert werden (Spuren 4, 11 und 18). Dies deutet darauf hin, dass Oligomere bis zu einer Länge von 5 nt als Substrat erkannt werden. Zum Vergleich kann man die Spuren 18 und 20 sowie 11 und 13 der Abbildung 14 heranziehen. Entstehen mit weniger Enzym (Spuren 11, 13) noch Di- bis Pentanukleotide, so sind mit der zehnfachen Menge EndoG $\Delta$ N53 keine Pentanukleotide mehr detektierbar (Spuren 13, 20). A<sub>4</sub> kann aber scheinbar nicht mehr verkürzt werden und akkumuliert als Endprodukt (Spuren 6, 13, 20). Dies war bereits für die homologe *Serratia*-Nuklease berichtet worden [Nestle & Roberts, 1969b]. Das kleinste in diesem Kontext untersuchte Oligomer war A<sub>6</sub>, welches als durch die *Drosophila*-EndoG als Substrat erkannt und abgebaut wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Effektivität der nukleolytischen Aktivität von EndoG $\Delta$ N53 scheint mit der Länge der Substrate zu steigen. Bei der Inkubation von EndoG $\Delta$ N53 mit homogen markiertem Poly(A) waren bereits nach 10 min 100% des Substrats zu Oligomeren bis 26 nt Länge abgebaut (Spur 17). Sowohl A<sub>10</sub> als auch A<sub>14</sub> waren dagegen noch nicht komplett abgebaut (Spuren 3 und 10). Aber auch hier kann man Unterschiede erkennen. Obwohl nur 4 nt länger, wurde A<sub>14</sub> bereits deutlich stärker hydrolysiert als A<sub>10</sub> (siehe Spuren 3 und 10). Die *Drosophila*-EndoG gleicht damit auch in diesem Punkt dem Enzym aus dem Rind [Côté *et al.*, 1989].

#### 4.2.6.2. EndoG ist eine Endonuklease

Neben der Endonukleaseaktivität, die allen EndoGs gemeinsam ist, wurde für Nuc1 aus *Saccharomyces cerevisiae* zusätzlich eine schwache 5'-Exonukleaseaktivität beim Abbau von dsDNA beschrieben [Dake *et al.*, 1988]. Untersucht man den Abbau von 3'- und 5'-endmarkiertem Poly(A), lassen sich Aussagen über die Direktionalität des Abbaus treffen. Bei einem 3'-exonukleolytischen Abbau, wie er charakteristisch für Deadenylasen (z.B. PARN) ist, würde beim Abbau von 3'-markiertem A<sub>200</sub> vom ersten Zeitpunkt einer Messung an nur AMP entstehen [Körner & Wahle, 1997].

Es wurde geprüft, ob die *Drosophila*-EndoG ihre Substrate ebenfalls nur endonukleolytisch abbaut oder auch eine exonukleolytische Aktivität vorliegt. EndoG $\Delta$ N53 wurde mit je 500 fmol 3'- oder 5'-markiertem Poly(A) (3.2.4.3, 3.2.4.4) inkubiert. Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von EDTA abgestoppt. Die entstandenen Produkte wurden mittels



**Abbildung 15:** Kinetik der Hydrolyse von 3'- und 5'-markiertem Poly(A) durch EndoG $\Delta$ N53. In einem 20  $\mu$ l-Reaktionsansatz wurden jeweils 25 nM endmarkiertes Poly(A) und 0,1 nM EndoG $\Delta$ N53 eingesetzt (dies entspricht 16 pM aktivem Dimer). Nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min wurden je 2  $\mu$ l entnommen und mit 4  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer gemischt. Diese Proben wurden auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Zeitpunkt  $t = 0$  zeigt das Substrat vor der Enzymzugabe.

eines denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt und dann durch *PhosphorImaging* analysiert (siehe Abbildung 15).

Der Abbau von 3'- und 5'-markiertem Poly(A) zeigte ein identisches Muster. Beim Abbau beider Substrate sind Leitern von Banden entstanden, die den sukzessiv verkürzten Substraten entsprechen, wobei bereits beim ersten Zeitpunkt (nach 2 min) Oligomere und Monomere entstanden waren. Man kann deutlich bei den Zeitpunkten 15-120 min eine Akkumulation von Produkten mit 5-8 nt beziehungsweise bei 5'-markiertem Poly(A) von 4-8 nt Länge erkennen. Da sich der Abbau beider Substrate nicht unterscheidet, kann man davon ausgehen, dass es sich auch bei *Drosophila*-EndoG um eine Endonuklease handelt.

Die Frage der Prozessivität ist für unspezifische Endonukleasen sehr schwer zu beantworten, denn in jedem Substrat gibt es eine Vielzahl möglicher Schnittstellen. Man kann daher kaum feststellen, ob die Reaktion prozessiv oder distributiv

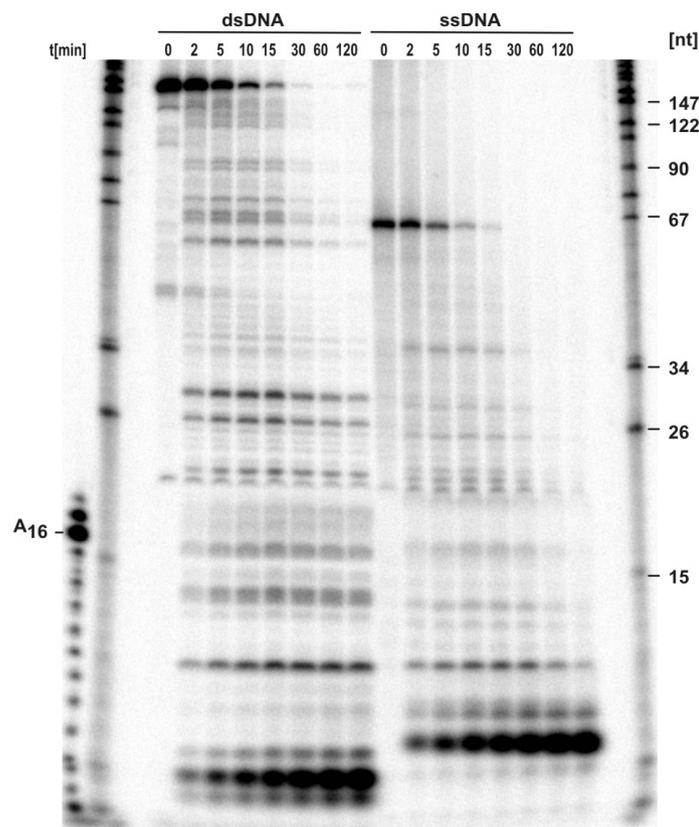
verlaufen ist. Einerseits werden die Substratmoleküle gleichmäßig verkürzt, was für eine distributive Reaktionsweise des Enzyms spricht. Andererseits spricht für eine prozessive Reaktion, dass bereits nach zwei Minuten Reaktionszeit Endprodukte entstanden waren, obwohl noch ungeschnittene RNA vorhanden war. Wahrscheinlich handelt es sich um eine prozessive Reaktion, dies konnte aber mit diesem Experiment nicht eindeutig nachgewiesen werden.

#### **4.2.6.3. Sowohl einzel-, als auch doppelsträngige DNA wird durch EndoG abgebaut**

Für alle bisher beschriebenen Endonukleasen G und ihre Homologen wurde geschildert, dass sowohl RNA, als auch ssDNA und dsDNA abgebaut werden [Dake *et al.*, 1988, Widlak *et al.*, 2001, Côté *et al.*, 1989, Nestle & Roberts, 1969b, Linn & Lehmann, 1966]. Es sollte daher untersucht werden, ob auch die *Drosophila*-EndoG DNA als Substrat erkennt.

Als ssDNA-Substrat diente ein Oligonukleotid mit einer Länge von 60 Nukleotiden. Bei der getesteten dsDNA handelte es sich um ein 123 nt langes Konstrukt mit willkürlich gewählter Sequenz (beide Sequenzen befinden sich im Anhang). Diese Substrate wurden 5'-endmarkiert und mit EndoG $\Delta$ N53 inkubiert. Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten beendet. Die entstandenen Produkte wurden mit einem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* analysiert.

In Abbildung 16 ist deutlich sichtbar, dass sowohl einzel-, als auch doppelsträngige DNA abgebaut wird. Als Endprodukte der Reaktionen entstanden erneut sehr kurze Oligonukleotide. Dabei wurde die doppelsträngige DNA genauso schnell abgebaut wie einzelsträngige DNA. Auch scheint DNA ähnlich effektiv wie RNA abgebaut zu werden, denn nach 15-30 min konnten bei gleichen Reaktionsbedingungen keine Ausgangssubstrate mehr detektiert werden. Beim Abbau von dsDNA entstand ein zwei Nukleotide kürzeres Abbauprodukt als beim Abbau von der ssDNA. Auch entstanden beim Abbau der DNAs im Gegensatz zu Poly(A) nur 1-2 Produktbanden, was wahrscheinlich auf bevorzugte Schnittstellen innerhalb der DNA-Sequenz zurückzuführen ist. Es konnte also nachgewiesen werden, dass auch dieses EndoG-Homologe sowohl Desoxy-, als auch Ribonukleinsäuren erkennen und effektiv hydrolysieren kann. Dabei ist es offenbar unerheblich, ob es sich um doppel- oder einzelsträngige Substrate handelt.



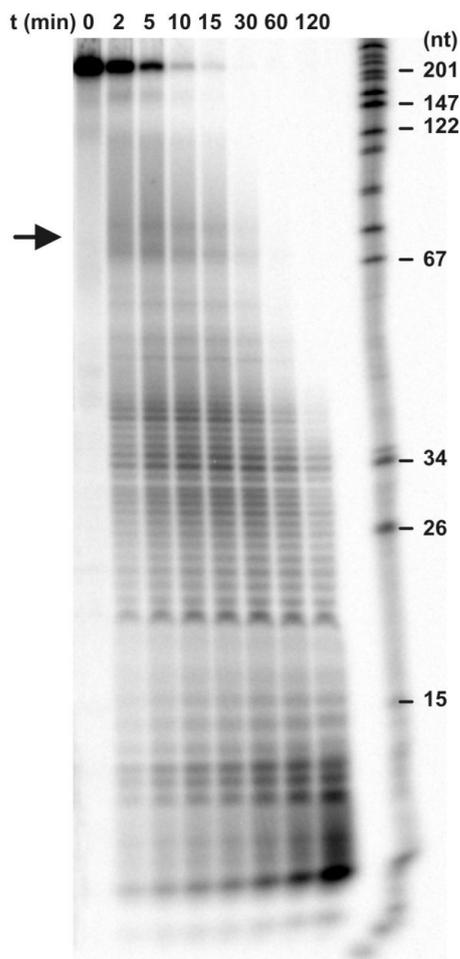
**Abbildung 16:** Kinetik der Hydrolyse von 5'-markierter ssDNA und dsDNA. In einem 20  $\mu$ l-Reaktionsansatz wurden jeweils 25 nM 5'-endmarkierte ssDNA und dsDNA und 0,1 nM EndoG $\Delta$ N53 eingesetzt (dies entspricht 16 pM aktivem Dimer). Nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min wurden je 2  $\mu$ l entnommen und mit 4  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer gemischt. Diese Proben wurden auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Zeitpunkt  $t = 0$  zeigt das Substrat vor der Enzymzugabe. A<sub>16</sub> wurde mittels NaOH partiell hydrolysiert.

#### 4.2.6.4. Poly(A), ein bevorzugtes Substrat?

Wie bereits erwähnt, kann man beim Abbau von DNA ein charakteristisches Abbaumuster erkennen, das auf bevorzugte Schnittstellen innerhalb der DNA hinweist. Im folgenden Experiment wurde N<sub>65</sub>A<sub>45</sub>N<sub>63</sub> als Substrat verwendet und untersucht, ob es zur Bildung spezifischer Reaktionsintermediate oder -produkte kommt. Diese RNA besteht aus einem 45 nt langen homopolymeren Abschnitt (A<sub>45</sub>), welcher von zwei 65 und 63 nt langen heteromeren Sequenzen flankiert wird.

Radioaktiv transkribierte N<sub>65</sub>A<sub>45</sub>N<sub>63</sub>-RNA wurde mit EndoG $\Delta$ N53 inkubiert. Die Hydrolysereaktionen wurden an den angegebenen Zeitpunkten abgestoppt. Die Analyse der entstanden Produkte erfolgte mittels eines Harnstoff-Polyacrylamidgel und *PhosphorImaging* (siehe Abbildung 17).

Betrachtet man den Zeitverlauf des Abbaus, so kann man während der ersten



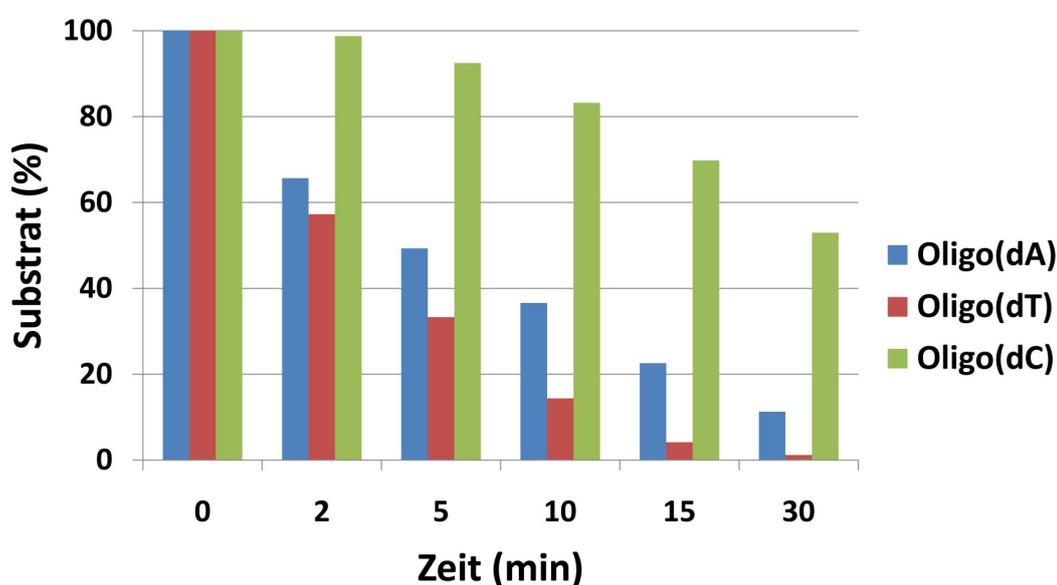
**Abbildung 17:** Kinetik der Hydrolyse von L3preA<sub>45</sub>N<sub>63</sub> durch EndoGΔN53. In einem 20 μl-Reaktionsansatz wurden 25 nM N<sub>65</sub>A<sub>45</sub>N<sub>63</sub>-RNA und 0,1 nM EndoGΔN53 inkubiert (dies entspricht 16 pM aktivem Dimer). Nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min wurden je 2 μl entnommen und mit 4 μl Formamid-Ladepuffer gemischt. Diese Proben wurden auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Zeitpunkt t = 0 zeigt das Substrat vor der Enzymzugabe. Der Pfeil weist auf das Intermediat von ca. 70 Nukleotiden Länge.

Zeitpunkte schwach die Bildung eines wenig populierte Intermediats bei etwa 70 nt Länge erkennen. Dies entspricht der Länge der flankierenden Sequenzen (Abbildung 17, Pfeil). Es kam zur Anreicherung von zwei weiteren Intermediaten bei 34 nt und 45 nt Länge, was auf weitere bevorzugte Schnittstellen hinweist. Im weiteren Verlauf wurden jedoch jegliche Intermediate mit einem sehr kontinuierlichen Abbaumuster hydrolysiert. Es entstanden erneut Oligomere als Endprodukte der Hydrolyse. Der Abbau dieser RNA mit willkürlich gewählter Sequenz glich im Muster nicht dem DNA-Abbau in Abbildung 16. Die Hydrolyse erfolgte eher kontinuierlich, obwohl es zur schwachen Ausprägung von Intermediaten kam. Man kann wahrscheinlich von einer sehr schwachen Präferenz für A-reiche, unstrukturierte Sequenzen sprechen.

#### 4.2.6.5. Oligo(dA) und Oligo(dT) werden bevorzugt geschnitten

Um eine mögliche Spezifität von EndoG für bestimmte Nukleotide weiter zu untersuchen, wurden 5'-markierte synthetische DNA-Homopolymere mit einer identischen Länge von 50 Nukleotiden mit EndoG $\Delta$ N53 inkubiert. Den Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots entnommen, die Produkte mit einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt und mittels *Phosphorimaging* analysiert. Die Abnahme der Konzentration des Ausgangssubstrats wurde ausgewertet (siehe Abbildung 18).

Sowohl dA<sub>50</sub>, dT<sub>50</sub>, als auch dC<sub>50</sub> wurden abgebaut. dG<sub>50</sub> konnte auf dem Harnstoffgel nicht aufgetrennt werden, es verblieb in den Geltaschen. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der Bildung sehr stabiler Sekundärstrukturen durch Poly(dG). Diese können auch die Zugänglichkeit für Enzyme und damit den Abbau massiv behindern. Es wurden jedoch geringe Mengen an kürzeren Oligo(dG)s detektiert, die offensichtlich während der Inkubation mit der EndoG-Variante entstanden waren. Sowohl dA<sub>50</sub> und dT<sub>50</sub> wurden sehr effektiv abgebaut. dT<sub>50</sub> wurde sogar noch besser hydrolysiert als dA<sub>50</sub>, dC<sub>50</sub> hingegen wurde sehr viel langsamer abgebaut. Während von dA<sub>50</sub> und dT<sub>50</sub> nach 30 min nur noch 11% bzw. 2% der Konzentration des ursprünglichen Substrats erhalten waren, konnten noch 53%



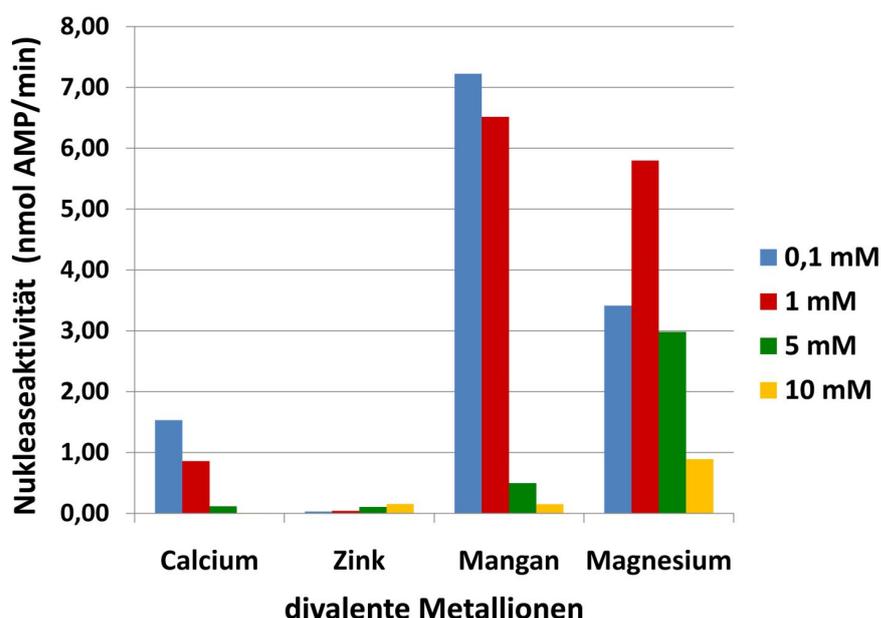
**Abbildung 18:** Kinetik der Hydrolyse von dA<sub>50</sub>, dT<sub>50</sub> und dC<sub>50</sub> durch EndoG $\Delta$ N53. In einem 20  $\mu$ l-Reaktionsansatz wurden 10 nM 5'-markiertes dA<sub>50</sub>, dT<sub>50</sub> beziehungsweise dC<sub>50</sub> und 50 pM EndoG $\Delta$ N53 inkubiert (dies entspricht 8 pM aktivem Dimer). Nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min wurden je 2  $\mu$ l entnommen und mit 4  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer gemischt. Diese Proben wurden auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Zeitpunkt t = 0 entspricht der Substratmenge vor Enzymzugabe (=100%). Die Spuren wurden mit der Software ImageQuant TL ausgewertet.

dC<sub>50</sub> detektiert werden. Die Affinität zu A-reichen Sequenzen konnte somit bestätigt werden. Darüber hinaus konnte eine noch stärkere Bevorzugung von Poly (dT) nachgewiesen werden.

#### 4.2.6.6. Die EndoG-Aktivität ist abhängig von divalente Metallionen

In einem Vorversuch wurde festgestellt, dass nach Zugabe von 0,1 M EDTA in einen TCA-Fällungstest (3.2.5.1) eine komplette Inhibierung der Nukleaseaktivität von 10 nM EndoGΔN53 (1,6 nM aktives Dimer) stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass zweiwertige Metallionen für die EndoG-Aktivität notwendig sind. Auch für alle bisher beschriebenen EndoG-Homologen wurde eine Aktivitätsabhängigkeit von zweiwertigen Metallionen beschrieben [Meiss *et al.*, 1998, Dake *et al.*, 1988, Gerschenson *et al.*, 1995]. In einem EndoG-Aktivitätstest wurden daher folgende divalente Metallionen in einem Bereich von 0,1 bis 10 mM getestet: Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in Reaktionspuffer, dem keine weiteren divalenten Ionen zugegeben waren, mit 54 μM Poly(A) bei 30°C. Die Menge an freigesetztem Oligo(A) wurde mit dem TCA-Fällungstest bestimmt. In Abbildung 19 sind die gemessenen Daten wiedergegeben.

Mit Zn<sup>2+</sup> konnte bis zu einer Konzentration von 10 mM keine Hydrolyse von Poly(A) gemessen werden. Ca<sup>2+</sup> ermöglichte eine geringe EndoG-Aktivität bei 0,1-1 mM. Die stärkste Nukleaseaktivität wurde gemessen, wenn Mn<sup>2+</sup> in niedrigen Konzentrationen vorlag. Mg<sup>2+</sup> ermöglichte die Poly(A)-Hydrolyse über einen wei-

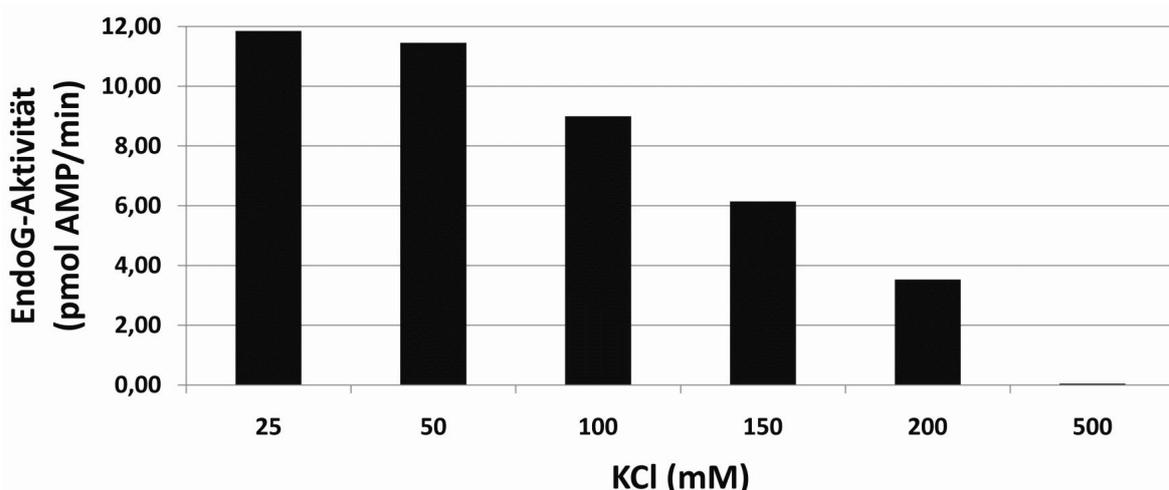


**Abbildung 19:** Einfluss von divalenten Metallionen auf die EndoG-Aktivität. Zu einem Reaktionsansatz mit 50 pM EndoGΔN53 (entspricht 8 pM aktivem Dimer) und 54 μM Poly(A) wurden die folgende Metallionen gegeben: Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>. Die EndoG-Aktivität wurde mit dem TCA-Fällungstest bestimmt (siehe 3.2.5.1).

ten Bereich mit einem Maximum der EndoG-Aktivität bei 1 mM. Höhere Konzentrationen wirkten offensichtlich bei allen divalenten Metallionen inhibierend. Es kann geschlussfolgert werden, dass divalente Metallionen essentiell für die EndoG-Aktivität sind und dabei vor allem  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  eine effiziente Hydrolyse ermöglichen.

#### 4.2.6.7. EndoG wird durch hohe Konzentrationen an KCl inhibiert

Kalium ist das dominierende anorganische Kation in eukaryotischen Zellen. Die physiologische Konzentration beträgt in humanen Zellen etwa 150 mM. Die Aktivität der EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N53 wurde daher bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen ermittelt. Die EndoG-Aktivität wurde mittels Inkubation in Reaktionspuffer mit 54  $\mu$ M Poly(A) und anschließender TCA-Fällung bestimmt. KCl lag in den Reaktionsansätzen in einem Bereich von 25-1000 mM vor (Abbildung 20). Die höchsten EndoG-Aktivitäten wurden bei Konzentrationen bis 50 mM KCl beobachtet, wohingegen Konzentrationen ab 100 mM KCl inhibierend wirkten. Bei 150 mM KCl war nur noch rund 50% der maximalen Nukleaseaktivität vorhanden, bei 500 mM KCl und höher war keine Hydrolyse mehr detektierbar. Somit inhibieren bereits physiologische Konzentrationen von Kaliumionen die EndoG-Aktivität. Dies ist auch für den Abbau von DNA durch die bovine EndoG berichtet worden [Gerschenson *et al.*, 1995]. Für die *Anabaena*-NucA wurde beschrieben, dass NaCl-Konzentrationen oberhalb von 100 mM die Nuklease-Aktivität inhibie-



**Abbildung 20:** Bestimmung der EndoG-Aktivität bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen. Es wurden KCl-Konzentrationen in einem Bereich von 25-1000 mM getestet. Dabei wurden in einem 20  $\mu$ l-Reaktionsansatz die steigende Ionenkonzentrationen mit 65 pM EndoG $\Delta$ N53 (dies entspricht 10 pM aktivem Dimer) und 54  $\mu$ M Poly(A) inkubiert. Die EndoG-Aktivität wurde mittels TCA-Fällungstest bestimmt (siehe 3.2.5.1).

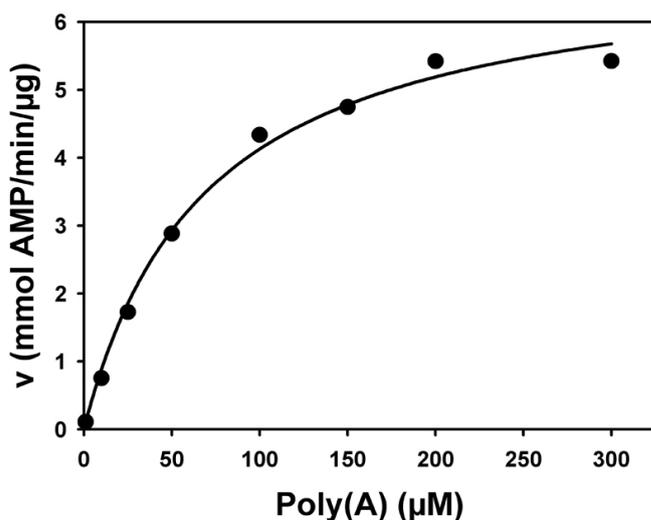
ren [Meiss *et al.*, 1998].

#### 4.2.6.8. EndoG weist einen hohen $K_m$ -Wert für Poly(A) auf

Mit Hilfe eines  $K_m$ -Werts kann die Affinität eines Enzyms für sein Substrat quantifiziert werden.  $K_m$ -Werte liegen in einem Bereich von 10 mM-1  $\mu$ M. Je niedriger der  $K_m$ -Wert desto höher die Affinität des Proteins für das Substrat. Da Poly(A) als Standardsubstrat in den EndoG-Aktivitätstests verwendet wurde, sollte die Affinität von EndoG für das Polymersubstrat Poly(A) bestimmt werden. Daher wurde eine  $v/S$ -Charakteristik von EndoG $\Delta$ N53 mit Poly(A) aufgenommen. Die Affinität für andere Substrate wurde nicht bestimmt, da diese nicht homogen markiert und daher nicht im TCA-Fällungstest verwendet werden konnten.

Die EndoG-Aktivität wurde mittels Inkubation in Reaktionspuffer mit steigenden Mengen unmarkiertem Poly(A) und anschließender TCA-Fällung bestimmt. Es wurde die entstandene Konzentration an AMP gemessen. Die Konzentration an homogen markiertem Poly(A) war in allen Proben unabhängig von der Poly(A)-Endkonzentration konstant. Poly(A) wurde im Reaktionsansatz in einem Bereich von 25-300 mM vorgelegt. In Abbildung 21 ist die  $v/S$ -Charakteristik der EndoG $\Delta$ N53 mit Poly(A) gezeigt.

Es konnte mit einer direkten Anpassung der Daten nach MICHAELIS-MENTEN ein  $K_m$ -Wert von  $58,3 \pm 7,4 \mu$ M ermittelt werden.



**Abbildung 21:**  $v/S$ -Charakteristik für EndoG $\Delta$ N53 mit Poly(A). Die Anpassung erfolgte nach der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung. Die Enzymaktivität wurde mit dem TCA-Fällungstest ermittelt, wobei eine EndoG $\Delta$ N53-Konzentration von 25 pM vorlag (entspricht 4 pM aktivem Dimer).

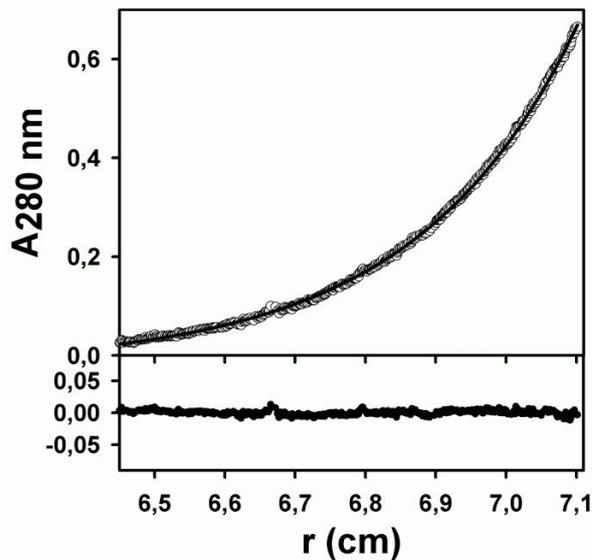
Bei der Inkubation der EndoG $\Delta$ N53 mit großen Substratkonzentrationen kann man im Rahmen des TCA-Fällungstest nach der gleichen Inkubationszeit nur eine vergleichbar geringe Radioaktivität messen, denn bei steigenden Poly(A)-Konzentrationen blieb die Konzentration an zugegebenem homogen markiertem Poly(A) konstant. Daher konnte in Proben mit hoher Poly(A)-Konzentration nach der gleichen Inkubationszeit weniger Radioaktivität gefällt werden. Die Werte für niedrigere Poly(A)-Konzentrationen sind daher genauer als Werte, die für die höheren Konzentrationen bestimmt wurden. Es bietet sich darum an, die Daten noch nach LINEWEAVER-BURK auszuwerten, denn dort fallen durch die doppelt-reziproke Auftragung niedrige Substratkonzentrationen für die Anpassung stärker ins Gewicht. Diese Auswertung ergab einen  $K_m$ -Wert von  $46,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ . Somit lieferten beide Verfahren vergleichbare  $K_m$ -Werte.

#### 4.2.6.9. EndoG $\Delta$ N55 N187K ist ein dimeres Protein

Das bisher am intensivsten untersuchte Mitglied der EndoG-Familie, die *Serratia*-Nuklease, wurde als Dimer beschrieben [Miller & Krause, 1996], ebenso die homologen Endonukleasen aus *Neurospora crassa*, Hefe, Maus, Rind und Mensch [Dake *et al.*, 1988, Cummings *et al.*, 1987, Low, 2003]. Die *Anabaena*-NucA hingegen liegt, bisher als einziges EndoG-ähnliches Enzym, als Monomer vor [Meiss *et al.*, 2000]. Da die *Drosophila*-EndoG, gleich dem *Anabaena*-Enzym, ebenfalls einen spezifischen Inhibitor besitzt, war es von großem Interesse den oligomeren Zustand zu untersuchen. Die Bestimmung der Molmasse sollte erneut mittels eines Sedimentationsgleichgewichts in der analytischen Ultrazentrifuge erfolgen (siehe 4.1.1).

Trotz intensiver Bemühungen resultierte aus Expression und Reinigung der aktiven EndoG $\Delta$ N53 nicht genügend Protein, um damit Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge durchzuführen. Einen Ausweg bot Dr. ANTON MEINHART (MPI Heidelberg), der die EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K zur Verfügung stellte, welche sich als nahezu inaktiv herausstellte (siehe 4.2.4). Dieses Protein lag in einer Konzentration von  $120 \mu\text{M}$  vor und wurde daher für die analytische Ultrazentrifugation verwendet.

EndoGI wurde in Sedimentationsgleichgewichtsläufen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen untersucht. Die Zentrifugation erfolgte bis das Gleichgewicht eingetreten war. Bei einer Monomerkonzentration von  $1-6 \mu\text{M}$  verhielt sich EndoG $\Delta$ N55 N187K als Dimer mit einem apparenten Molekulargewicht von  $58 \pm 6 \text{ kDa}$  (Abbildung 22). Da EndoG $\Delta$ N55 N187K als Monomer ein Molekularge-



**Abbildung 22:** Analytische Ultrazentrifugation von EndoG. 2  $\mu\text{M}$  EndoG $\Delta\text{N55}$  N187K wurde für 80 h bei 20000 rpm und 20°C zentrifugiert. Nachdem sich das Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde eine apparente Molekülmasse von  $58 \pm 6$  kDa bestimmt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Abweichung des gemessenen Signals von der nach der Svedberg-Gleichung berechneten Anpassung.

wicht von 30,5 kDa besitzt, entspricht die ermittelte Molmasse einem dimeren Zustand. In Abbildung 22 sind die gemessenen Daten eines Laufs mit einer Monomerkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  EndoG $\Delta\text{N55}$  N187K gezeigt. Die Anpassung erfolgte nach der Svedberg-Gleichung. EndoG aus *Drosophila melanogaster* verhält sich somit wie die Mehrheit seiner Homologen und nicht wie NucA aus *Anabaena*.

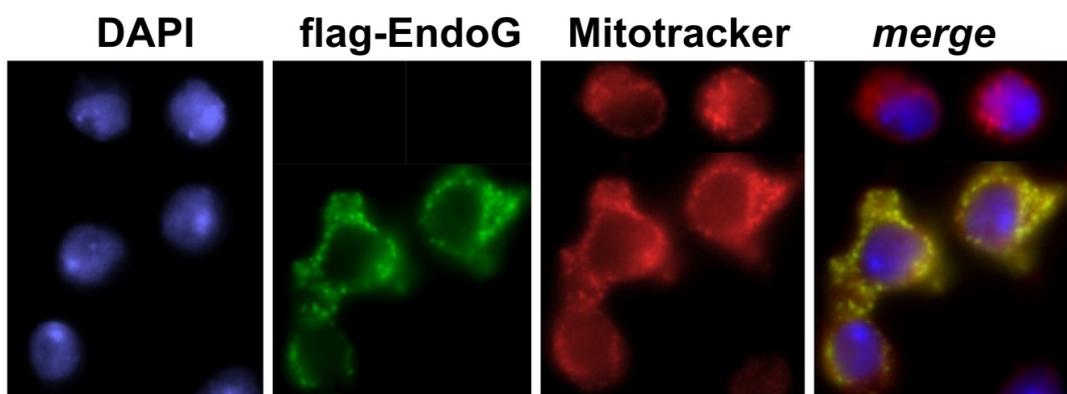
#### 4.2.6.10. EndoG befindet sich in den Mitochondrien

Die ersten 53 Aminosäuren der EndoG wurden als mitochondriale *targeting*-Sequenz identifiziert (siehe 4.2). Auch für homologe eukaryotische Endonukleasen G wurde eine mitochondriale Lokalisation beschrieben [Widlak *et al.*, 2001, Cummings *et al.*, 1987, Dake *et al.*, 1988]. Ob die *Drosophila*-EndoG ebenfalls mitochondrial lokalisiert ist, sollte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Schneider2-Zellen geklärt werden.

Das vorhandene spezifische Anti-Immunserum gegen *Drosophila*-EndoG war nicht sensitiv genug und zu unspezifisch, um damit direkt endogene EndoG in Schneider2-Zellen mittels Immunfluoreszenz zu detektieren. Um dennoch die Lokalisation der *Drosophila*-EndoG bestimmen zu können, wurde eine vollständige EndoG-Variante (flag-EndoG DAGA) in ein Schneider2-Zell-Expressionsplasmid kloniert. Im aktiven Zentrum dieser EndoG war das DRGH-Motiv zu DAGA mutiert worden, was eine komplette Inaktivierung zur Folge hatte (siehe 4.2.3). Des Weiteren wurde vor das C-terminale Stopcodon ein flag-tag eingefügt, um die Detektion mittels eines spezifischen flag-Antikörpers zu ermöglichen. Es wurde eine inaktive EndoG-Variante exprimiert um sicher zu stellen, dass es durch die Toxizität der

EndoG nicht zu Mutationen in den Zellen kommt (siehe 4.2.1). Da die Etablierung einer stabilen Zelllinie nicht erfolgreich war, wurde flag-EndoG DAGA transient in Schneider2-Zellen transfiziert und exprimiert.

Die Färbung erfolgte wie in 3.2.1.8 beschrieben. Zur Detektion von EndoG wurde ein monoklonaler Maus-anti-flag-Antikörper verwendet, der wiederum mittels eines sekundären FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörpers detektiert wurde. Als mitochondrialer Marker wurde Mitotracker verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt Mitochondrien in lebenden Zellen. Des Weiteren wurde der Zellkern durch Interaktion des Farbstoffs DAPI mit nukleärer DNA sichtbar gemacht.



**Abbildung 23:** Mitochondriale Lokalisation von EndoG. Ein Expressionskonstrukt für EndoG DAGA mit einem C-terminalen flag-tag wurde in Schneider2-Zellen transient transfiziert. Die Zellen wurden mit DAPI (links), FITC-gekoppelten anti-flag-Antikörper (2. von links) und Mitotracker (3. von links) gefärbt. In der Abbildung rechts ist die Überlagerung aller Signale gezeigt.

In Abbildung 23 sind die drei verschiedenen Färbungen zu sehen. Durch die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde deutlich, dass sich EndoG in den Mitochondrien befindet: Das rote Signal, welches vom mitochondrialen Marker Mitotracker ausgeht, und das grüne EndoG-FITC-Signal überlagern sich genau, was eine Kollokalisation indiziert (siehe Abbildung 23 ganz rechts). Das Signal des Zellkerns wird nicht vom EndoG-Signal überlagert, so dass eine nukleäre Lokalisation ausgeschlossen werden kann. Zellen, die Mitotracker-positiv aber flag-negativ sind, sind nicht transfizierte Zellen und bestätigen die Spezifität des flag-Antikörpers (Abbildung 23, obere Zellen).

### 4.3. Der EndoG-EndoGI-Komplex

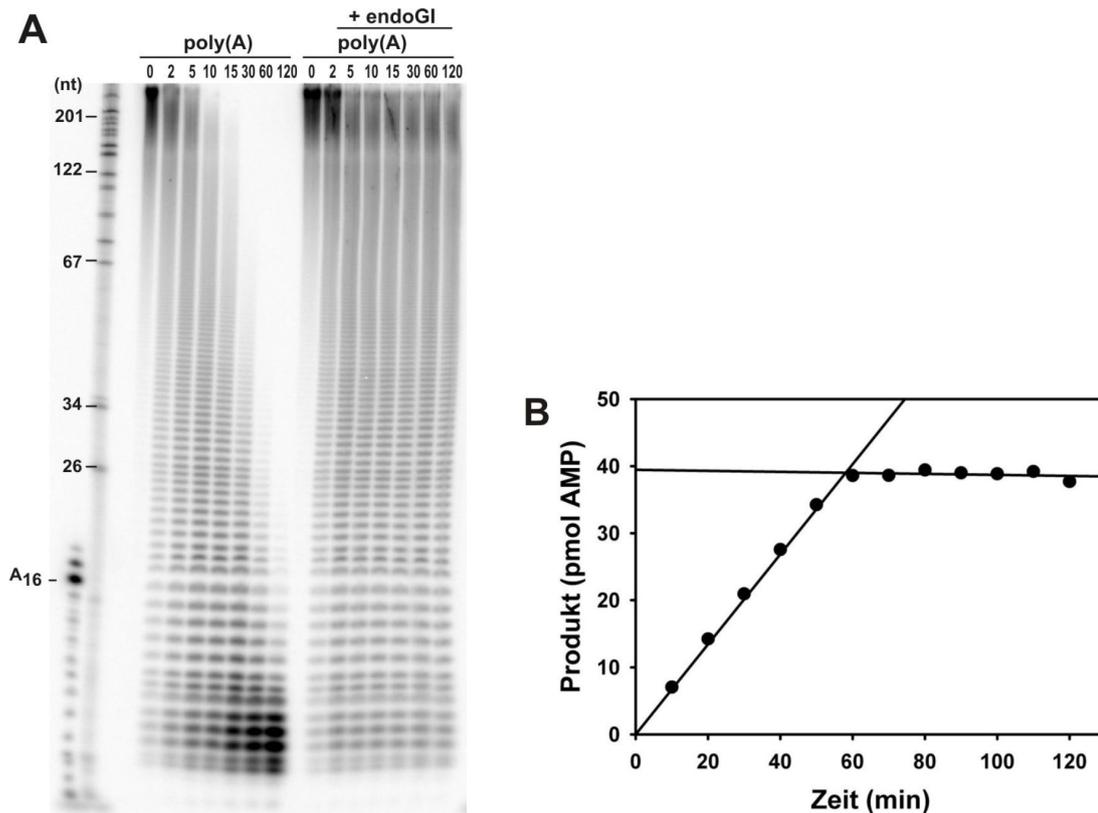
#### 4.3.1. EndoG $\Delta$ N53 wird durch EndoGI unmittelbar und komplett gehemmt

An die Untersuchungen der funktionellen Eigenschaften von EndoG und EndoGI sollte sich eine Charakterisierung des EndoG-EndoGI-Komplexes anschließen. Dafür wurde zunächst die Fähigkeit von EndoGI die EndoG-Aktivität zu hemmen näher betrachtet. Während der Reinigung von rekombinanter EndoG $\Delta$ N53 war im *Escherichia coli*-Extrakt die Messung von EndoG-Aktivität aufgrund des koexprimierten EndoGIs nicht möglich (siehe 4.2.2). Dies deutet auf eine starke und komplette Inhibierung von EndoG durch EndoGI hin. Im nachfolgenden Experiment sollte geklärt werden, ob ein EndoGI-Überschuss in der Lage ist, die Aktivität der EndoG vollständig zu hemmen.

In einem Reaktionsansatz befanden sich 0,25  $\mu$ M homogen markiertes Poly(A). Durch Zugabe von 26 pM EndoG $\Delta$ N53 (4 pM aktives Dimer) wurde die Reaktion gestartet. Einem zweiten Reaktionsansatz gleicher Zusammensetzung wurden 5 min nach Beginn der Reaktion ein 260-facher molarer Überschuss EndoGI zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden den beiden Reaktionsansätzen Aliquots entnommen und mit Formamid-Ladepuffer gemischt. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem Harnstoffpolyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *PhosphorImaging* analysiert (siehe Abbildung 24A).

Auf der linken Hälfte des Gels sind die Produkte der Inkubation von homogen markiertem Poly(A) mit EndoG zu verschiedenen Zeitpunkten zu sehen. Deutlich sichtbar ist der charakteristische kontinuierliche Abbau der Substrate zu Oligonukleotiden. Auf der rechten Seite des Gels wurde zum Zeitpunkt  $t = 5$  min dem Reaktionsgemisch 7 nM EndoGI zugefügt. An den nun folgenden Zeitpunkten konnte kein weiterer Abbau des Poly(A) detektiert werden, denn das Abbaumuster von Poly(A) blieb konstant und es kam zu keiner weiteren Akkumulation von Reaktionsendprodukten. Durch dieses Experiment konnte qualitativ nachgewiesen werden, dass die Aktivität von EndoG unmittelbar durch EndoGI blockiert wird.

Um eine unmittelbare und vollständige Hemmung auch quantitativ nachzuweisen, wurde das Experiment mit Hilfe des TCA-Fällungstests reproduziert. Einem Reaktionsgemisch mit 4 pM aktivem dimerem EndoG $\Delta$ N53 und 54  $\mu$ M Poly(A) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots entnommen und in diesen die Reaktion abgestoppt. Nach einer Reaktionszeit von 60 min wurde 130 nM EndoGI, was einem 5000-fachen molaren Überschuss entsprach, zugefügt und weitere Aliquots



**Abbildung 24:** Sofortige und vollständige Hemmung von EndoG durch EndoGI. **A** In einem 20  $\mu$ l Reaktionsansatz wurden 5 pmol homogen markiertes Poly(A) und 26 pM EndoG $\Delta$ N53 inkubiert (4 pM aktives Dimer). Nach 2 und 5 min wurden je 2  $\mu$ l entnommen und mit 4  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer gemischt. Im rechten Abschnitt des Gels wurde der Reaktion zum Zeitpunkt  $t = 5$  min 7 pM EndoGI zugegeben und zu den angezeigten Zeitpunkten weitere Proben entnommen. Die Proben wurden auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Zeitpunkt  $t = 0$  zeigt das Substrat vor Enzymzugabe. **B** 26 pM EndoG $\Delta$ N53 (4 pM aktives Dimer) wurden in Reaktionspuffer bei Standardbedingungen inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und in Stopplösung gegeben. Nach 60 min wurden 130 nM EndoGI in den Reaktionsansatz gegeben und weitere Aliquots entnommen. Die Datenpunkte wurden linear angepasst und die Progresskurven schneiden sich exakt zu dem Zeitpunkt der Inhibitorzugabe.

entnommen.

In Abbildung 24B ist die durch den TCA-Fällungstest bestimmte molare Menge an TCA-löslichen Reaktionsprodukten gegen die Zeit aufgetragen. Es lag ein konstanter Poly(A)-Umsatz vor, erkennbar an dem linearen Anstieg der Produktmenge. Nachdem der 5000-fache molare Überschuss an EndoGI dem Reaktionsgemisch zugegeben wurde, war kein weiterer Poly(A)-Abbau detektierbar, denn die hydrolysierte Menge an Poly(A) blieb konstant. Die Datenpunkte wurden linear angepasst und der Schnittpunkt beider Geraden war zugleich der Zeitpunkt der Inhibitorzugabe. Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass ein Überschuss an EndoGI

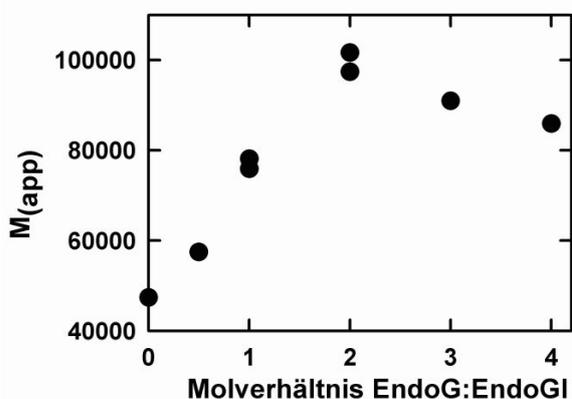
die Aktivität von EndoG vollständig und unmittelbar unterbinden kann. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Inhibierung von EndoG durch einfache Assoziation von EndoGI ermöglicht wird.

#### 4.3.2. Der EndoG-EndoGI-Komplexes besitzt eine 2:1-Stöchiometrie

Die *Anabaena*-Nuklease NucA ist das einzige EndoG-Homologe, für welches ebenfalls ein spezifischer Proteininhibitor bekannt ist. Die Stöchiometrie des NucA-NucA-Komplexes wurde mittels Ultrazentrifugation mit 1:1 bestimmt [Meiss *et al.*, 1998]. Dabei liegt NucA allein im Gegensatz zu EndoG als Monomer vor. *Drosophila*-EndoGI besitzt zwei homologe Domänen, die möglicherweise unabhängig voneinander mit EndoG interagieren können. Es stellte sich die Frage, ob die *Drosophila*-EndoG, obwohl sie dimerisiert, ebenfalls in einem 1:1-Komplex mit EndoGI vorliegt, oder die besondere Struktur von EndoGI die Stöchiometrie des EndoG-EndoGI-Komplexes beeinflusst. Daher wurde die Stöchiometrie des Nuklease-Inhibitor-Komplexes durch analytische Ultrazentrifugation bestimmt.

Auch für die Molmassebestimmung des EndoG-EndoGI-Komplexes wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt (siehe 4.1.1). Erneut wurde die nahezu inaktive EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K verwendet, denn diese Variante allein bildet stabile Dimere (siehe 4.2.6.9). Diese Beobachtung indiziert, dass trotz der geringen Aktivität eine native Struktur vorliegt.

Unter Gleichgewichtsbedingungen wurden 5  $\mu$ M EndoGI mit 0-20  $\mu$ M EndoG $\Delta$ N55 N187K titriert. Die Zentrifugation erfolgte, bis stabile Komplexe beobachtet wurden. Die gemessenen Daten sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25:** Analytische Ultrazentrifugation von EndoG $\Delta$ N55 N187K mit EndoGI. 5  $\mu$ M EndoGI wurden mit 0-20  $\mu$ M EndoG $\Delta$ N55 N187K titriert. Die Proben wurden bei 10000 rpm und 20°C bis zur Einstellung eines Gleichgewichts zentrifugiert. Die Berechnung der apparenten Molekularmassen der entsprechenden Proteinmischungen wurde aus Daten vorgenommen, die bei 230 und 280 nm aufgenommen wurden. Abgebildet sind Daten von zwei unabhängigen Experimenten.

Der Komplex mit der größten apparenten Masse wurde bei zweifach molarem Überschuss von (monomerem) EndoG $\Delta$ N55 N187K über EndoGI ermittelt. Das apparente Molekulargewicht dieses Komplexes von  $101 \pm 3,8$  kDa entspricht dabei etwa dem Molekulargewicht von zwei Molekülen EndoG (30,5 kDa) und einem Molekül EndoGI (44,5 kDa). Ein Molekül EndoGI bindet daher offenbar ein dimeres Molekül EndoG. Diese Stöchiometrie konnte von Dr. ANTON MEINHART (MPI Heidelberg) auch durch isothermale Titrationskalorimetrie bestätigt werden (persönliche Mitteilung). Die 2:1-Stöchiometrie des EndoG-EndoGI-Komplexes unterscheidet sich daher von der des 1:1-NucA-NuiA-Komplexes. So scheinen die beiden Inhibitoren, obwohl sie funktionell homolog sind, keine oder nur eine geringfügige Strukturhomologie zu besitzen.

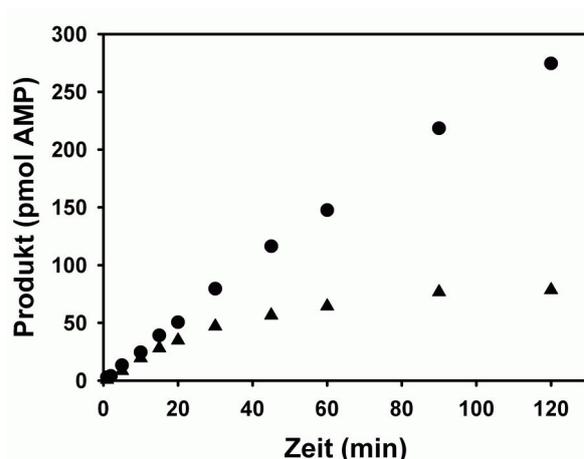
Da EndoG $\Delta$ N55 N187K eindeutig definierte Komplexe mit EndoGI bildete, konnte untermauert werden, dass diese Variante, trotz geringer enzymatischer Aktivität, eine native Struktur besitzt.

#### **4.3.3. EndoGI bindet EndoG $\Delta$ N53 mit hoher Affinität**

Während der Reinigung von rekombinanter EndoG hatte es sich als schwierig erwiesen, koexprimiertes EndoGI abzutrennen (4.2.2). Trotz eines fehlendes His-tags konnte nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie EndoGI mittels *Western blotting* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Erst im weiteren Verlauf der Reinigung war die vollständige Trennung von EndoG und EndoGI erfolgreich (siehe 4.2.2). Diese Beobachtung deutet auf eine hohe Affinität der beiden Proteine hin. Um die exakte Affinität von EndoGI für EndoG zu bestimmen, wurde EndoGI zu EndoG titriert. Die EndoG-Aktivität wurde durch TCA-Fällungstests ermittelt (3.2.5.1). Es wurde bei pikomolaren Konzentrationen gearbeitet. Bei diesen Konzentrationen ist die Komplexbildung zeitabhängig und nicht unmittelbar (bimolekulare Reaktion). Im folgendem Experiment wird dieser Sachverhalt dargestellt (siehe Abbildung 26).

Es wurde zeitabhängig der Substratumsatz von EndoG in An- und Abwesenheit von EndoGI beobachtet. Dabei reichte die zugegebene Konzentration von EndoGI für eine komplette Inhibierung der EndoG nicht aus und eine Restaktivität sollte bestimmbar sein. Bei einem erwarteten konstanten Substratumsatz müsste sowohl für EndoG, als auch für EndoG in Gegenwart von EndoGI ein linearer Anstieg an Produkt zu beobachten sein.

Wurde 3,5 pM aktives dimeres EndoG $\Delta$ N53 mit Poly(A) inkubiert, lag genau dieser lineare Anstieg an Produkt über die Zeit vor (Abbildung 26, Punkte). Bei der

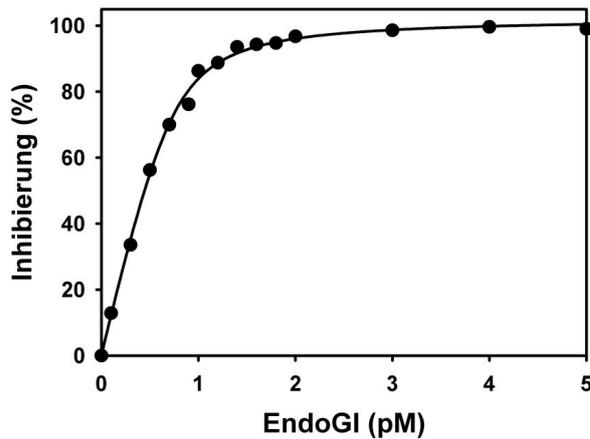


**Abbildung 26:** Kinetik der EndoG-EndoGI-Bindung. Inkubation von 3,5 pM dimerer aktiver EndoGΔN53 allein (Punkte) oder mit 2 pM EndoGI (Dreieck) in einem Reaktionsgemisch mit 54 μM Poly(A) bei 30°C. Die Proteine wurden in Reaktionspuffer gemischt und die Reaktion durch Zugabe von Poly(A) gestartet. Aliquots wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen und abgestoppt. Die TCA-lösliche Produktmenge wurde durch den TCA-Fällungstest bestimmt.

Betrachtung des Substratumsatzes der EndoG in Gegenwart von EndoGI fällt auf, dass kein konstanter Umsatz vorlag (Dreiecke). Stattdessen beschreibt der Umsatz eine Kurvatur. Bei Inkubation von 3,5 pM EndoGΔN53 mit 2 pM EndoGI war der Substratumsatz zunächst konstant und nahezu gleich dem der EndoGΔN53 in Abwesenheit von EndoGI. Somit scheint initial nur ein Bruchteil des EndoGI bereits EndoG gebunden zu haben, denn es wurde eine fast maximale EndoG-Aktivität erreicht. Nach 15 min konnte jedoch beobachtet werden, dass der Poly(A)-Umsatz immer mehr abnahm. Es kam zur vermehrten Inhibierung der EndoGΔN53 und damit zur vermehrten EndoG-EndoGI-Komplexbildung, deutlich zu erkennen am „Abknicken“ der Progresskurve zwischen den Zeitpunkten 20-90 min. Erst nach rund 90 min war die Komplexbildung abgeschlossen und ein konstanter, wesentlich geringerer Umsatz blieb bestehen. Für alle weiteren Untersuchungen des Komplexes bei pikomolaren Konzentrationen war es daher erforderlich, die eingesetzten Proteine zunächst in Reaktionspuffer (3.2.5.1) in Abwesenheit von Substrat für 90 min bei 30°C vorzuinkubieren, um die vollständige Komplexbildung zu ermöglichen. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch mit den in Abbildung 24 dargestellten Experimenten, denn dort wurde ein großer molarer Überschuss an EndoGI verwendet. Damit wurde die Bildung des Komplexes nach dem Massenwirkungsgesetz beschleunigt, denn die Assoziation ist eine Reaktion zweiter Ordnung.

Zur Bestimmung des  $K_D$ -Werts des Komplexes wurde EndoGI zu einer konstanten Konzentration von EndoGΔN53 titriert. Die EndoG-Aktivität wurde mit dem TCA-Fällungstest ermittelt (siehe 3.2.5.1). Es wurden Titrations bei drei verschiedenen EndoGΔN53-Konzentrationen im Bereich von 8,7-26 pM (entspricht 1,2-4 pM aktivem Dimer) durchgeführt. Dafür wurde EndoGI in einem Bereich von 0,05-5 pM titriert.

In Abbildung 27 ist eine dieser Titrations und die entsprechende Anpassung zu



**Abbildung 27:** Affinität von EndoGI für EndoG. 8,7 pM EndoG $\Delta$ N53 (1,4 pM aktives dimeres EndoG $\Delta$ N53) wurden mit EndoGI im Bereich von 0,05-5 pM titriert. Die Proteine wurden in Reaktionspuffer 90 min vorinkubiert, die Reaktion dann durch Zugabe von 54  $\mu$ M Poly(A) gestartet und nach 4 h 20 min gestoppt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 3 (siehe 3.2.5.1). Für diese Messung wurde ein  $K_D$ -Wert von 0,1 pM berechnet.

sehen. Dabei basiert der ermittelte  $K_D$ -Wert auf fünf unabhängigen Messungen. Die erhaltenen Daten wurden an die Gleichung 3 (3.2.5.1) angepasst und ein  $K_D$ -Wert von  $0,16 \pm 0,06$  pM berechnet. Voraussetzung für die Anpassung ist die Annahme, dass es sich um ein echtes Gleichgewicht zwischen EndoG und EndoGI handelt.

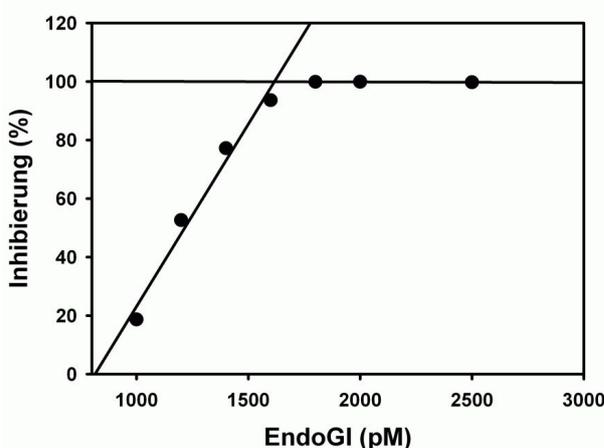
Bei der Anpassung der gemessenen Daten kam es zu einer überraschenden Beobachtung. Wurden die mittels SDS-PAGE berechnete Proteinkonzentrationen für EndoG $\Delta$ N53 in die Gleichung 3 (3.2.5.1) eingesetzt, konnten die Daten nicht angepasst werden. Erfolgte jedoch eine freie Anpassung der Daten, indem keine EndoG $\Delta$ N53-Konzentration vorgegeben wurde, erfolgte die Anpassung wie in Abbildung 27 zu sehen. Dabei wurden EndoG-Konzentrationen ermittelt, die etwa um ein 2-10-faches niedriger waren als die gemessenen EndoG-Monomerkonzentrationen. Diese ermittelten EndoG-Konzentrationen konnten darüber hinaus streuen, wobei die ermittelten  $K_D$ -Werte konstant blieben. Es gab eine deutliche Diskrepanz zwischen der gemessenen EndoG-Konzentration und der tatsächlichen Konzentration an aktivem Enzym, was auf größere Abweichungen in der Proteinbestimmung hinwies. Des Weiteren könnte auch ein Teil des gereinigten EndoG-Proteins inaktiv sein. Zur Bestimmung der tatsächlichen Konzentration an aktiver EndoG wurde eine stöchiometrische Titration durchgeführt (siehe 4.3.4).

#### 4.3.4. Die rekombinante EndoG $\Delta$ N53 ist nur teilweise aktiv

Wie bereits erwähnt, gab es eine deutliche Diskrepanz zwischen der berechneten und der tatsächlichen Konzentration an aktiver EndoG (siehe 4.3.3). Mittels einer stöchiometrischen Titration wurde die tatsächliche Konzentration an aktiver EndoG $\Delta$ N53 bestimmt. Dabei wurden EndoG und EndoGI bei nanomolaren Kon-

zentrationen titriert. Diese Konzentrationen befinden sich 1000-fach über dem ermittelten  $K_D$ -Wert. Daher kann nach dem Massenwirkungsgesetz davon ausgegangen werden, dass eine unmittelbare Komplexbildung stattfindet und damit die Konzentration an EndoGI, bei der keine EndoG-Aktivität mehr messbar ist, der Konzentration an aktivem EndoG-Dimer entspricht. Dabei gilt die Voraussetzung, dass inaktive EndoG kein EndoGI bindet.

Die EndoG-Aktivität wurde mit Hilfe des TCA-Fällungstest bestimmt. Zu 10 nM EndoG $\Delta$ N53 (gemessene Monomerkonzentration) wurden 1-25 nM EndoGI titriert. In Abbildung 28 sind die gemessenen Daten gezeigt.



**Abbildung 28:** Stöchiometrische Titration von EndoG mit EndoGI. Zu 10 nM EndoG $\Delta$ N53 wurden 1-2,5 nM EndoGI zu titriert. Die Proteine wurden in Reaktionspuffer gemischt, die Reaktion wurde durch Zugabe von 54  $\mu$ M Poly(A) gestartet und nach 2 min gestoppt. Die hydrolysierte Menge an Poly(A) wurde mittels TCA-Fällungstest ermittelt (siehe 3.2.5.1). Die Datenpunkte wurden linear angepasst und die Geraden schneiden sich bei 1,6 nM EndoGI.

Die Datenpunkte wurden linear angepasst. Der Schnittpunkt beider Geraden liegt bei 1,6 nM EndoGI. Wenn diese Konzentration an EndoGI eine komplette Inhibierung ermöglichte und von einem 2:1-EndoG-EndoGI-Komplex ausgegangen wird, enthielt der Reaktionsmix statt 10 nM nur 3,2 nM monomere und aktive EndoG. Somit sind nur rund 30% der eingesetzten Konzentration von EndoG aktiv. Für alle Experimente wird daher in dieser Dissertationsschrift sowohl die mittels SDS-PAGE, als auch die mittels Titration gemessene Konzentration an EndoG $\Delta$ N53 angegeben.

#### 4.3.5. Beide EndoGI-Domänen sind aktiv

Wie zuvor erläutert, besteht EndoGI aus zwei homologen Domänen (siehe Abbildung 5). Da zudem der EndoG-EndoGI-Komplex eine 2:1-Stöchiometrie aufweist, entstand die Frage, ob beide Domänen des Inhibitors unabhängig voneinander die Aktivität von EndoG inhibieren können. Es wurden beide Domänen separat kloniert. Dabei wurden die Aminosäuren 1-192 der N-terminalen Domäne und die

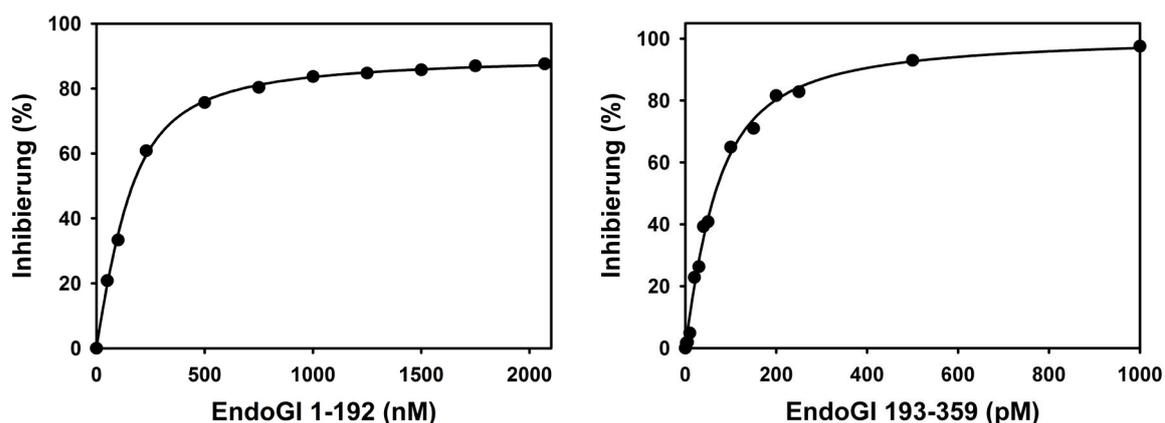
Aminosäuren 193-359 der C-terminalen Domäne zugeordnet. Es erfolgte die rekombinante Expression in *Escherichia coli* und die Reinigung der Proteine (siehe 3.2.3.7). Die  $K_D$ -Werte wurden durch separate Titration von EndoG $\Delta$ N53 mit den Domänen bestimmt.

Die nukleolytische Aktivität der EndoG wurde mittels TCA-Fällungstest ermittelt. Dafür wurde 13-65 pM EndoG $\Delta$ N53 (2-10 pM aktives Dimer) mit der jeweiligen EndoGI-Domäne in Gegenwart von 54  $\mu$ M Poly(A) inkubiert.

Die N-terminale Domäne (EndoGI 1-192) wurde in einem Bereich von 50-2070 nM titriert. Eine dieser Titrations ist im linken Teil der Abbildung 29 wiedergegeben. Die Anpassung der Daten von vier unabhängigen Messungen mit der Gleichung 3 (siehe 3.2.5.1) ergab einen  $K_D$ -Wert von  $70 \pm 6$  nM und damit eine um einen Faktor 400.000 verringerte Affinität von EndoGI 1-192 für EndoG im Vergleich zum vollständigen EndoGI.

Die C-terminale Domäne (EndoGI 193-359) wurde von 0,05-2 nM titriert und in Abbildung 29 rechts ist eine dieser Titrations dargestellt. Nach Anpassung der ermittelten Daten von vier unabhängigen Titrations mit der Gleichung 3 wurde ein  $K_D$ -Wert von  $40 \pm 6$  pM berechnet. Damit besitzt die C-terminale Domäne eine 1750-fach höhere Affinität zu EndoG als die N-terminale Domäne. Die Affinität des vollständigen EndoGI ist dennoch um das 250-fache höher als die der C-terminalen EndoGI-Domäne.

Mit diesen Titrations konnte bewiesen werden, dass beide Domänen in der La-



**Abbildung 29:** Affinität der EndoGI-Domänen für EndoG. **Links** 65 pM EndoG $\Delta$ N53 (10 pM aktives Dimer) wurden mit 0,05-2,07  $\mu$ M EndoGI 1-192 titriert. Die Proteine wurden in Reaktionspuffer gemischt, die Reaktion wurde durch Zugabe von Poly(A) gestartet und nach 2 h gestoppt. **Rechts** 32 pM EndoG $\Delta$ N53 (5 pM aktives Dimer) wurde mit 0,05-2 nM EndoGI 193-359 titriert. Die Proteine wurden in Reaktionspuffer für 90 min vorinkubiert, die Reaktion wurde durch Zugabe von Poly(A) gestartet und nach 3 h gestoppt. In beiden Abbildungen ist die Anpassung der Daten mit der Gleichung 3 (3.2.5.1) zu sehen.

ge sind, die EndoG $\Delta$ N53-Aktivität separat zu inhibieren. Allerdings haben beide EndoGI-Domänen eine deutlich niedrigere Affinität zu EndoG $\Delta$ N53 als der vollständige EndoG-Inhibitor. Die mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmte 2:1-Stöchiometrie des Komplexes wird somit durch die Interaktion beider EndoGI-Domänen mit je einem EndoG-Monomer erklärt.

Nachdem die  $K_D$ -Werte der einzelnen EndoGI-Domänen separat bestimmt waren, ergab sich die Frage, ob durch Titration beider EndoGI-Domänen zusammen die inhibitorische Kapazität von vollständigem EndoGI wieder hergestellt wird. In einem Reaktionsansatz wurde EndoG $\Delta$ N53 mit beiden EndoGI-Domänen gleichzeitig titriert. Der EndoG-Umsatz wurde erneut mittels TCA-Fällungstest bestimmt. Der ermittelte  $K_D$ -Wert von 40 pM entsprach dem der C-terminalen Domäne (Daten nicht gezeigt), die die höhere Affinität für EndoG aufweist. Es konnte keine weitere Affinitätszunahme beobachtet werden. Somit ließ sich durch einfache Komplementation der beiden EndoGI-Domänen die inhibitorische Kapazität des vollständigen EndoGI nicht erreichen.

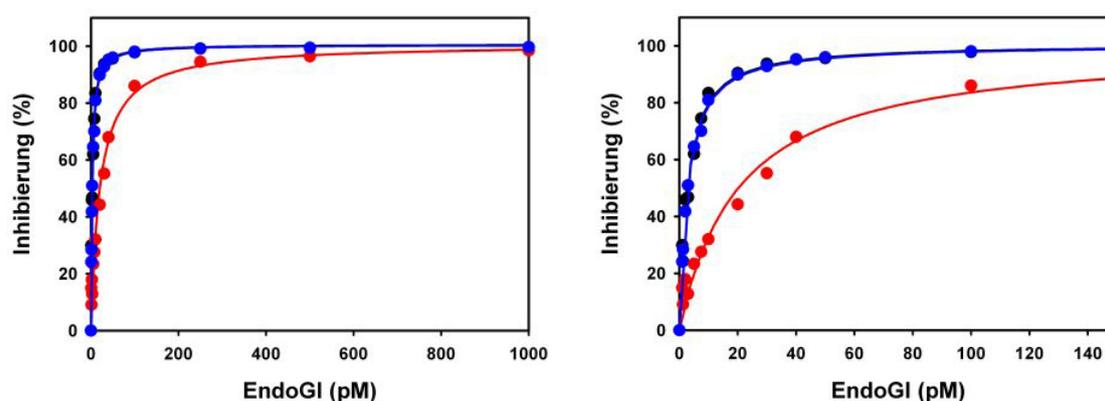
#### 4.3.6. EndoG $\Delta$ N53 DAGA kann EndoGI nicht binden

Bereits 1994 wurde berichtet, dass der spezifische Inhibitor Barstar die extrazelluläre RNase Barnase (beide aus *Bacillus amyloliquefaciens*) durch Interaktion mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums inhibiert [Buckle *et al.*, 1994]. Dabei wird vor allem das Histidin 102 behindert, welches als allgemeine Base die RNA-Hydrolyse katalysiert. Auch für die EndoG-homologe Nuklease NucA aus *Anabaena* wurde festgestellt, dass das aktive Zentrum an der Bindung des spezifischen Inhibitors NuiA beteiligt ist [Ghosh *et al.*, 2007].

Vor dem Hintergrund dieser Informationen war es daher von Interesse zu untersuchen, ob ein korrektes aktives Zentrum der EndoG notwendig für die EndoG-EndoGI-Interaktion ist. In der bereits vorgestellten EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N53 DAGA (siehe 4.2.3) wurde das aktive Zentrum durch Aminosäureaustausch von DRGH zu DAGA mutiert, um eine Expression in Abwesenheit des Inhibitors zu ermöglichen. Es war gezeigt worden, dass dieser Austausch in der bovinen EndoG zu vollständigem Aktivitätsverlust führt [Schäfer *et al.*, 2004]. Es wurde mittels eines TCA-Fällungstests nachgewiesen, dass die *Drosophila*-EndoG $\Delta$ N53 DAGA eine um einen Faktor  $10^7$  verringerte spezifische Aktivität besitzt (siehe 4.2.3). Da diese Variante jedoch verwendet werden sollte, um die Stöchiometrie des EndoG-EndoGI-Komplexes in der analytischen Ultrazentrifuge zu bestimmen, wurde getestet, ob diese inaktive EndoG-Variante mit der aktiven En-

doG um EndoGI konkurrieren kann.

Eine Titration von EndoGI zu einer konstanten Konzentration EndoG $\Delta$ N53 wurde daher in Gegenwart eines 10-fachen molaren Überschusses an EndoG $\Delta$ N53 DAGA durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Experiment auch mit einem 10-fachen molaren Überschuss an aktiver EndoG $\Delta$ N53 vollzogen. Zu 32 pM EndoG $\Delta$ N53 (gemessene Monomerkonzentration, 5 pM aktives Dimer) wurden 320 pM EndoG $\Delta$ N53 DAGA bzw. EndoG $\Delta$ N53 zugefügt und anschließend EndoGI im Bereich von 1-1000 pM titriert. Der Poly(A)-Umsatz durch die aktive EndoG $\Delta$ N53 wurde mittels des TCA-Fällungstests (siehe 3.2.5.1) bestimmt. Die gemessenen Daten wurden mit der Gleichung 3 angepasst (3.2.5.1). In Abbildung 30 sind sowohl die Datenpunkte, als auch die Anpassungen zu sehen.



**Abbildung 30:** Titration von EndoGI zu EndoG in Gegenwart eines Überschusses an EndoG $\Delta$ N53 DAGA. In allen Ansätzen befand sich 32 pM EndoG $\Delta$ N53 (5 pM aktives Dimer), welches mit 1-1000 pM EndoGI titriert wurde. Es wurde bei der blauen Kurve ein 10-facher Überschuss EndoG $\Delta$ N53 DAGA und bei der roten Kurve ein 10-facher Überschuss EndoG $\Delta$ N53 zugegeben. Die schwarze Kurve gibt die Daten der Titration von EndoG $\Delta$ N53 mit EndoGI allein wieder. Die Proteine wurden in Reaktionspuffer gemischt, die Reaktion wurde durch Zugabe von Poly(A) gestartet und nach 3 h bzw. für die rote Kurve nach 25 min gestoppt. Um die Aktivitäten unterschiedlicher Enzymmengen an aktiver EndoG $\Delta$ N53 zu berücksichtigen und die Reaktionen im linearen Bereich der Produkt-Zeit-Kurve zu beenden, wurden diese zu unterschiedlichen Zeiten abgestoppt. Die Anpassung erfolgte mit der Gleichung 3 (3.2.5.1). In der Abbildung rechts ist ein Ausschnitt der Titration zu sehen.

Würde die inaktive EndoG mit der aktiven EndoG um EndoGI konkurrieren, sollte eine Wiederherstellung von EndoG $\Delta$ N53-Aktivität, und damit eine Verschiebung der Anpassung nach rechts zu beobachten sein. Dies ist nicht der Fall. Der Kurvenverlauf für die EndoG-EndoGI-Titration allein (schwarz) und der für die Titration in Gegenwart von EndoG $\Delta$ N53 DAGA (blau) sind identisch. Wohingegen für die Titration in Gegenwart eines 10-fachen molaren Überschusses an aktiver EndoG

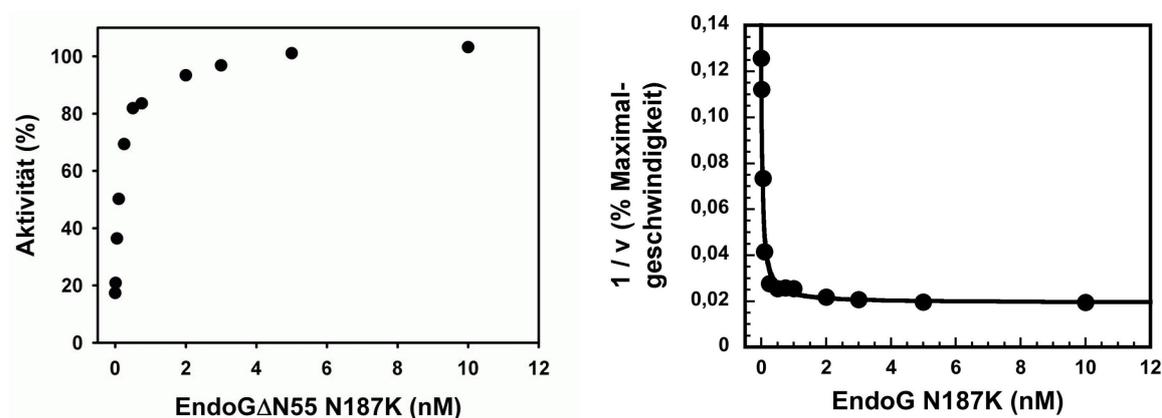
eine deutliche Rechtsverschiebung der roten Kurve zu beobachten ist (Abbildung 30). In weiteren Titrationsen wurde EndoG $\Delta$ N53 DAGA bis zu einem 5000-fachen molaren Überschuss zugegeben. Es konnte jedoch nie eine Rückgewinnung von EndoG $\Delta$ N53-Aktivität beobachtet werden. Somit ist EndoG $\Delta$ N53 DAGA, selbst bei einem über 1000-fachen Überschuss, nicht in der Lage EndoGI zu binden. Da EndoG $\Delta$ N53 DAGA korrekt gefaltet zu sein scheint (siehe 4.2.5), lässt sich daraus schließen, dass das aktive Zentrum der *Drosophila*-EndoG an der EndoGI-Bindung beteiligt ist.

#### 4.3.7. EndoG $\Delta$ N55 N187K konkurriert mit EndoG um EndoGI

Nachdem festgestellt wurde, dass eine EndoG-Variante mit mutiertem aktiven Zentrum unfähig ist, mit der Wildtyp-EndoG um EndoGI zu konkurrieren (siehe 4.3.6), sollte untersucht werden, ob die zweite nahezu inaktive EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K ebenfalls nicht in der Lage ist, mit EndoG $\Delta$ N53 um EndoGI zu konkurrieren. EndoG $\Delta$ N55 N187K besitzt nur eine sehr geringe Aktivität (spezifische Aktivität 1.000.000-fach niedriger als Wildtyp). Dabei ist das DRGH-Motiv in dieser EndoG-Variante intakt (siehe 4.2.4). Die verminderte Aktivität ist auf eine Punktmutation des Asparagins 187 zu Lysin zurückzuführen, wobei Asparagin 187 höchstwahrscheinlich an der Bindung des katalytisch wichtigen divalenten Metallions beteiligt ist und damit zum aktiven Zentrum der EndoG gehört [Schäfer *et al.*, 2004]. EndoG $\Delta$ N55 N187K ist jedoch in der Lage, stabile Komplexe mit EndoGI zu bilden (siehe 4.3.2). Die EndoG $\Delta$ N53-Aktivität im folgenden Experiment wurde mittels des TCA-Fällungstests bei einer Poly(A)-Konzentration von 54  $\mu$ M bestimmt. Die Aktivität der EndoG $\Delta$ N55 N187K war bei den verwendeten Konzentrationen zu vernachlässigen.

In einem Reaktionsgemisch wurden konstante Mengen aktiver EndoG $\Delta$ N53 mit steigenden Mengen EndoG $\Delta$ N55 N187K inkubiert, bevor eine konstante Menge EndoGI zugegeben wurde. Dabei konnte in Abwesenheit von EndoG $\Delta$ N55 N187K rund 20% Restaktivität gemessen werden. Es wurde untersucht, ob bei steigenden EndoG $\Delta$ N55 N187K-Konzentrationen die EndoG-Aktivität trotz Gegenwart von EndoGI wiedererlangt wurde.

Dafür wurden 13 pM EndoG $\Delta$ N53 (2,5 pM aktives Dimer) mit 0,01-10 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K gemischt und anschließend 2 pM EndoGI zugefügt. Die Proteine wurden 90 min bei 30°C vorinkubiert, die Reaktion durch Zugabe von Poly(A) gestartet und nach 3 h gestoppt. In Abbildung 31 links wurde die gemessenen Daten aufgetragen. Die nukleolytische Aktivität der 13 pM EndoG $\Delta$ N53



**Abbildung 31:** Titration von EndoGΔN55 N187K zu einer konstanten Konzentration EndoG-EndoGI. 13 pM EndoGΔN53 (2,5 pM aktives Dimer) wurden mit 0,01-10 nM EndoGΔN55 N187K gemischt und anschließend 2 pM EndoGI zugefügt. Die Proteine wurden 90 min bei 30°C vorinkubiert, die Reaktion durch Zugabe von Poly(A) gestartet und nach 3 h gestoppt. **Links** Auftragung der gemessenen Daten. **Rechts** Anpassung der Daten erfolgte mit der Gleichung 4 (3.2.5.1).

in Abwesenheit von EndoGΔN55 N187K und EndoGI entsprach 100% Aktivität. Durch EndoGI wurde ein Großteil von EndoGΔN53 inhibiert: das verbleibende freie EndoGΔN53 hatte eine 17%ige Restaktivität. Je mehr inaktives EndoGΔN55 N187K zugegeben wurde, umso mehr Aktivität wurde wiedererlangt. Bei 5 nM EndoGΔN55 N187K war die Gesamtaktivität wieder 100%, also wurde EndoGI komplett von EndoGΔN55 N187K gebunden. Nach Anpassung der Daten mit der Gleichung 4 (3.2.5.1) konnte die Affinität von EndoGΔN55 N187K für EndoGI mit  $37,7 \pm 4,8$  pM bestimmt werden (Abbildung 31 rechts). Damit ist der  $K_D$ -Wert von EndoGΔN55 N187K für EndoGI rund 230-fach höher als für die aktive Variante EndoGΔN53. Obwohl enzymatisch nahezu inaktiv, war EndoGΔN55 N187K jedoch in der Lage mit der aktiven EndoGΔN53 um EndoGI zu konkurrieren. Die stark verringerte Affinität von EndoGΔN55 N187K stärkt jedoch die Vermutung, dass das aktive Zentrum von EndoG für die Bindung von EndoGI wichtig ist.

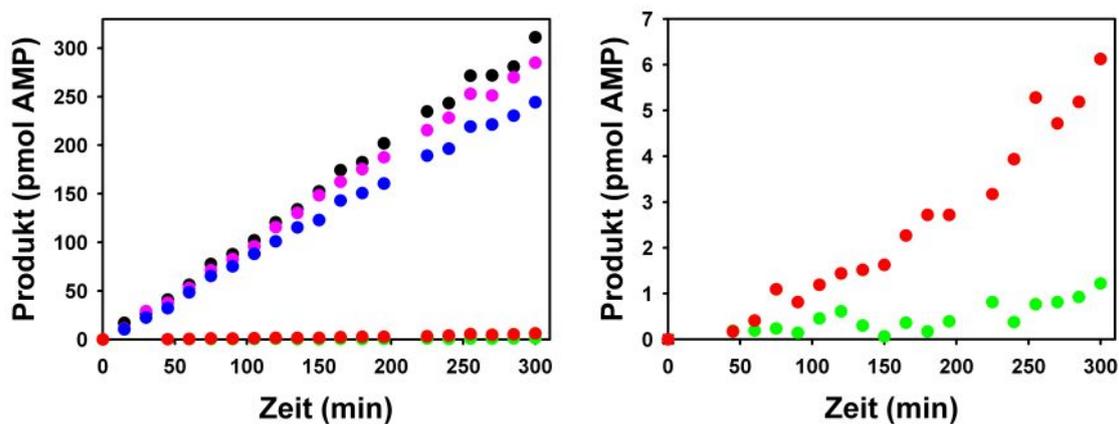
#### 4.3.8. Der EndoG-EndoGI-Komplex dissoziiert extrem langsam

Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation eines Proteinkomplexes ist ein Maß für die Stabilität des Komplexes. Um die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des EndoG-EndoGI-Komplexes zu bestimmen, wurde ein Deinhibierungsversuch durchgeführt. Zusätzlich sollte damit bestätigt werden, dass es sich bei der Komplexbildung um ein echtes Gleichgewicht handelt. Es wurde bereits nachge-

wiesen, dass die inaktive EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K EndoGI binden kann (siehe 4.3.2 bzw. 4.3.7). Somit konnte sie als „Falle“ dienen, um frei werdendes EndoGI aus einem zuvor gebildeten EndoG-EndoGI-Komplex zu binden. Die zeitabhängige „Rückgewinnung“ von EndoG-Aktivität konnte dann beobachtet werden. Da EndoG $\Delta$ N55 N187K eine deutlich niedrigere Affinität für EndoGI besitzt als Wildtyp-EndoG $\Delta$ N53, wurde die katalytisch inaktive EndoG $\Delta$ N55 N187K in einem 1000-fachen molaren Überschuss eingesetzt.

Das Experiment bestand aus fünf Versuchsreihen, in denen die Änderung der enzymatischen Aktivität über die Zeit gemessen wurde. Dabei wurden die eingesetzten Proteine in Reaktionspuffer 90 min vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 54  $\mu$ M Poly(A) gestartet. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, diese abgestoppt und mittels TCA-Fällungstest ausgewertet. Die gemessenen Daten für alle Reaktionen sind im linken Teil der Abbildung 33 dargestellt.

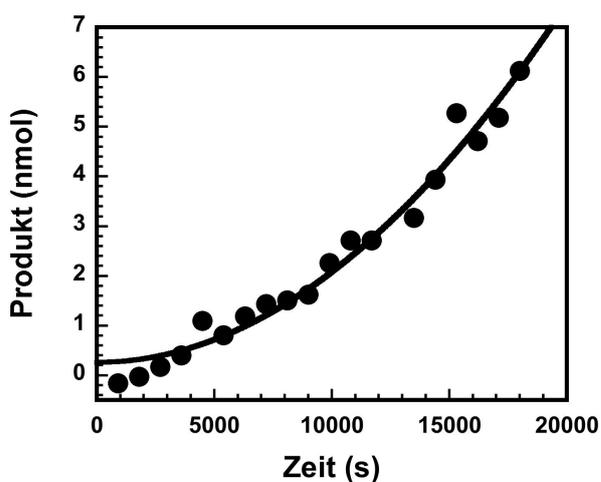
Alle Reaktionen enthielten 26 pM EndoG $\Delta$ N53 (4 pM aktives Dimer). Durch Inkubation von 26 pM EndoG $\Delta$ N53 konnte die nicht-inhibierte Aktivität bestimmt werden (schwarz). Vorinkubation der EndoG $\Delta$ N53 mit 10 pM EndoGI ergab eine fast komplette Inhibierung (grün). Die Zugabe von 26 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K (violett) ergab



**Abbildung 32:** Kinetik der Dissoziation des EndoG-EndoGI-Komplexes. Alle fünf Versuchsreihen enthielten 26 pM EndoG $\Delta$ N53 (4 pM aktives Dimer). Die Enzyme wurden 90 min bei 30°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Poly(A) gestartet. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und abgestoppt. Schwarz: EndoG $\Delta$ N53 allein, grün: Inkubierung EndoG $\Delta$ N53 mit 10 pM EndoGI, violett: EndoG + 26 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K, blau: Inkubation von EndoG $\Delta$ N53 mit 10 pM EndoGI und 26 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K. In der fünften Versuchsreihe (rot) wurden dem vorinkubierten EndoG und EndoGI gleichzeitig mit dem Substrat 26 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K zugegeben. **Links** Die Daten des gesamten Zeitverlaufs für alle Versuchsreihen sind dargestellt. **Rechts** Der untere Teil des linken Diagramms ist vergrößert abgebildet.

fast die gleiche Aktivität wie EndoG und zeigte, dass die mutierte EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K keine Aktivität besitzt. Durch Zugabe von 10 pM EndoGI und 26 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K (blau) konnte die maximale EndoG-Aktivität bestimmt werden, die durch Bindung des EndoGI an die inaktive Variante zurückgewonnen wurde. In der fünften Versuchsreihe (rot) wurde EndoG $\Delta$ N53 mit 10 pM EndoGI vorinkubiert und dann gleichzeitig mit dem Substrat wurde 26 nM EndoG $\Delta$ N55 N187K zugegeben. Die Zunahme an Nuklease-Aktivität dieser Versuchsreihe entspricht der zeitabhängigen Dissoziation des EndoG-EndoGI-Komplexes. Durch Dissoziation des Komplexes freigesetztes EndoGI wurde von der im Überschuss vorliegenden EndoG $\Delta$ N55 N187K sofort weggefangen und die gleichzeitig freigewordene EndoG $\Delta$ N53 konnte nun Poly(A) hydrolysieren. In Abbildung 33 rechts ist diese Zunahme der katalytischen Aktivität deutlich zu sehen (in Form der roten Kurve).

Somit konnte die Reversibilität der EndoG-Inhibierung nachgewiesen werden. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation  $k_{\text{off}}$  erfolgte nach Gleichung 6 (3.2.5.1). Die Progresskurve der Zunahme des Substratumsatzes wurde unter Berücksichtigung des maximalen Substratumsatzes für die simultane Inkubation aller Komponenten ausgewertet (siehe Abbildung 33). Es wurde ein  $k_{\text{off}}$  von  $(2,66 \pm 0,12) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  berechnet. Der ermittelte Fehler repräsentiert die Abweichung der Anpassung. Mit einer Halbwertszeit von rund 3 Tagen ist der Komplex extrem stabil. Zusammen mit dem  $K_D$ -Wert für die Reaktion kann nun eine Geschwindigkeitskonstante von rund  $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Assoziation des Komplexes berechnet werden. Dieser Wert ist sehr nahe der Diffusionsgrenze für Reaktionen zweiter Ordnung.



**Abbildung 33:** Bestimmung der Dissoziationskonstante des EndoG-EndoGI-Komplexes. Zu sehen ist die Progresskurve des Substratumsatzes für die simultane Inkubation aller Proteine. Die Anpassung erfolgte mit der Gleichung 6 (3.2.5.1).

#### 4.4. Die *Drosophila*-14-3-3-Proteine und EndoGI

Bei der massenspektrometrischen Identifizierung von EndoGI wurden ebenfalls die *Drosophila*-14-3-3-Proteine gefunden (siehe Abbildung 4). Dabei koeluierten beide 14-3-3-Proteine nach einer Reinigung über sechs aufeinanderfolgende Chromatographiesäulen mit EndoGI. Somit lag der Verdacht nahe, dass sie möglicherweise mit EndoGI assoziiert sind.

Bei 14-3-3 handelt es sich eine in Eukaryoten hoch konservierte, allgegenwärtig exprimierte Proteinfamilie, deren Name aus der Kombination von Fraktionsnummer der DEAE-Cellulose-Chromatographie und der Migrationsposition der anschließenden Stärkegelelektrophorese resultierte [Fu *et al.*, 2000]. Während im Menschen bisher sieben Isoformen identifiziert wurden ( $\beta, \gamma, \epsilon, \sigma, \zeta, \tau, \eta$ ), wurden in *Drosophila melanogaster* bis jetzt nur zwei Isoformen gefunden:  $\epsilon$  und  $\zeta$ , die beide mit EndoGI gereinigt und anschließend identifiziert wurden (siehe 4.1) [Skoulakis *et al.*, 1996, Chang & Rubin, 1997, Wang & Shakes, 1996].

14-3-3 gehört zu einer ubiquitär vorkommenden Proteinfamilie, deren Mitglieder an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind. Dabei sind vor allem Proteine, die an Signalkaskaden beteiligt sind (z.B. humanes Raf) 14-3-3-Bindungspartner [Freed *et al.*, 1994]. Die Bindung von 14-3-3-Proteinen an Liganden wird hauptsächlich durch Serin-Phosphorylierung eines Erkennungsmotivs kontrolliert. Aber auch unphosphorylierte Proteine werden als Bindungspartner akzeptiert [Fu *et al.*, 2000].

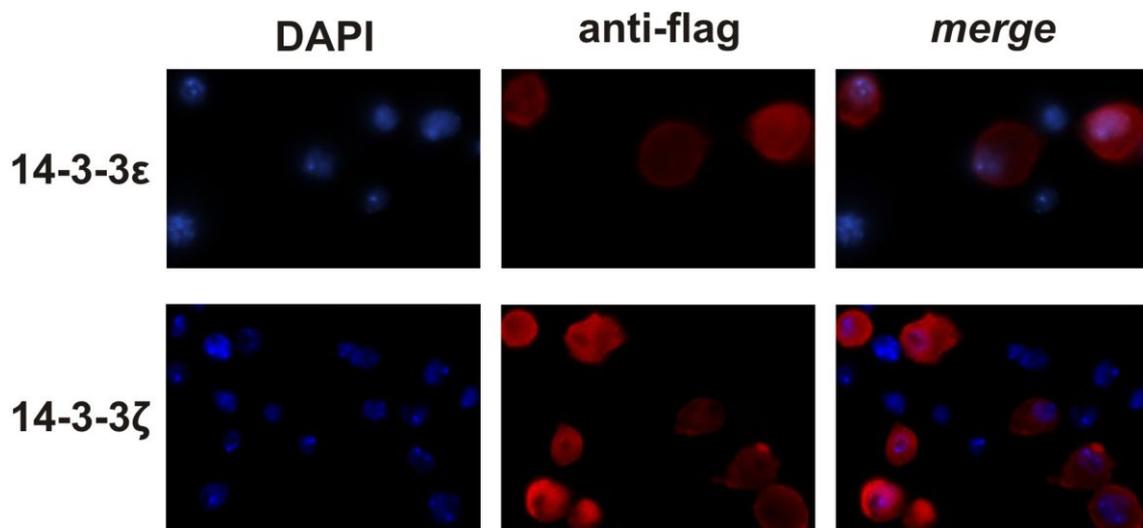
##### 4.4.1. Die 14-3-3-Proteine sind gleichmäßig in der Zelle verteilt

Die bisher in Eukaryoten identifizierten 14-3-3-Proteine wurden als vorwiegend zytoplasmatisch beschrieben. Sie können jedoch auch an der Zellmembran und in anderen Zellkompartimenten wie Kern oder dem Golgi-Apparat gefunden werden [Freed *et al.*, 1994, Tang *et al.*, 1998]. Um die Lokalisation der *Drosophila* 14-3-3-Proteine eindeutig festzustellen, wurde Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendet.

Da zunächst keine spezifischen Antikörper für die beiden *Drosophila* 14-3-3-Proteine vorlagen, wurden durch Dr. CLAUDIA TEMME stabile Schneider2-Zelllinien hergestellt, in denen separat die Expression von mit einem flag-tag versehenen 14-3-3 $\epsilon$  oder 14-3-3 $\zeta$  über einen Metallothionein-Promoter induziert werden konnte (siehe 3.2.2.10).

Die beiden Zelllinien wurden durch Zugabe von 500  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  induziert und die

anschließende Präparation und Färbung der Zellen erfolgte wie in 3.2.1.8 beschrieben. Dabei wurde zur Detektion der rekombinant exprimierten Proteine ein monoklonaler Maus-anti-flag-Antikörper verwendet, der wiederum mittels eines sekundären Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörpers detektiert wurde. Weiterhin wurde der Zellkern durch Interaktion des Farbstoffs DAPI mit nukleärer DNA sichtbar gemacht .



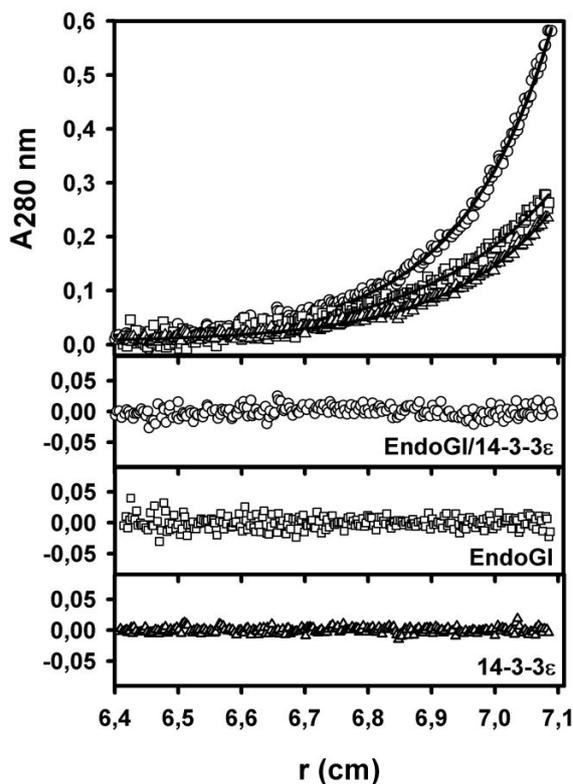
**Abbildung 34:** Lokalisation von rekombinanten 14-3-3-Proteinen in Schneider2-Zellen. Stabile Schneider2-Zelllinien, welche mit einem Expressionskonstrukt für 14-3-3 $\epsilon$  oder 14-3-3 $\zeta$  mit C-terminalem flag-tag transfiziert waren, wurden mittels CuSO<sub>4</sub>-Zugabe induziert. Die Zellen wurden mit Cy3-gekoppeltem anti-flag-Antikörper (Mitte) und DAPI (links) gefärbt. In der Abbildung ganz rechts ist die Überlagerung beider Signale zu sehen. **Oben** Lokalisation von 14-3-3 $\epsilon$ . **Unten** Lokalisation von 14-3-3 $\zeta$ .

In Abbildung 34 sind die zwei verschiedenen Färbungen zu sehen. In der oberen Reihe sind die Färbungen für 14-3-3 $\epsilon$  wiedergegeben, in der unteren Reihe für 14-3-3 $\zeta$ . Beide Proteine kommen ubiquitär in der Zelle vor. Dabei kolokalisiert das rote Signal des flag-Cy3-Antikörpers auch mit dem Zellkern-spezifischen blauen DAPI-Signal. Das Signal des flag-Cy3-Antikörpers zeigt jedoch keine punktartige Anordnung, wie sie bei der mitochondrialen Lokalisation für EndoG zu sehen war (siehe 4.2.6.10). Stattdessen sind die 14-3-3-Protein-Signale gleichmäßig über die Zelle verteilt, was sowohl ein zytoplasmatisches, als auch ein nukleäres Vorkommen beider Proteine indiziert.

#### 4.4.2. EndoGI bindet mit niedriger Affinität an 14-3-3 $\epsilon$

Ob die beiden identifizierten 14-3-3-Proteine mit EndoGI assoziiert sind, sollte mittels analytischer Ultrazentrifugation geklärt werden (siehe 4.1.1). In einem Vorversuch wurden die 14-3-3-Proteine und EndoGI bei äquimolaren Konzentrationen in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Dabei konnte nach Eintreten des Gleichgewichts nur für 14-3-3 $\epsilon$  eine Komplexbildung mit EndoGI nachgewiesen werden. Nachfolgende Untersuchungen konzentrierten sich daher nur auf 14-3-3 $\epsilon$ . Dabei wurden bisher alle 14-3-3-Proteine als Dimere beschrieben [Jones *et al.*, 1995].

Auch für die Molmassebestimmung eines möglichen EndoGI-14-3-3-Komplexes wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt. Unter Gleichgewichtsbedingungen wurden 1  $\mu$ M EndoGI mit 1  $\mu$ M dimerem 14-3-3 $\epsilon$  inkubiert und die Komplexbildung mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Die gemessenen Daten sind in Abbildung 35 dargestellt.



**Abbildung 35:** EndoGI bindet mit niedriger Affinität an 14-3-3 $\epsilon$ . 1  $\mu$ M EndoGI wurde mit 1  $\mu$ M dimerem 14-3-3 $\epsilon$  inkubiert und die Komplexbildung mittels analytischer Ultrazentrifugation gemessen. Die apparenten Massen wurden von Daten, aufgenommen bei 280 nm und unter Gleichgewichtsbedingungen, berechnet. Als Kontrolle wurden die Proteine auch einzeln bei gleichen Konzentrationen gemessen. Der obere Teil des Diagramms zeigt die aufgenommenen experimentellen Daten und die entsprechenden Anpassungen (Linien). Dabei stehen die Kreise für EndoGI/14-3-3 $\epsilon$ , die Quadrate für EndoGI und die Dreiecke für 14-3-3 $\epsilon$ . Der untere Teil der Abbildung zeigt die Abweichung der gemessenen Signale von der berechneten Anpassung.

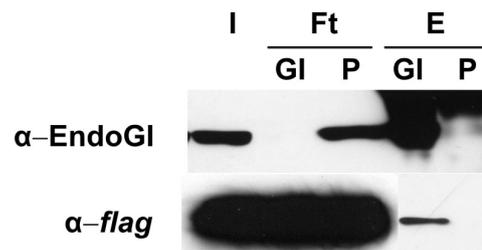
Als Kontrolle wurden sowohl EndoGI, als auch 14-3-3 $\epsilon$  einzeln untersucht. Wie oben gezeigt, verhielt sich EndoGI mit einem Molekulargewicht von 44,5 kDa als Monomer (siehe 4.1.1). Wie bisher alle bekannten 14-3-3-Proteine, lag auch

14-3-3 $\epsilon$  als Dimer vor. Bei einem erwarteten Molekulargewicht von 33,4 kDa wurde eine maximale, apparente Molmasse von 68,5 kDa gemessen. Wurden beide Proteine zusammen inkubiert, konnte ein Komplex mit der maximalen molaren Masse von 89,9 kDa beobachtet werden. Dies entspricht einer 85%igen Komplexbildung von monomerem EndoGI mit dimerem 14-3-3 $\epsilon$  (theoretische Molmasse 101,7 kDa). Offenbar waren die vorliegenden Konzentrationen von 1  $\mu$ M nicht ausreichend, um eine vollständige Komplexbildung zu ermöglichen. Leider konnten keine Daten bei höheren Konzentration aufgenommen werden, da dort bereits eine Nichtidealität der Lösung vorlag. Bei niedrigeren Konzentrationen konnten jedoch Daten aufgenommen werden, bei denen ein noch niedrigerer Prozentsatz an Komplexbildung vorlag. Das entsprach der Annahme, dass die vorliegenden Konzentrationen zu gering für eine vollständige Komplexbildung waren. Da bei submikromolaren Konzentrationen so gut wie keine EndoGI-14-3-3-Komplexe gebildet wurde, kann man davon ausgehen, dass der  $K_D$ -Wert des Komplexes bei mikromolaren Konzentrationen liegt.

Ein weiterer Beweis für die Assoziation von EndoGI und 14-3-3 $\epsilon$  lieferte die folgende Immunpräzipitation. Das Experiment wurde von Dr. CLAUDIA TEMME ausgeführt und die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Protein A-Sepharose *beads* wurden entweder mit EndoGI-Immunsereum oder einem Kontroll-Prä-Immunsereum über Nacht inkubiert. Diese vorinkubierten *beads* wurden dann mit Schneider2-Zellextrakt inkubiert, der von Zelllinien stammte, in denen entweder 14-3-3 $\epsilon$ , oder 14-3-3 $\zeta$  als *flag-tag* Protein rekombinant exprimiert worden waren (siehe 4.4.1). Nach der Inkubation folgten mehrere Waschschrirte und abschließend wurden die an die *beads* gebundenen Proteine durch Lösen in SDS-Probenpuffer eluiert. Die gesammelten Proben der einzelnen Schritte wurden mittels *Western blotting* auf Gegenwart von EndoGI und *flag*-14-3-3 $\epsilon$  untersucht. In Abbildung 36 ist der *Western blot* der Immunpräzipitation mit 14-3-3 $\epsilon$  wiedergegeben.

EndoGI wurde bei Inkubation mit den *beads*, an denen der anti-EndoGI-Antikörper gekoppelt war, vollständig gebunden (vergleiche *Input* mit Durchfluss-GI in der oberen Spalte der Abbildung 36). Das Präimmunsereum war hingegen nicht in der Lage EndoGI zu binden (vergleiche *Input* mit Durchfluss-P in der oberen Spalte). Demnach konnte EndoGI auch nur im Eluat der mit anti-EndoGI-Antikörper gekoppelten *beads* nachgewiesen werden (vergleiche Eluat von GI und P, obere Spalte). Wurden die Proben auf *flag*-14-3-3 $\epsilon$  untersucht, konnte das Protein im *Input* und Durchfluss beider Immunpräzipitationen detektiert werden (ver-



**Abbildung 36:** Ko-Immünpräzipitation von EndoGI und 14-3-3 $\epsilon$ . Die Expression von flag-14-3-3 $\epsilon$  wurde für 24 h in stabilen Schneider2-Zelllinien induziert. Die Immunpräzipitation wurde entweder mit EndoGI-Immunsereum (mit GI gekennzeichnete Spuren) oder mit Präimmunsereum (mit P gekennzeichnete Spuren) ausgeführt. Die Proben wurde auf die Gegenwart von EndoGI und flag-14-3-3 $\epsilon$  mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (mit  $\alpha$ -EndoGI bzw.  $\alpha$ -flag gekennzeichnete Reihen). I steht für den *Input*, Ft steht für Durchfluss und E steht für die Elution.

gleiche *Input* und Durchfluss, untere Spalte), was an der starken Überexpression des rekombinanten Proteins lag. Flag-14-3-3 $\epsilon$  war dagegen nur im Eluat der mit anti-EndoGI-Antikörper gekoppelten *beads* in geringer Menge zu detektieren (vergleiche Eluat-GI mit Eluat-P, untere Spalte), dass heißt es wurde spezifisch mit EndoGI kopräzipitiert. Die gleiche Kopräzipitation von EndoGI und 14-3-3 $\epsilon$  konnte auch für endogenes 14-3-3 $\epsilon$  aus Schneider2-Zellextrakt beobachtet werden. Damit konnte eine Assoziation von EndoGI mit 14-3-3 $\epsilon$  bestätigt werden. Für 14-3-3 $\zeta$  hingegen konnte bei gleichen Immunpräzipitationsexperimenten keine Kopräzipitation mit EndoGI nachgewiesen werden.

#### 4.4.3. Der Inhibitor-Nuklease-Komplex wird nicht durch die beiden 14-3-3 Proteine *in-vitro* beeinflusst

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass rekombinantes 14-3-3 $\epsilon$  und EndoGI einen Komplex bilden können (siehe 4.4.2), sollte untersucht werden, ob die Assoziation von 14-3-3 $\epsilon$  und EndoGI die EndoG-EndoGI-Komplexbildung *in-vitro* beeinflusst. Dafür wurde 14-3-3 $\epsilon$  in Gegenwart einer konstanten Konzentration EndoG-EndoGI titriert. Es wurde untersucht, ob die verbleibende Restaktivität von EndoG in Gegenwart des Nuklease-Inhibitor-Komplexes konstant bleibt oder sich bei Zugabe von 0,1-12  $\mu$ M 14-3-3 $\epsilon$  veränderte. Zur EndoG-Aktivitätsbestimmung wurde der TCA-Fällungstest verwendet (siehe 3.2.5.1).

In einem Reaktionsgemisch wurden 2,5 pM EndoGI mit 0,25-30  $\mu$ M 14-3-3 $\epsilon$  inkubiert bevor 25 pM EndoG $\Delta$ N53 (entspricht 4 pM aktivem Dimer) zugegeben wurde. Nach einer Vorinkubation von 90 min wurde die Reaktion durch Zuga-

be von 54  $\mu\text{M}$  Poly(A) gestartet. In einer Kontrollreaktion wurde EndoGAN53 mit 14-3-3 $\epsilon$  allein inkubiert. In Abwesenheit von 14-3-3 $\epsilon$  konnte rund 35% Restaktivität für die EndoG in Gegenwart des Nuklease-Inhibitor-Komplexes gemessen werden. Es wurde beobachtet, dass bei steigender 14-3-3 $\epsilon$ -Konzentration die verbleibende EndoG-Aktivität konstant blieb. 14-3-3 $\epsilon$  hatte auch keinen Effekt auf die EndoG-Aktivität in Abwesenheit von EndoGI. Dieses Experiment wurde auch mit 14-3-3 $\zeta$  durchgeführt, welches in einem Bereich von 0,05-25  $\mu\text{M}$  titriert wurde. Auch hier konnte keine Beeinflussung des EndoG-EndoGI-Komplexes oder der EndoG allein erfasst werden. Nach Auswertung der hier beschriebenen Titrationen beider 14-3-3-Proteine konnte trotz eines enormen molaren Überschusses an 14-3-3 über EndoGI keine Beeinflussung des EndoG-EndoGI-Komplexes *in-vitro* gemessen werden.

#### **4.5. EndoGI verlässt den Zellkern während der Apoptose in Schneider2-Zellen**

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Da sie im Gegensatz zur Nekrose aktiv von der Zelle durchgeführt wird, unterliegt sie einer strengen Kontrolle. Kennzeichen der Apoptose sind das Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern, die Kondensation des Chromatins, der Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke und das Ausstülpfen der Plasmamembranen (*blebbing*) [Wyllie *et al.*, 1980]. Die apoptotische Hydrolyse der DNA wird hauptsächlich durch CAD (Caspase-activated DNase) katalysiert [Liu *et al.*, 1997]. Diese liegt als inaktives Heterodimer mit ihrem Inhibitor ICAD im Nukleus vor [Liu *et al.*, 1998]. Nach Induktion der Apoptose und damit der Caspase-Signalkette wird ICAD durch entweder Caspase-3 oder Caspase-8 gespalten und dissoziiert in Folge dessen von CAD [Liu *et al.*, 1999a]. Diese wiederum bildet aktive Oligomere, welche die DNA durch Einbringen von Doppelstrangbrüchen spalten.

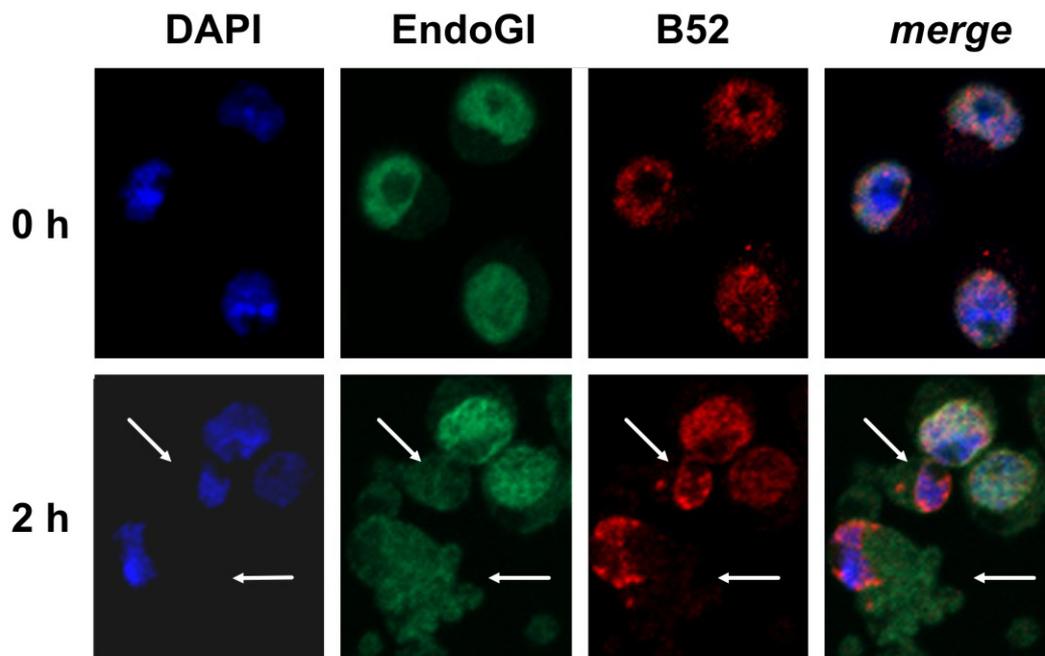
In CAD-*knock-out*-Mäusen konnte 2001 in apoptotischen Zellen trotz der fehlenden CAD der Abbau nukleärer DNA beobachtet werden [Li *et al.*, 2001]. Dies führte zur Entdeckung eines Caspase-unabhängigen Apoptosewegs. Dabei wurde auch die für den DNA-Abbau verantwortliche Nuklease identifiziert, Endonuklease G. Auch in *C. elegans* konnte unabhängig davon EndoG mit Apoptose in Verbindung gebracht werden [Parrish *et al.*, 2001].

Da die *Drosophila*-EndoG bisher noch nicht beschrieben wurde, gibt es keine Angaben zur ihrer Rolle in der Apoptose. Zudem besitzt sie im Gegensatz zu ande-

ren eukaryotischen Endonukleasen G einen spezifischen Inhibitor. Dieser befindet sich normalerweise im Nukleus (siehe 4.1.2). Sollte auch die *Drosophila*-EndoG bei Apoptose-Induktion aus den Mitochondrien entlassen werden, wie es z.B. von Li *et al.* für die Maus-EndoG gezeigt wurde, so würde die genomische DNA immer noch durch das im Zellkern vorliegende EndoG geschützt werden [Li *et al.*, 2001]. Es wurde daher untersucht, ob sich die Lokalisation von EndoG in apoptotischen Schneider2-Zellen verändert. Da das spezifische Anti-Immuserum gegen *Drosophila*-EndoG nicht sensitiv genug und zu unspezifisch war, um damit endogenes EndoG zu detektieren, konnten eine mögliche Relokalisation der *Drosophila*-EndoG während der Apoptose nicht untersucht werden. Deshalb konzentrieren sich die im Folgenden beschriebenen Experimente auf EndoG.

Um Apoptose in Schneider2-Zellen zu induzieren, wurde ein Protein (*grim*) exprimiert, welches ein spezifischer Aktivator der Apoptose in *Drosophila* ist [Chen *et al.*, 1996]. Dafür wurde eine stabile Schneider2-Zelllinie hergestellt, in der das *grim*-Protein in einem induzierbaren Expressionsplasmid vorlag. Diese Arbeiten wurden von Dr. CLAUDIA TEMME durchgeführt und die Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Induktion von *grim* in Schneider2-Zellen führte dazu, dass ein Großteil der Zellen apoptotisch wurde und innerhalb von 3 h starb. Um nun eine mögliche veränderte Lokalisation von EndoG während der Apoptose zu beobachten, wurde eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Schneider2-Zellen vor und 2 h nach der Induktion von *grim* durchgeführt. Die erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 37 dargestellt.

Zur Detektion des endogenen EndoG wurde ein spezifisches Kaninchen-Immuserum und als sekundärer Antikörper ein FITC-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Als nukleäres Kontrollprotein diente B52, ein *splicing*-Faktor, der ebenfalls durch einen spezifischen Antikörper und einen sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper detektiert wurde. Als Marker für die genomische DNA diente erneut DAPI. Bei den in Abbildung 37 wiedergegebenen Bildern handelt es sich um konfokale Aufnahmen. Zum Zeitpunkt 0 befanden sich sowohl EndoG (grünes Signal), als auch B52 (rotes Signal) im Zellkern, erkennbar an der Kolo-kalisation mit dem blauen DAPI-Signal. Zwei Stunden nach Induktion der Apoptose durch *grim* konnte man deutlich apoptotische Zellen erkennen (mit Pfeil markiert, untere Reihe). Vor allem das typische Ausstülpfen der Plasmamembran, das *blebbing*, ist sichtbar. Dabei enthielten die apoptotischen Zellen noch die genomische DNA und den *splicing*-Faktor B52 (blaues und rotes Signal). Das grüne EndoG-Signal ist jedoch nicht mehr im Nukleus zu finden. In Zellen, die keiner Apoptose unterlagen, war EndoG jedoch deutlich sichtbar im Kern lokalisiert (Zellen ohne



**Abbildung 37:** Verhalten von EndoGI während der Apoptose in Schneider2-Zellen. Es werden konfokale Aufnahmen von Schneider2-Zellen gezeigt, die stabil mit einem Expressionsplasmid für den Apoptoseinduktor *grim* transfiziert waren. Die Zellen werden vor (Reihe mit 0 h) und 2 h nach Induktion von *grim* dargestellt. Die Zellen wurden mit einem EndoGI-Immunserum (grün), mit einem B52-Antikörper (rot) und DAPI (blau) angefärbt.

Pfeil), was eine korrekte Färbung der Zellen anzeigt. Da sowohl B52, als auch die genomische DNA noch detektiert werden konnten, war der Zellkern höchstwahrscheinlich noch intakt. Dies unterstützt die Aussage, dass EndoGI selektiv aus dem Zellkern verschwunden ist und das Verschwinden nicht auf das Auflösen der Kernmembranen zurückzuführen war. Wenn man die apoptotischen mit den nicht-apoptotischen Zellen vergleicht (unter Reihe), kann man eine Verringerung des gesamten EndoGI-Signals wahrnehmen, was auf eine möglichen Proteolyse von EndoGI weist.

Durch *Western blotting* apoptotischer Extrakte sollte das mögliche Verschwinden von EndoGI nachgewiesen werden. Dabei wurde das EndoGI-Signal mit dem Signal von Kontrollproteinen im apoptotischen Gesamtzellextrakt verglichen. Es konnte jedoch keine Verringerung der EndoGI-Konzentration in apoptotischen Zellextrakten im Vergleich zu nicht-apoptotischen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich nicht alle Zellen in den apoptotischen Schneider2-Zellextrakten in der gleichen Phase der Apoptose befanden. Sollte das Verschwinden des EndoGI zu einem bestimmten Zeitpunkt stattfinden, so wird dieser wahrscheinlich nicht von allen Zellen gleichzeitig

durchlaufen und kann daher nicht quantitativ nachgewiesen werden. Aus den gleichen Gründen war möglicherweise auch der quantitative Nachweis des EndoG-Verschwindens mittels Titrationen von apoptotischen Schneider2-Zellextrakten mit EndoG nicht erfolgreich.

## 5. Diskussion

Die in Schneider2-Zellextrakt gefundene Endonuklease G (EndoG) und ihr spezifischer Protein-Inhibitor (EndoGI) sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit funktionell charakterisiert werden. Dabei wurden beide Proteine sowohl einzeln, als auch der EndoG-EndoGI-Komplex untersucht.

Die Endonukleasen G gehören der  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Superfamilie von Nukleasen an, welche entweder unspezifisch, sequenz- oder strukturspezifisch ihre Substrate abbauen. Gemeinsam ist ihnen jedoch eine konservierte Struktur des aktiven Zentrums, die  $\beta\beta\alpha$ -Struktur, und sie benötigen alle, für ihre nukleolytische Aktivität, ein divalentes Metallion [Kühlmann *et al.*, 1999]. Spezifische Nukleaseinhibitoren wurden bisher für mehrere Mitglieder der  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Familie beschrieben, so inhibiert zum Beispiel das Immunprotein E7 das Colicin E7. Der einzige bisher bekannte Inhibitor für eine DRGH-Nuklease ist NuiA, der die *Anabaena*-NucA inhibiert.

Die ersten DRGH-Nukleasen in einem Eukaryot wurde bereits 1966 in *Neurospora crassa* bzw. und in einem Prokaryot 1963 in *Serratia marcescens* identifiziert [Linn & Lehmann, 1966, Eaves & Jeffries, 1963]. Dabei wurde seitdem vor allem die *Serratia*-Nuklease intensiv untersucht. Aber erst 1987 wurden mit den entsprechenden homologen Proteinen aus Huhn und Rind die ersten DRGH-Nukleasen in höheren Tieren beschrieben [Ruiz-Carillo & Renaud, 1987, Cummings *et al.*, 1987]. RUIZ-CARILLO nannte das von ihm gefundene bovine Protein Endonuklease G, aufgrund der bevorzugt geschnittenen, G-reichen Sequenzen. Der Name wurde nach und nach für alle eukaryotischen DRGH-Nukleasen, außer für die Hefe-Nuklease Nuc1 und das *Caenorhabditis elegans*-Homologe Cps-6, übernommen.

In den letzten 20 Jahren wurden für die EndoG verschiedene Funktionen beschrieben. So wurde 1993 postuliert, dass EndoG die Primer für die mitochondrialer DNA-Replikation generiert [Côté & Ruiz-Carillo, 1993]. 2001 beschrieben Li *et al.*, dass EndoG in apoptotischen, CAD-defizienten Zellen an der Fragmentierung von chromosomaler DNA beteiligt ist [Li *et al.*, 2001]. Wenig später wurde von HUANG *et al.* eine Beteiligung von EndoG an der Initiation der Inversionen der L and S Komponenten in der DNA des *Herpes simplex*-Virus Typ1 postuliert [Huang *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2006].

Obwohl EndoG und EndoG-Homologe bereits in *Serratia marcescens*, *Neurospora crassa*, *Anabaena spec.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*,

*Mus musculus*, *Bos taurus* und *Homo sapiens* untersucht wurden, gibt es keine Veröffentlichungen zur EndoG in *Drosophila melanogaster*. Daher wurde das in meiner Diplomarbeit [Weißbach, 2005] als EndoG identifizierte Protein zunächst auf seine Eigenschaften untersucht.

### **5.1. Die Expression von *Drosophila*-Endonuklease G in Bakterien**

Ein großes Problem bei der Expression rekombinanter EndoG war die Toxizität des Proteins. Zur Herstellung der rekombinanten EndoG, wurde die vollständige Sequenz in ein Expressionsplasmid kloniert und die Expression erfolgte unter Kontrolle eines T7-Promotors. Während der Klonierung wurde das EndoG-Expressionsplasmid in einen *Escherichia coli*-Stamm transformiert, der einen Inhibitor der T7-Polymerase besitzt. Daher sollte keine oder nur eine sehr geringe Expression von EndoG in diesem *Escherichia coli*-Stamm erfolgen. Jedoch enthielten isolierte Klone dieses *Escherichia coli*-Stammes stets eine Mutation des Startcodons in der EndoG-Sequenz. Erst in Anwesenheit des spezifischen Inhibitors EndoGI war die Klonierung von EndoG erfolgreich. Auch die Nuklease Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* kann nur in Gegenwart ihres spezifischen Inhibitors Barstar exprimiert werden [Paddon *et al.*, 1989], ebenso die EndoG-homologe *Anabaena* NucA, welche nur in Anwesenheit ihres Inhibitors NuiA exprimiert werden kann [Muro-Pastor *et al.*, 1992].

Obwohl andere eukaryotische Endonukleasen G keinen spezifischen Inhibitor besitzen, können sie rekombinant sowohl in pro- als auch in eukaryotischen Systemen exprimiert werden [Widlak *et al.*, 2001, Schäfer *et al.*, 2004]. Dabei liegt die Sequenzidentität zwischen *Drosophila*-EndoG und der bovinen Form bei 53%, wobei das aktive Zentrum vollständig konserviert ist [Schäfer *et al.*, 2004]. Warum aber die prokaryotische Expression von boviner EndoG ohne weiteres möglich ist und die der *Drosophila*-EndoG nicht, bleibt unklar. Dass die bei der Expression von EndoG aufgetretene Toxizität der EndoG-Aktivität zuzuordnen ist, wurde bei der Expression der katalytisch inaktiven EndoG $\Delta$ N53 DAGA bewiesen, welche in Abwesenheit von EndoGI exprimiert werden konnte (siehe 4.2.3).

Die *Drosophila*-EndoG lag nach der Expression in *Escherichia coli* zum Großteil in *inclusion bodies* vor. *Inclusion bodies* bestehen aus inaktiven und unlöslichen Proteinaggregaten, welche bei der Expression rekombinanter Proteine in Prokaryoten entstehen, welchen spezifische eukaryotische Faltungshelfer, sogenannte

Chaperone fehlen [Marston, 1986].

Nach dem Aufschluss der *Escherichia coli*-Zellen und nachfolgender Ni-NTA-Reinigung konnte aber nachgewiesen werden, dass der lösliche Anteil der EndoG enzymatisch aktiv war. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels SDS-PAGE mit vergleichenden BSA-Proben. Bei der  $K_D$ -Wert-Bestimmung für den EndoG-EndoGI-Komplex wurde allerdings festgestellt, dass die gemessene Proteinkonzentration nicht der Konzentration an aktiver EndoG entsprach (siehe 4.3.3). Durch eine stöchiometrische Titration konnte bestimmt werden, dass nur 30% des gereinigten Proteins katalytisch aktiv war. Dabei ist die Abweichung der Konzentration an aktiver EndoG von der gemessenen Proteinkonzentration wahrscheinlich sowohl auf eine fehlerhafte Proteinbestimmung aufgrund der sehr geringen Proteinkonzentration zurückzuführen sowie auf inaktive EndoG in der Präparation. Ob die Aktivität der rekombinant exprimierten EndoG der Aktivität der endogenen EndoG entspricht, konnte nicht bestimmt werden, da bei der Identifizierung des endogenen Proteins der Hauptteil für die Massenspektrometrie verwendet wurde und die verbliebene EndoG nicht für eine Proteinbestimmung ausreichte.

Der N-terminale His-tag von EndoG $\Delta$ N55 scheint die Löslichkeit des Proteins zu erleichtern, denn im Gegensatz zur Expression von EndoG mit C-terminalem His-tag kam es kaum zur Bildung von Aggregaten (siehe 4.2.4). Die erhöhte Löslichkeit dieser EndoG-Variante ist nicht auf die stark verminderte katalytische Aktivität zurückzuführen, denn EndoG $\Delta$ N53 DAGA mit einem C-terminalen His-tag lag trotz einer fehlenden katalytischen Aktivität zu etwa 80% in *inclusion bodies* vor. Die erhöhte Löslichkeit kann aber auch auf die zwei zusätzlich deletierten Aminosäuren zurückzuführen sein.

## 5.2. Charakterisierung der *Drosophila*-EndoG

Um die Nukleinsäurehydrolyse durch EndoG kinetisch zu untersuchen, musste darauf geachtet werden, dass eine Unterscheidung zwischen Substrat und Produkt nicht möglich ist. Bei der Spaltung langer Nukleinsäuren entstanden Produkte, die wiederum als Substrat gebunden werden konnten. Da bisher alle identifizierten und charakterisierten EndoG-Homologe bestimmte Substratspezifitäten aufwiesen, kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass heterogenen Substrate nicht gleichmäßig abgebaut werden. Um dies zu vermeiden und die Aktivität der *Drosophila*-EndoG quantitativ bestimmen zu können, wurden die säurelöslichen Produkte der Hydrolyse von homogen markiertem Poly(A) einer Durchschnittslänge von 500 nt gemessen (siehe 3.2.5.1). Dabei entstehen Oligomere von 1-4 nt Länge als Endprodukte der Hydrolyse (siehe Abbildung 14), was mit den beobachteten Reaktionsendprodukten bei der Inkubation von homopolymeren Substraten mit der *Serratia*-Nuklease übereinstimmt [Nestle & Roberts, 1969b]. Aufgrund dieser Studie galten Pentanukleotide, wie sie auch die *Drosophila*-EndoG noch abbaut, als kürzestes Substrat für die *Serratia*-Nuklease bzw. homologe Endonukleasen [Friedhoff *et al.*, 1996b]. Erst 1999 konnte gezeigt werden, dass die synthetische Verbindung Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat als Minimalsubstrat von der *Serratia*-Nuklease erkannt wird [Friedhoff *et al.*, 1999, Haberland, 2001]. Die Spaltung erfolgt an der 5'-Seite, wobei *p*-Nitrophenol sowie Desoxythymidin-3'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat entstehen. Dabei ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat um den Faktor  $10^6$  niedriger als mit makromolekularer DNA [Haberland, 2001]. Auch für die *Drosophila*-Nuklease wurde beobachtet, dass Oligonukleotide wesentlich schlechtere Substrate sind als Polymere. So wurde Poly(A) deutlich schneller hydrolysiert als das sehr kurze  $A_{10}$  (siehe 4.2.6.1).

Dass es sich bei der *Drosophila*-EndoG ebenfalls um eine Endonuklease handelt, konnte beim Abbau von 3'- bzw. 5'-endmarkiertem Poly(A) nachgewiesen werden. Bei der Hydrolyse beider Substrate durch EndoG $\Delta$ N53 trat ein identisches Abbaumuster auf. Eine zusätzliche Exonukleaseaktivität der EndoG wurde nicht beobachtet, denn beim Abbau beider Substrate entstanden für eine Endonuklease typische Leitern von Banden, welche dem sukzessiv verkürzten Poly(A) entsprechen (siehe Abbildung 15). Bei einem 3'-exonukleolytischen Abbau, wie er charakteristisch für Deadenylyasen ist, wäre unmittelbar nach dem Reaktionsbeginn mit 3'-markiertem Poly(A) ausschließlich AMP entstanden [Körner & Wahle, 1997]. Weder bei der Hydrolyse von 3'- noch von 5'-markiertem Poly(A) durch EndoG

entstanden ausnahmslos Mononukleotide oder kurze Reaktionsprodukte. Damit konnte eine mögliche Exonukleaseaktivität, wie sie sowohl für die homologe Nuc1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, als auch für die Nuklease aus *Neurospora crassa* berichtet wurde [Dake *et al.*, 1988, Fraser *et al.*, 1989], widerlegt werden.

Neben RNA hydrolysiert die *Drosophila*-EndoG auch einzel- und doppelsträngige DNA (siehe Abbildung 16). Für mehrere Endonukleasen G und prokaryotische Homologe wurde zuvor berichtet, dass einzelsträngige Substrate gegenüber dsDNA bevorzugt geschnitten werden [Dake *et al.*, 1988, Widlak *et al.*, 2001]. Dies konnte nicht mit der *Drosophila*-EndoG beobachtet werden, denn sowohl ssDNA als auch dsDNA wurden in gleichen Konzentrationen mit der identischen Menge EndoG inkubiert und die Geschwindigkeit des Abbaus der DNA scheint identisch zu sein. Weiterhin ist der Abbau von DNA genauso schnell wie die Hydrolyse von RNA, denn bei gleichen Substratmengen können nach 15-30 min Reaktionszeit sowohl bei RNA, als auch bei DNA unter gleichen Reaktionsbedingungen noch Ausgangsprodukte detektiert werden (siehe Abbildungen 16 und 17). Beim Abbau von DNA und von RNA mit willkürlich gewählter Sequenz entsteht ein spezifisches Abbaumuster mit distinkten Reaktionsintermediaten, was auf bevorzugte Schnittstellen innerhalb dieser Nukleinsäuren deutet. Der Name des Enzyms EndoG wurde 1987 von RUIZ-CARILLO aufgrund der bevorzugt geschnittenen, G-reichen Sequenzen gewählt [Ruiz-Carillo & Renaud, 1987]. Diese Spezifität für G-reichen Sequenzen innerhalb der DNA konnte im Folgenden auch für die homologen Nukleasen aus *Anabaena spec.*, *Serratia marcescens* und *Bos taurus* nachgewiesen werden [Meiss *et al.*, 1998, Friedhoff *et al.*, 1996b, Côté *et al.*, 1989]. Die *Drosophila*-EndoG wurde mit einer RNA inkubiert, die ein internes homopolymeres A<sub>45</sub> besitzt (Abbildung 17). Während des Abbaus dieser RNA konnte die Bildung eines wenig populierten Intermediats beobachtet werden, dessen Länge der Poly(A)-flankierenden Sequenzen entspricht. Dies deutet auf eine mögliche bevorzugte Hydrolyse innerhalb von A<sub>45</sub> hin. Da aber noch zwei weitere Intermediate beim Abbau der RNA entstanden, kann diese Präferenz für Poly(A), wenn überhaupt nur sehr schwach sein bzw. es könnten noch weitere bevorzugte Schnittstellen vorhanden sein. Auch eine Präferenz für unstrukturierte RNA könnte vorliegen. Beim Abbau der DNA waren hingegen sehr distinkte Intermediate entstanden, die auf eine stärkere Substratspezifität bei der Hydrolyse von DNA hinweisen.

Wurden synthetische ssDNA-Homopolymere mit EndoG inkubiert, so wurden Oligo(dT) und Oligo(dA) wesentlich schneller hydrolysiert als Oligo(dC) (Abbildung 18). Diese Verhältnisse waren auch für den Abbau von RNA-

Homopolymeren durch die EndoG-homologe Nuc1 aus *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet worden [Dake *et al.*, 1988]. Während Purin-reiche, einzelsträngige Polymere wie Poly(A) und Poly(dA) in einer A-Helix-ähnliche-Form vorliegen [Saenger *et al.*, 1975], bilden Pyrimidin-reiche einzelsträngige Polymere, wie Oligo(dT), keine regulären Helices [Lowe und Shellman, 1972]. Bei Untersuchungen der Substratspezifität der *Serratia*-Nuklease festgestellt wurde, dass außer Poly(A) homopolymere einzelsträngige Substrate nicht hydrolysiert werden [Yonemura *et al.*, 1983]. Auch wurden doppelsträngige Nukleinsäuren, welche in der A-Helix-Form vorliegen, besser hydrolysiert als solche, die bevorzugt eine B-Helix-ähnliche Form annehmen. Daher wurde von MEISS *et al.* postuliert, dass die *Serratia*-Nuklease Substrate in A-Form bevorzugt [Meiss *et al.*, 1999]. Dies stimmt damit überein, dass von FRIEDHOFF *et al.* beobachtet wurde, dass die *Serratia*-Nuklease für Poly(dA)·Poly(dT) einen 500-fach höheren  $K_m$ -Wert aufweist als für Poly(dG)·Poly(dC) [Friedhoff *et al.*, 1996b]. Dabei liegt Poly(dG)·Poly(dC) in einer A-Helix-ähnliche Form vor und Poly(dA)·Poly(dT) bildet B-Helices. Sowohl die *Serratia*-Nuklease, als auch die *Drosophila*-EndoG hydrolysieren Poly(A). Daher kann vermutet werden, dass die Substratspezifität beider Enzyme ähnlich ist. Jedoch baut das *Drosophila*-Protein, im Gegensatz zum *Serratia*-Enzym, sehr zügig Poly(dT) ab, welches die eben genannte unregelmäßigen Helices ausbildet. Die *Drosophila*-EndoG wurde nicht mit doppelsträngigen Substraten, wie Poly(dA)·Poly(dT) inkubiert. Daher kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die *Drosophila*-Nuklease, obwohl sie Poly(dT) hydrolysiert, ebenfalls doppelsträngige A-Helix-ähnliche Substrate gegenüber doppelsträngigen B-Helix-ähnlichen Nukleinsäuren bevorzugt. Andererseits kann die *Drosophila*-EndoG auch andere Substratpräferenzen aufweisen als die *Serratia*-Nuklease.

Dass die Substratpräferenzen nicht konserviert sind, ist sehr wahrscheinlich, denn auch Nuc1 aus *Saccharomyces cerevisiae* kann sehr gut Poly(dT) hydrolysieren. Doch selbst wenn es geringfügige Unterschiede in der Substratspezifität der *Drosophila*-EndoG im Vergleich zu anderen DRGH-Nukleasen gibt, so werden natürliche ssDNA, dsDNA und RNA unabhängig von der Sequenz und der Bildung verschiedener Intermediate zu sehr kurzen Oligomeren abgebaut, was eine charakteristische Eigenschaft aller DRGH-Nukleasen ist [Low, 2003]. Außer Poly(A) sind homopolymere, einzelsträngige Nukleinsäuren auch kaum natürlichen Substrate. Abgesehen von dem  $K_m$ -Wert für Poly(dA)·Poly(dT) lagen die  $K_m$ -Werte der *Serratia*-Nuklease für andere DNA-Substrate mit 6-100  $\mu\text{M}$  [Friedhoff *et al.*, 1996b] im gleichen Bereich wie der mit rund 50  $\mu\text{M}$  bestimmte  $K_m$ -Wert der *Drosophila*-EndoG für Poly(A) (siehe 4.2.6.8).

Die Aktivität der EndoG ist abhängig von divalenten Metallionen [Nestle & Roberts, 1969b]. Dabei wird die höchste Nukleaseaktivität für *Drosophila*-EndoG mit Konzentrationen bis 1 mM  $Mn^{2+}$  erreicht (Abbildung 19), was ebenso für das *Anabaena*-Enzym und die bovine EndoG publiziert wurde [Muro-Pastor *et al.*, 1992, Cummings *et al.*, 1987]. Daneben wird die *Drosophila*-EndoG-Aktivität mit  $Mg^{2+}$  über einen weiten Bereich sehr stark stimuliert. In Gegenwart von  $Zn^{2+}$  konnte keine katalytische Aktivität bestimmt werden. Auch die *Anabaena*-Nuklease konnte durch  $Zn^{2+}$  nicht aktiviert werden [Meiss *et al.*, 1998]. Da in Gegenwart des divalenten Metallions  $Zn^{2+}$  keine katalytische Aktivität vorhanden war,  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  jedoch die Poly(A)-Hydrolyse durch EndoG ermöglichen, wird deutlich, dass ein zweiwertiges Metallion für die katalytische Aktivität der *Drosophila*-EndoG erforderlich ist und dass  $Zn^{2+}$  nicht in der Lage ist als Kofaktor zu fungieren. Dabei können Komplexbildungen des  $Zn^{2+}$  im vorliegenden Puffer ausgeschlossen werden.  $Zn^{2+}$  inhibiert sogar in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  die katalytische Aktivität von humaner EndoG [Widlak *et al.*, 2001]. Die EndoG aus *Mus musculus* hingegen konnte mittels  $Zn^{2+}$  stimuliert werden und zeigte, genauso wie die humane EndoG, keine Aktivität mit  $Ca^{2+}$  [Tomkinson *et al.*, 1988], welches wiederum schwach sowohl die *Drosophila*-EndoG als auch das *Anabaena*-Protein aktiviert [Meiss *et al.*, 1998]. Eine schnelle Hydrolyse von Nukleinsäuren durch die *Drosophila*-EndoG ist nur in Gegenwart von  $Mn^{2+}$ - oder  $Mg^{2+}$ -Ionen möglich.

Bereits wiederholt wurde publiziert, dass hohe Konzentrationen an Kalium inhibierend auf die EndoG-Aktivität wirken. So wurde für alle eukaryotischen Proteine berichtet, dass bereits Ionenstärken von 100-150 mM die katalytische Aktivität beeinträchtigen. Besonders stark ist die Inhibierung im Falle der humanen EndoG, welche schon bei 80-100 mM KCl DNA kaum noch hydrolysiert [Widlak *et al.*, 2001]. Auch die *Anabaena*-NucA wird durch NaCl-Konzentrationen über 100 mM in steigendem Maße inhibiert [Meiss *et al.*, 1998]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *Drosophila*-EndoG bei KCl-Konzentrationen über 50 mM deutlich an Aktivität verliert (Abbildung 20). 150 mM wird als physiologische Kaliumkonzentration im Menschen angenommen. Damit ist die katalytische Aktivität von humaner EndoG in gesunden Zellen stark verringert. Für *Drosophila* sind keine exakten Werte hinsichtlich der physiologischen Kaliumkonzentration bekannt, jedoch werden sie höchstwahrscheinlich nicht sehr stark von den humanen Konzentrationen abweichen. Die *Drosophila*-EndoG zeigt daher bei möglichen physiologischen Ionenstärken ebenfalls ein verringerte katalytischen Aktivität. Da aber offenbar schon geringe Menge an EndoG ausreichen um *Escherichia coli*-Zellen zu

töten (siehe Expression rekombinanter EndoG), ist eine reduzierte EndoG-Aktivität wahrscheinlich immer noch toxisch für eukaryotische Zellen.

### 5.3. Die Quartärstruktur von EndoG, EndoGI und des EndoG-EndoGI-Komplexes

Mehrere der bisher untersuchten Nukleasen der DRGH-Familie wurden als Homodimere beschrieben, unter anderen Nuc1 aus Hefe, die bovine EndoG und die *Serratia*-Nuklease [Dake *et al.*, 1988, Schäfer *et al.*, 2004, Miller & Krause, 1996], wohingegen NucA aus *Anabaena*, für die als einzige ebenfalls einen Inhibitor bekannt ist, als Monomer vorliegt [Meiss *et al.*, 1998]. FRANKE *et al.* konnten zeigen, dass beide Untereinheiten in der dimeren *Serratia*-Nuklease funktionell unabhängig voneinander sind [Franke *et al.*, 1999]. Als 1996 die Kristallstruktur des dimeren *Serratia*-Proteins veröffentlicht wurde, zeigten MILLER und KRAUSE, dass die elektrostatischen Felder beider aktiver Zentren nicht interagieren und schlussfolgerten, dass sie dadurch unabhängig voneinander Nukleinsäuren spalten können [Miller & Krause, 1996]. Es konnte festgestellt werden, dass die dimere *Serratia*-Nuklease dem monomeren *Anabaena*-Enzym beim Abbau polymerer Substrate überlegen ist [Franke *et al.*, 1999]. Daher wurde von FRANKE *et al.* postuliert, dass durch die Dimerbildung ein prozessiver Reaktionsmechanismus erfolgt, denn im Dimer sind beide aktiven Zentren aktiv und liegen weit genug auseinander um sich nicht zu behindern [Miller & Krause, 1996]. Dadurch können beide Untereinheiten simultan eine längere Nukleinsäure binden. Schneidet das eine aktive Zentrum die Nukleinsäure, so ist sie dennoch weiterhin durch das zweite aktive Zentrum an das Enzym gebunden und kann dann sofort, ohne vorherige Dissoziation, wieder geschnitten werden [Franke *et al.*, 1999]. Warum in den DRGH-Nukleasen die Aminosäuren, welche die Dimerisierung vermitteln, nicht konserviert sind im Gegensatz zu Aminosäuren, welche die katalytische Domäne bilden, bleibt unklar. Es wird jedoch argumentiert, dass *Anabaena* aufgrund des autotrophen Energiegewinns einem geringeren Selektionsdruck ausgesetzt ist als *Serratia*, welche von externen Energiequellen abhängig ist. Daher war es für *Anabaena* nicht notwendig ein dimeres Enzym zu evolvieren. Allerdings ist das *Anabaena*-Protein NucA die bisher einzige DRGH-Nuklease, die als Monomer vorliegt. Darüber hinaus ist sie bisher auch die einzige EndoG-homologe Nuklease, zu der ein spezifischer Inhibitor NuiA vorhanden ist. Dabei bilden NucA und NuiA einen Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie [Meiss *et al.*, 1998]. Im Gegen-

satz zur *Anabaena-NucA* liegt die hier untersuchte *Drosophila*-EndoG, obwohl sie ebenfalls einen spezifischen Inhibitor besitzt, Dimer vor (siehe 4.2.6.9). Ihr zugehöriger Inhibitor EndoGI ist jedoch genauso wie der *Anabaena-NucA* ein monomeres Protein. Dabei besitzt EndoGI zwei tandemartig angeordneten homologen Domänen, die, wie gezeigt wurde, unabhängig voneinander die Aktivität von EndoG inhibieren (siehe 4.3.5). Bei der Molmassebestimmung des EndoG-EndoGI-Komplexes wurde eine 2:1-Stöchiometrie bestimmt (siehe 4.3.2). Damit bindet vermutlich je eine der beiden EndoGI-Domänen ein EndoG-Monomer im EndoG-Homodimer und eine vollständige Inhibierung der EndoG-Aktivität wird vermittelt. Auf diese Weise ist EndoGI ideal an die dimere EndoG-Struktur angepasst. Dass beide EndoGI-Domänen separat nicht die gleiche Affinität für EndoG besitzen wie das vollständige EndoGI bestätigt die Vermutung, dass je eine der Domänen ein EndoG-Monomer bindet. Offensichtlich ist die Struktur von EndoGI auf die der homodimeren EndoG abgestimmt, denn die Affinität von vollständigem EndoGI zu EndoG wird auch nicht durch Titrations beider Domänen zusammen erreicht. Wahrscheinlich werden die beiden EndoGI-Domänen, die an EndoG binden, über einen dazwischen liegenden *linker* koordiniert. Eine für die Dimerisierung der *Serratia*-Nuklease essentielle Aminosäure Histidin 184 konnte identifiziert werden [Franke *et al.*, 1999]. In der monomeren *Anabaena-NucA* befindet sich an der entsprechenden Position ein Arginin. Es konnte gezeigt werden, dass durch Austausch von His 184 zu Arg, Thr, Ala oder Asp die *Serratia*-Nuklease keine Homodimere mehr bilden konnte. Somit könnte das Arginin in der *Anabaena-NucA* die fehlende Dimerisierung erklären [Franke *et al.*, 1999]. Aber bei einem Sequenzvergleich der *Serratia*-Nuklease mit den eukaryotischen Endonukleasen G kann festgestellt werden, dass auch diese kein Histidin an der äquivalenten Stelle besitzen. Da aber mehrere der Nukleasen als Dimere vorliegen, wird in diesen Proteinen die Dimerisierung offenbar über andere Aminosäuren vermittelt.

#### **5.4. Lokalisation von EndoG und EndoGI innerhalb der Zelle**

Bei den zuerst identifizierten prokaryotischen DRGH-Nukleasen handelt es sich um sezernierte Proteine. So wird die *Serratia*-Nuklease als 27 kDa großes Präprotein gebildet, wobei das reduzierende Milieu des Zytoplasmas die Ausbildung zweier Disulfidbrücken verhindert [Ball *et al.*, 1992]. Die reife *Serratia*-Nuklease entsteht durch Abspaltung eines 21 Aminosäure langen Signalpeptids. Dabei findet die Hydrolyse des Präproteins und die Disulfidbrückenbildung im oxidativen Extrazellularraum statt [Ball *et al.*, 1992], wodurch der Organismus vor

der Toxizität der Endonuklease geschützt wird. Das Cyanobakterium *Anabaena spec.* hingegen schützt sich vor seiner Nuklease durch einen intrazellulären Inhibitor [Muro-Pastor *et al.*, 1997]. Die bisher beschriebenen eukaryotischen Vertreter der DRGH-Nukleasen liegen alle mitochondrial vor [Schäfer *et al.*, 2004, Cummings *et al.*, 1987]. Wahrscheinlich werden so die intrazellulären Nukleinsäuren durch die Sequestrierung der EndoG im mitochondrialen Intermembranraum geschützt. Diese Lokalisation wird über eine N-terminal-codierte, mitochondriale Lokalisationssequenz vermittelt, die nicht sehr stark konserviert ist. Weiterhin konnte für mehrere EndoGs gezeigt werden, dass im reifen Protein die Signalsequenz abgespalten war [Widlak *et al.*, 2001, Côté *et al.*, 1989]. Die vollständige *Drosophila*-EndoG besitzt eine Größe von 34,6 kDa. Die Proteinbande, welche endogener *Drosophila*-EndoG entsprach, befand sich in einem SDS-Gel auf Höhe des 29 kDa Proteinstandards (siehe 4.2) und entspricht daher höchstwahrscheinlich prozessierter EndoG, welcher keine Lokalisationssequenz mehr besitzt. Weiterhin wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie festgestellt, dass die *Drosophila*-EndoG ebenfalls mitochondrial lokalisiert ist (siehe 4.2.6.10). Der spezifische Inhibitor EndoGI hingegen befindet sich hauptsächlich im Zellkern (siehe 4.1.2). Vermutlich schützt er dort die genomische DNA vor EndoG, die möglicherweise aus den Mitochondrien „entkommen“ ist oder während der Translation entsteht. Denn wie bei der Klonierung der rekombinanten EndoG aufgefallen ist, reichen offenbar schon sehr geringe Konzentrationen an dieser Nuklease, um Zellen in Abwesenheit von EndoGI zu töten (siehe 4.2.1). Wie in anderen Organismen die Zellen während der Translation vor der toxischen Wirkung der EndoG geschützt werden, ist unklar.

### 5.5. Der EndoG-EndoGI-Komplex

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von EndoG sofort und vollständig durch einen Überschuss von EndoGI gehemmt werden kann. Das bedeutet, dass vermutlich die einfache Assoziation der Komponenten zur Komplexbildung ausreicht. Bei der Bestimmung des  $K_D$ -Werts im subpikomolaren Bereich erforderte die Komplexbildung eine Vorinkubation der Proteine, denn bei diesen Konzentrationen ist die Komplexbildung zeitabhängig und nicht mehr unmittelbar (siehe 4.3.3). Mit einem  $K_D$ -Wert von  $1,6 \cdot 10^{-13}$  M ist die Interaktion zwischen EndoG und EndoGI sehr stark. Dabei sind  $K_D$ -Werte in einem Bereich von  $10^{-12}$ - $10^{-15}$  M typisch für Nukleasen und ihre Inhibitoren. So assoziieren der RNase-Inhibitor aus Schwein und die bovine RNase A in einer sehr engen Wechselwir-

kung mit einem  $K_D$ -Wert von  $5,9 \cdot 10^{-14}$  M [Kobe & Deisenhofer, 1996]. Auch Barnase, eine RNase, und ihr spezifischer Inhibitor Barstar besitzen mit einem  $K_D$ -Wert von  $1,3 \cdot 10^{-14}$  M eine sehr starke Interaktion [Schreiber & Fersht, 1993]. Colicin E9, welches ebenfalls zur  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Superfamilie gehört und als *Escherichia coli*-Bakteriocin das Wachstum andere Bakterienstämme behindert, bildet einen Komplex mit seinem Immunprotein Im9, der, abhängig vom Salzgehalt, einen  $K_D$ -Wert von  $1 \cdot 10^{-16}$ - $10^{-14}$  M besitzt und damit zu den stabilsten jemals untersucht Komplexen gehört [Wallis *et al.*, 1995]. NucA, das EndoG-homologe Protein aus dem Cyanobakterium *Anabaena spec.* und ihr Inhibitor NuiA gehen einen 1:1-Komplex mit einem  $K_D$ -Wert von  $1 \cdot 10^{-12}$  M ein [Meiss *et al.*, 2000]. Die Struktur des NucA-NuiA-Komplexes wurde 2007 als erster Komplex für eine unspezifische Nuklease und ihren Inhibitor aufgeklärt [Ghosh *et al.*, 2007]. Dabei wurden grundsätzliche Unterschiede des Bindungsmechanismus des NuiA-NucA-Komplexes zu dem der verwandten Colicin-Immunprotein-Komplexe festgestellt. Bei den Colicin-DNasen ist das aktive Zentrum selbst nicht an der Bindung des Immunproteins beteiligt [Ko *et al.*, 1999]. Stattdessen wird durch die Immunproteine die DNA-Bindestelle, welche sich direkt neben dem katalytischen Zentrum befindet [Osborne *et al.*, 1997, Kleanthous *et al.*, 1999], elektrostatisch blockiert. Somit können keine Substrate mehr gebunden werden, und die hydrolysierende Aktivität wird unterbunden. Damit ähnelt die Inhibierung der Colicin-DNasen durch ihre Immunproteine der von CAD durch ICAD, bei der ebenfalls die DNA-Bindung blockiert wird [Sakahira *et al.*, 2001]. Dabei können die Immunproteine auch mit anderen Colicinen Komplexe bilden und deren DNase-Aktivität inhibieren. So bindet das Immunprotein Im2 das Colicin E9 mit einem  $K_D$ -Wert von  $1 \cdot 10^{-8}$  M [Li *et al.*, 1997, Kleanthous & Walker, 2001], was immerhin eine um einen Faktor  $10^6$ - $10^8$  niedrigere Affinität als die des spezifischen Im9-Proteins ist. Die Bindung dieses „fremden“ Immunproteins wird durch die spezielle Art der DNase-Immunprotein-Interaktion ermöglicht, welche als dualer Erkennungsmechanismus bezeichnet wird [Li *et al.*, 1998]. Dabei wird die Bindung zwischen DNase und Immunprotein durch die sehr wenigen konservierten Aminosäuren der Bindungsstelle in den Colicinen und den Immunproteinen vermittelt. Die Stärke der Bindung wird über die Aminosäuren moduliert, welche in den Proteinen variabel und an der Bindung beteiligt sind.

Die *Anabaena*-Nuklease NucA bindet ihren spezifischen Inhibitor NuiA hingegen direkt im katalytischen Zentrum [Ghosh *et al.*, 2007]. Dabei dringt das C-terminale Threonin 195 des NuiA in das aktive Zentrum von NucA, bindet dort das katalytische divalente Metallion und ersetzt dadurch ein koordiniertes Sulfatmolekül.

Dieses war bereits in der Struktur der NucA allein gefunden worden und imitiert wahrscheinlich die 5'-Phosphatabgangsgruppe [Ghosh *et al.*, 2005]. Damit wurde die erste Struktur vorgestellt, in der das katalytische Metallion direkt sowohl mit der Nuklease, als auch mit dem Inhibitor interagiert. Da auch Glu 24<sub>NuiA</sub> in das aktive Zentrum eindringt und die Seitenkette dabei wahrscheinlich die Ladung eines DNA-Phosphats imitiert, wird die Bindung von NuiA offenbar durch Nachbildung der Nuklease-Substrat-Interaktion vermittelt. Insgesamt werden, neben der Interaktion über das katalytische Metallion, 12 Wasserstoffbrücken zwischen NuiA und NucA ausgebildet. Die Struktur von NuiA wird auch als „offener Kiefer“ bezeichnet, wobei der obere Teil aus den Aminosäuren Threonin 195<sub>NuiA</sub> und Glutaminsäure 24<sub>NuiA</sub> besteht, welche in das aktive Zentrum eintreten. Der untere Teil besteht aus Asparaginsäure 75<sub>NuiA</sub> und Tryptophan 76<sub>NuiA</sub>, welche einen vorstehenden Bereich von NucA umhüllen. Dass der C-terminale Teil von NuiA an der Bindung beteiligt ist, wurde bereits von MEISS *et al.* gezeigt [Meiss *et al.*, 2000]. C-terminale Deletionsmutanten zeigten einen stark erhöhten  $K_D$ -Wert und waren nur bei einem 50- bis 100-fachen molaren Überschuss in der Lage, NucA bei nanomolaren Konzentrationen komplett zu hemmen. Die NucA-NuiA-Interaktion basiert hauptsächlich auf Wasserstoff- und Salzbrücken, in deren Zentrum Thr 195<sub>NuiA</sub> und Glu 24<sub>NuiA</sub> stehen, welche gebundene Nukleinsäuren imitieren [Ghosh *et al.*, 2005].

NuiA aus *Anabaena spec.* besitzt keine erkennbare Homologie zu EndoGI aus *Drosophila melanogaster*. Trotzdem erfüllen beide Proteine ihre Funktion als Inhibitoren der unspezifischen Nukleasen NucA bzw. EndoG. Bisher wurden die Strukturen der prokaryotischen Nukleasen aus *Anabaena* und *Serratia* aufgeklärt [Miller *et al.*, 1994, Ghosh *et al.*, 2005], welche untereinander und zu der *Drosophila*-EndoG eine etwa 22-25%ige Sequenzidentität aufweisen. Es wurde festgestellt, dass trotz der niedrigen Sequenzhomologie eine hohe Strukturhomologie zwischen beiden Proteinen vorliegt, abgesehen davon, dass die *Serratia*-Nuklease als Dimer und NucA als Monomer auftritt. Dabei sind vor allem die Aminosäuren, welche an der katalytischen Aktivität beteiligt sind, stark konserviert. Darüber hinaus gleichen sich die Aktivitäten von *Drosophila*-EndoG und NucA stark, so dass die Struktur, zumindest die des aktiven Zentrums, sehr ähnlich sein sollte. Da aber EndoGI keinerlei Sequenzhomologie zu NuiA besitzt, muss die Interaktion zwischen EndoG und EndoGI nicht der NucA-NuiA-Bindung entsprechen.

Das katalytische Metallion, welches im NucA-NuiA-Komplex mit beiden Proteinen interagiert, wird in NucA durch Asn 155 gebunden [Ghosh *et al.*, 2005]. Obgleich die Beteiligung von Asparagin 155 an der NucA-NuiA-Bindung gezeigt wur-

de [Ghosh *et al.*, 2005], wurde die *Anabaena*-NucA N155A-Variante bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  durch  $1\mu\text{M}$  NuiA normal inhibiert [Meiss *et al.*, 2000]. Dabei liegen mikromolare Konzentrationen wahrscheinlich noch deutlich über dem  $K_D$ -Wert des NucA N155A-NuiA-Komplexes, so dass die Detektion einer wahrscheinlich schwächeren Bindung vermutlich nicht möglich war. In der *Drosophila*-EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N55 N187K ist das entsprechende Asparagin spontan zu Lysin mutiert. Dabei besitzt diese Variante eine 50000-fach niedrigere spezifische Aktivität als EndoG $\Delta$ N53 (siehe 4.3.7). Auch für die entsprechende Mutation in der *Anabaena*-Nuklease bzw. in der bovinen EndoG wurde kaum Restaktivität gemessen [Meiss *et al.*, 2000, Schäfer *et al.*, 2004]. Weiterhin ist die Affinität von EndoG $\Delta$ N55 N187K für den Inhibitor um den Faktor 230 niedriger als die von EndoG $\Delta$ N53 für EndoGI (siehe 4.3.7), was auf eine Beteiligung des Asparagins 187 an der Inhibitorbindung schließen lässt. Obwohl für die entsprechende NucA-Punktmutante, bei den zuvor erwähnten zu hohen Konzentrationen, keine verminderte Hemmung durch NuiA bestimmt wurden [Meiss *et al.*, 2000], ist die Interaktion zwischen der *Drosophila*-EndoG $\Delta$ N55 N187K-Variante und EndoGI deutlich schwächer als zwischen EndoG $\Delta$ N53 und EndoGI. Da in der hier vorliegenden Arbeit bei wesentlich geringeren Proteinkonzentrationen gearbeitet wurde als bei den Untersuchung an der NucA-Punktmutante, kann eine Interaktion von EndoGI über das divalente  $\text{Mg}^{2+}$  im EndoG-EndoGI-Komplex nicht ausgeschlossen werden.

In der Struktur des NucA-NuiA-Komplexes konnte keine Beteiligung des Histidins 124, welches ein Teil des stark konservierten DRGH-Motivs ist und als allgemeine Base die Hydrolyse von Nukleinsäuren katalysiert, an der NuiA-Bindung nachgewiesen werden. Das Arginin 122 jedoch bildet zwei Wasserstoffbrücken aus, unter anderem zu Glu 24<sub>NuiA</sub>, welches direkt in das aktive Zentrum eindringt [Ghosh *et al.*, 2007]. Die Punktmutation NucA R122A wurde jedoch bei äquimolaren Konzentration von  $1\mu\text{M}$  nahezu normal durch NuiA gehemmt [Meiss *et al.*, 2000], wobei mikromolare Konzentrationen, wie bereits erwähnt (siehe vorherigen Absatz), die Detektion einer mögliche schwächeren Bindung wahrscheinlich nicht ermöglichten. Die *Drosophila*-EndoG-Variante EndoG $\Delta$ N53 DAGA, in der sowohl das Histidin, als auch das Arginin im DRGH-Motiv zu Alanin mutiert waren, zeigte wie erwartet keine messbare katalytische Aktivität (siehe 4.2.3). Zusätzlich war sie jedoch auch nicht in der Lage, mit Wildtyp-EndoG um EndoGI zu konkurrieren (siehe 4.3.6). Da durch Mutation des DRGH-Motivs der *Drosophila*-EndoG die Inhibitor-Bindung stark beeinflusst wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass das aktive Zentrum direkt an der Nuklease-Inhibitor-Interaktion beteiligt ist. Womöglich handelt es sich um einen ähnlichen Mechanismus wie im Falle der

NucA-NuiA-Interaktion, wo NuiA die Substratbindung nachahmt und direkt mit dem Arginin des DRGH-Motivs interagiert. Dass es sich um einen ähnlichen Mechanismus wie bei den Colicin-DNasen und ihren Immunproteinen bzw. wie bei CAD-ICAD handelt, ist wenig wahrscheinlich, denn dort erfolgte die Bindung nicht im aktiven Zentrum und Mutationen der dort involvierten Aminosäuren resultieren zwar im Aktivitätsverlust der Nukleasen, aber die Komplexbildung mit den Inhibitoren wird nicht beeinträchtigt [Sakahira *et al.*, 2001, Walker *et al.*, 2004].

Als die Struktur des Barnase-Barstar-Komplexes durch BUCKLE und FERSHT aufgeklärt wurde, war ersichtlich, dass auch Barstar in das aktive Zentrum der RNase Barnase eindringt und dort die zwei Phosphatbindestellen durch Asp39 und Gly43 besetzt [Buckle *et al.*, 1994]. Da aber Barstar kein Äquivalent für das Guanin des RNA-Substrats besitzt, wird die Guanin-Erkennungsstelle durch neun Wassermoleküle besetzt. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Komplexbildung liegt bei  $6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [Schreiber & Fersht, 1993]. Dies liegt nahe der maximalen Geschwindigkeitskonstante für Molekülkollisionen in Lösungen, welche nach der EINSTEIN-SMOLUCHOWSKI-Beziehung  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  beträgt [Smoluchowski, 1917]. Solche hohen Assoziationsgeschwindigkeiten für Komplexe aus Biomolekülen können durch elektrostatische Kräfte ermöglicht werden, denn um die Substratbindung zu ermöglichen, ist die Nukleinsäurebindestelle in Barnase positiv geladen [Buckle *et al.*, 1994]. Barstar besitzt an der Barnase-Bindestelle eine negativ geladene Oberfläche und kann so ideal die Nukleinsäuren imitieren und in das aktive Zentrum eintauchen. Somit ist die hohe Assoziationsgeschwindigkeit auf die hohe Komplementarität sowohl der Oberfläche, als auch der Ladung an den Bindestellen beider Proteine zurückzuführen [Buckle *et al.*, 1994]. Die sehr niedrige Dissoziationsgeschwindigkeit des Barnase-Barstar-Komplexes von  $8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  gibt die sehr stabile Bindung beider Proteine wieder [Schreiber & Fersht, 1993]. Für den NucA-NuiA-Komplex aus *Anabaena* sind keine Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeiten berichtet worden. Der *Drosophila*-EndoG-EndoGI-Komplex dissoziiert mit einer Geschwindigkeit von  $3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Damit besitzt der Komplex eine Halbwertszeit von über 3 Tagen. Die berechnete Assoziationsgeschwindigkeit beträgt  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und liegt nur geringfügig unter der des Barstar-Barnase-Komplexes (siehe 4.3.8). Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch die Bindung zwischen EndoG und EndoGI möglicherweise über elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert wird. Dies ist auch im NucA-NuiA-Komplex der Fall. Das überwiegend positiv geladene aktive Zentrum der NucA, welches durch diese Ladung die Bindung der stark negativ geladenen Nukleinsäuren erleichtert, interagiert direkt über elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen

Oberfläche von NuiA [Ghosh *et al.*, 2007]. Leider gibt es bisher nur wenige gut untersuchte Beispiele von Nukleasen und ihren Inhibitoren, in denen der Inhibitor direkt mit dem aktiven Zentrum der Nuklease interagiert. Jedoch wird in diesen Fällen die Bindung hauptsächlich über hydrophile und elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt, wobei die Inhibitoren offenbar die Eigenschaften der Substrate imitieren. Aufgrund der großen Sequenzhomologie der aktiven Zentren in NucA und EndoGI und der Vermutung, dass auch EndoGI direkt mit dem aktiven Zentrum der EndoG interagiert, kann erwartet werden, dass auch EndoGI über diese Art von Wechselwirkungen EndoG bindet, ähnlich wie Barstar und NuiA. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem 1000-fachen molaren Überschuss NuiA in der Lage ist, die *Serratia*-Nuklease zu inhibieren [Meiss *et al.*, 2000]. Diese Komplexe waren allerdings nicht stabil genug, um in Gelfiltrationsexperimenten sicher detektiert zu werden. Damit ist die Affinität von NuiA für das *Serratia*-Protein wesentlich geringer als für NucA. Dass jedoch eine Bindung möglich ist, bestätigt die ähnliche Struktur der aktiven Zentren beider Enzyme. Ob auch EndoGI die pro- oder eukaryotischen Endonukleasen G inhibieren kann, wurde bisher nicht getestet. Doch man kann vermuten, dass eine Inhibierung der eukaryotischen dimeren EndoGs durch EndoGI möglich sein sollte, denn die eukaryotischen Endonukleasen G weisen untereinander eine höhere Sequenzidentität auf als zwischen der *Serratia*-Nuklease und NucA besteht.

Obwohl EndoG und EndoGI eine so starke Bindung aufweisen, war es möglich, die beiden endogenen Proteine bei der Reinigung aus Schneider2-Zellextrakt auf einer DEAE-Säule voneinander zu trennen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Affinität der endogenen Proteine aufgrund einer unbekannt posttranskriptionalen Modifikation erniedrigt ist. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass hohe Salzkonzentrationen die Stabilität des Komplexes beeinflussen. Denn bei der Reinigung der rekombinanten Proteine wurde beobachtet, dass bei Kalium- bzw. Natriumchloridkonzentrationen über 300 mM die Trennung beider Proteine besser möglich war. SCHREIBER und FERSHT beschrieben einen ähnlichen Effekt für den Barnase-Barstar-Komplex, welcher bei 500 mM NaCl eine 40-fach niedrigere Assoziations- und eine 5-fach erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeit besitzt [Schreiber & Fersht, 1993] als in Abwesenheit von Salz. Weiterhin wurde berichtet, dass NaCl bereits in einer Konzentrationen von 100 mM die Assoziation deutlich verlangsamt. Offenbar werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen durch hohe Konzentrationen von Kalium- bzw. Natriumkonzentrationen beeinträchtigt (Ionenstärkeeffekt). Da auch der EndoG-EndoGI-Komplex wahrscheinlich durch hohe Ionenstärken destabilisiert wird, scheinen die

Wechselwirkungen zwischen den bindenden Proteinen ähnlich zu sein. Ob die Ionenstärke die Stabilität des NucA-NuiA-Komplexes beeinflusst, wurde nicht untersucht.

## 5.6. Der EndoGI-14-3-3 $\epsilon$ -Komplex

14-3-3-Proteine sind Homodimere, die durch Interaktion mit anderen Proteinen deren enzymatische Aktivität, Stabilität, Lokalisation, Phosphorylierung bzw. molekulare Interaktionen modifizieren können [Dougherty & Morrison, 2004].

Die beiden *Drosophila*-14-3-3-Proteine waren zusammen mit EndoGI aus dem Schneider2-Zellextrakt gereinigt und durch anschließende massenspektrometrische Analyse der verbliebenen Proteinbanden identifiziert worden. Da sie nach einer Reinigung über sechs aufeinanderfolgende Chromatographiesäulen noch mit EndoGI koeluierten, wurde eine mögliche Interaktion zwischen EndoGI und den 14-3-3-Proteinen vermutet. Tatsächlich konnte bei Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge eine Komplexbildung zwischen EndoGI und 14-3-3 $\epsilon$  beobachtet werden (siehe 4.4.2). Dabei bestand der Komplex aus dimerem 14-3-3 $\epsilon$  und monomerem EndoGI. Eine Konzentration beider Proteine von 1  $\mu$ M ermöglicht eine 85%ige Komplexbildung, was auf eine schwache Affinität von 14-3-3 $\epsilon$  für EndoGI hindeutet ( $K_D$ -Wert im mikromolaren Bereich). Bisher wurden für Interaktionen mit 14-3-3-Proteinen  $K_D$ -Werte im nanomolaren Bereich bestimmt [Campbell *et al.*, 1997, Fu *et al.*, 2000]. Zumeist wird die Bindung der 14-3-3-Proteine an die Liganden über ein Erkennungsmotiv mit einem phosphorylierten Serin vermittelt [Muslin *et al.*, 1996, Yaffe *et al.*, 1997]. Aber auch unphosphorylierte Proteine werden als Interaktionspartner erkannt [Winkler *et al.*, 1998]. Die Affinität der 14-3-3-Proteine für ihre jeweiligen Partner ist dabei ähnlich. Jedoch werden Proteine, die über eine Phosphoserin-vermittelte Interaktion gebunden werden, nicht oder nur sehr schlecht als Bindungspartner erkannt, wenn das Serin im Erkennungsmotiv unphosphoryliert vorliegt [Muslin *et al.*, 1996]. Es wurden bisher verschiedene Konsensussequenzen gefunden, welche im phosphorylierten Zustand die 14-3-3-Interaktion vermitteln [Yaffe *et al.*, 1997]. EndoGI enthält keines dieser bekannten Motive, wobei bemerkt sein soll, dass immer wieder neue Erkennungssequenzen veröffentlicht werden. Die niedrige Affinität, mit der EndoGI durch 14-3-3 $\epsilon$  gebunden wird, steht in scheinbarem Widerspruch zu der Tatsache, dass diese Proteine nach einer Reinigung über sechs aufeinanderfolgende Chromatographiesäulen mit EndoGI koeluierten, wobei ein zufällige Koelution nicht ausgeschlossen werden kann. Die niedrige Affinität der Bindung,

die mit rekombinanten Proteinen gemessen wurde, kann aber auch auf eine fehlende Phosphorylierung in einem unbekanntem Erkennungsmotiv zurückzuführen sein. Wenn in Schneider2-Zellen flag-14-3-3 $\epsilon$  exprimiert und anschließend endogenes EndoG1 mit einem spezifischen Immenserum präzipitiert wurde, kopräzipitierte das flag-14-3-3 $\epsilon$  (siehe 4.4.2). In zusätzlichen, hier nicht beschriebenen Experimenten kopräzipitierte auch endogenes 14-3-3 $\epsilon$  mit EndoG1. Damit konnte die 14-3-3 $\epsilon$ -EndoG1-Bindung bestätigt werden. Das Signal des kopräzipitierten endogenen 14-3-3 $\epsilon$  war nur schwach ausgeprägt. Die endogene Konzentration an 14-3-3 $\epsilon$  war nicht bestimmt worden. Da die 14-3-3-Proteine aber an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt sind, ist die endogene Konzentration beider 14-3-3-Proteine vermutlich hoch. Daher kann dieses schwache Signal wahrscheinlich nicht auf eine niedrige Konzentration an endogenem 14-3-3 $\epsilon$  zurückzuführen sein. Möglich wäre allerdings, dass auch bei endogenen Proteinen nur eine schwache Komplexbildung vorliegt. Da durch Zugabe von rekombinantem 14-3-3 $\epsilon$  auch bei Konzentrationen bis 15  $\mu$ M keine Beeinflussung der Inhibierung von EndoG durch EndoG1 zu beobachten war, konnte die Bedeutung der schwachen 14-3-3 $\epsilon$ -EndoG1-Bindung nicht geklärt werden. Dass aber sowohl 14-3-3 $\epsilon$ , als auch 14-3-3 $\zeta$  zusammen mit dem endogenen EndoG1 identifiziert wurden, obwohl nur das 14-3-3 $\epsilon$  EndoG1 bindet, ist damit erklärbar, dass die 14-3-3-Proteine stabile Homo- und Heterodimere bilden [Jones *et al.*, 1995, Chaudhria *et al.*, 2003].

### 5.7. EndoG und EndoG1 während der Apoptose

Als Apoptose wird der evolutionär konservierte, programmierte Zelltod verstanden. Die Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Geweben. So können, mittels Apoptose, infizierte oder beschädigte Zellen beseitigt werden [Vaux & Korsmeyer, 1999, Samejima & Earnshaw, 2005, Schäfer, 2007].

Apoptotische Zellen weisen charakteristische Merkmale auf. Solche Kennzeichen der Apoptose sind das Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern, die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA und das Ausstülpfen der Plasmamembranen (*blebbing*) [Wyllie *et al.*, 1980]. Der Abbau der chromosomalen DNA geschieht durch Endonukleasen, welche die DNA in drei Stufen hydrolysieren [Samejima & Earnshaw, 2005]. Dabei wird die chromosomale DNA zunächst an Positionen innerhalb der internukleosomalen *linker* in 50-300 kb große Fragmente gespalten [Walker *et al.*, 1994]. Im Anschluss erfolgt der Abbau dieser Fragmente in Oligomere und schließlich in Nukleotide [Samejima *et al.*, 2001,

Liu *et al.*, 1999b]. Die dafür verantwortlichen Nukleasen sind CAD, EndoG, DNase I und DNase  $\gamma$ , die durch eine Vielzahl von Faktoren stimuliert werden, wie z.B. Histon H1, HSP70, DNA-Topoisomerase II und AIF [Samejima *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 1999b, Candé *et al.*, 2002, Samejima & Earnshaw, 2005].

Die Rolle der EndoG während der Apoptose ist umstritten. Ursprünglich wurde EndoG als apoptotische Nuklease identifiziert als in CAD-*knock-out*-Mäusen die apoptotische DNA-Fragmentierung untersucht wurde [Li *et al.*, 2001]. Der Phänotyp der CAD-*knock-out*-Mäuse war unauffällig und in apoptotischen Zellen konnte DNA-Fragmentierung beobachtet werden. Es wurde festgestellt, dass die verbleibende DNaseaktivität mit den Mitochondrien assoziiert war und durch Fraktionierung mitochondrialer Mausextrakte wurde die für den DNA-Abbau verantwortliche Nuklease identifiziert, Endonuklease G. Es konnte in weiteren Untersuchungen festgestellt werden, dass EndoG nach apoptotischer Stimulation aus den Mitochondrien entlassen wird und in den Zellkern eindringt. Zudem konnten Li *et al.* zeigen, dass die DNA-Fragmentierung in apoptotischen CAD-defizienten Zellextrakten durch einen spezifischer EndApoptoseresistenz und eine Reduktion der Caspaseaktivierung-Antikörper vollständig inhibiert wird, während durch Zugabe eines Präimmuserums DNA-Fragmentierung beobachtet werden konnte. Auch konnten sie *in-vivo* nachweisen, dass die apoptotische DNase in CAD-defizienten Zellen tatsächlich aus den Mitochondrien entlassen wird. Aus all diesen Beobachtungen schlussfolgerten Li *et al.*, dass EndoG die für die apoptotische DNA-Fragmentierung verantwortliche DNase in CAD-defizienten Zellen sei [Li *et al.*, 2001].

Jedoch wurden nach mehreren weiteren Untersuchungen an EndoG-*knock-out*-Mäusen widersprüchliche Daten veröffentlicht. Die erste Studie berichtet, dass die EndoG-defizienten Mäuse bereits in frühen Stadien der Embryogenese sterben [Zhang *et al.*, 2003]. Des Weiteren zeigten EndoG<sup>+/-</sup>-Zellen eine erhöhte Apoptoseresistenz und eine Reduktion der Caspaseaktivierung, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation. Wurden diese Mäuse mit CAD-defizienten Mäusen gekreuzt, konnte nahezu keine DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation in EndoG<sup>+/-</sup>CAD<sup>-/-</sup>-Zellen mehr beobachtet werden. In einer zweiten Studie wurde hingegen veröffentlicht, dass EndoG-defiziente Mäuse lebensfähig sind [Irvine *et al.*, 2005]. Darüber hinaus besaßen Zellen dieser Mäuse eine mit dem Wildtyp vergleichbare DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation, wenn die Zellen mit Etoposid oder Aktinomycin D in die Apoptose getrieben wurden. In einer dritten Studie konnten DAVID *et al.* die die Beobachtungen von IRVINE *et al.* bestätigen [David *et al.*, 2006]. Es wurde gezeigt, dass die Maus-Embryogenese

und -Entwicklung in EndoG-*knock-out*-Mäusen normal verlief. Auch in dieser Studie konnte keine Veränderungen während der Apoptose in diesen EndoG-defizienten Mäusen beobachtet werden. Dabei unterschieden sich die EndoG-*knock-out*-Mäuse in der ersten Studie von den beiden anderen Studien nur darin, dass in der ersten Studie neben EndoG zusätzlich noch ein unbekanntes Gen unterbrochen wurde. Der *knock-out* dieses Genes könnte daher die widersprüchlichen Beobachtungen erklären. Andererseits könnten in EndoG-defizienten Zellen die anderen apoptotischen Nukleasen die Funktion der EndoG übernehmen, was die unauffälligen Phänotypen der zwei anderen Studien erklären könnte. Auch wurden in diesen zwei Studien nicht der Phänotyp von EndoG<sup>-/-</sup>CAD<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht.

In *Caenorhabditis elegans*, wo das CAD/ICAD-System offenbar nicht vorhanden ist, wurde gezeigt, dass das EndoG-homologe Cps-6 mit verschiedenen Proteinen interagiert und einen Enzymkomplex bildet, das sogenannte Degradosom [Parrish *et al.*, 2001, Parrish & Xue, 2006], welches neben Cps-6 noch das AIF-homologe Wah-1 und sechs andere Nukleasen enthält. PARRISH *et al.* konnten zeigen, dass RNAi-induzierte Reduktion der Cps-6-Aktivität die DNA-Fragmentierung beeinträchtigt. Desweiteren wurde ein verzögertes Auftreten apoptotischer Zellen beobachtet [Parrish *et al.*, 2001]. SCHÄFER *et al.* konnten zeigen, dass durch Überexpression von aktiver boviner EndoG in Säugetierzellen Apoptose induziert wird, während nach Überexpression einer inaktiven EndoG-Variante die Zellen weiterhin lebensfähig sind [Schäfer *et al.*, 2004].

Die toxische Aktivität der CAD wird durch ICAD reguliert [Samejima & Earnshaw, 1998]. Für die Endonukleasen G aus Vertebraten wurde hingegen bisher kein spezifischer Proteininhibitor beschrieben. Offenbar reicht die Sequestrierung des Proteins im mitochondrialen Intermembranraum aus um die Aktivität zu regulieren [Widlak *et al.*, 2001, Schäfer *et al.*, 2004].

Es wurde mehrfach berichtet, dass nach Induktion der Apoptose EndoG aus den Mitochondrien entlassen wird und in den Zellkern wandert [Li *et al.*, 2001, Schäfer *et al.*, 2004]. Ob auch die *Drosophila*-EndoG während der Apoptose die Mitochondrien verlässt und in den Zellkern eindringt, konnte aufgrund eines fehlenden spezifischen Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Doch sollte sie tatsächlich an der apoptotischen DNA-Fragmentierung beteiligt sein, wäre eine Aktivität der EndoG in Anwesenheit des spezifischen Inhibitors EndoGI nicht möglich, der mit 4 µM in einer hohen Konzentration innerhalb der Zellkerne vorliegt (Abschätzung erfolgte durch *Western blot*-Analyse von endogenem EndoGI und Vergleich mit einem Proteinstandard). Der *Drosophila*-EndoG-EndoGI ist so stabil, dass EndoGI bereits vor dem apoptotischen Freiwerden der mit-

ochondrialen Proteine inaktiviert werden muss, um die Aktivität der EndoG nicht zu behindern. Oder ein möglicher Inaktivierungsmechanismus müsste fähig sein, EndoGI im Komplex mit EndoG zu erreichen. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass EndoGI in apoptotischen Schneider2-Zellen den Zellkern verlässt (siehe 4.5). Ob dies jedoch vor oder nach dem Freiwerden der mitochondrialen Proteine geschieht, konnte nicht bestimmt werden. Diese Translokation könnte über eine Interaktion mit 14-3-3 $\epsilon$  vermittelt werden, denn eine der Funktionen, die 14-3-3-Proteine ausüben, ist die Proteintranslokation. Dabei wird zumeist eine Lokalisationssequenz im Bindungspartner durch das 14-3-3-Protein überdeckt und beide Proteine werden transloziert [Muslin & Xing, 2000]. Jedoch unterschied sich die Lokalisation von EndoGI in *Drosophila*-Embryonen, die homozygot eine 14-3-3 $\epsilon$ -Defizienz besaßen, nicht von der in Wildtyp-Embryonen (Dr. C. TEMME, persönliche Mitteilung). Es konnte nicht untersucht werden, ob EndoGI bei Eintreten von Apoptose in diesen 14-3-3 $\epsilon$ -defizienten Embryonen ebenfalls den Zellkern verlässt. Bei Immunpräzipitations-Experimenten konnte kein Unterschied in der Bindung zwischen EndoGI und 14-3-3 $\epsilon$  in apoptotischen Schneider2-Zellextrakten im Vergleich zur Komplexbildung in Wildtyp-Schneider2-Zellextrakt beobachtet werden. Da sich aber nicht alle Zellen in den apoptotischen Schneider2-Zellextrakten in der gleichen Phase der Apoptose befanden und auch ein Teil der Zellen noch nicht apoptotisch war, könnte eine mögliche Veränderung der EndoGI-14-3-3 $\epsilon$  anhand dieser Extrakte eventuell nicht nachweisbar sein. Das Auswandern von EndoGI aus dem Zellkern während der Apoptose ist aber nicht ausreichend um die Bildung des EndoG-EndoGI-Komplexes zu verhindern. Jedoch nahm scheinbar die Gesamtkonzentration an EndoGI in den apoptotischen Zellen ab (siehe 4.5). Eine Proteolyse von EndoGI wäre eine mögliche Erklärung dafür. Dies konnte allerdings weder mittels *Western blotting* noch durch Titration der apoptotischen Schneider2-Zellextrakte mit EndoG nachgewiesen werden, was wiederum an der bereits erwähnten Zusammensetzung dieser Extrakte liegen könnte. Dieser Aspekt sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ein Zeichen der Apoptose ist das Schrumpfen des Zytoplasmas, was hauptsächlich durch starke Verringerung der intrazellulären Kalium- und Natriumkonzentrationen vermittelt wird [Bortner und Cidlows, 2002]. Wie bereits gezeigt, besitzt die *Drosophila*-EndoG ebenso wie homologe EndoGs bei physiologischen Kaliumkonzentrationen keine maximale Aktivität. Wenn die katalytische Aktivität aber nur während der Apoptose erforderlich ist, so stimuliert der massive Verringerung der Ionenstärke während der Apoptose vermutlich die EndoG-Aktivität. Die Inhibierung durch physiologische Kaliumkonzentrationen könnte somit ein möglicher Schutz-

mechanismus der gesunden Zelle sein, obwohl nachgewiesen wurde, dass bereits Spuren an EndoG toxisch wirken.

## 6. Zusammenfassung

Als Apoptose wird der evolutionär konservierte, programmierte Zelltod verstanden. Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Geweben. Das Fortschreiten der Apoptose in Zellen wird durch das Schrumpfen des Zytoplasmas, Chromatinkondensation und -fragmentierung, Plasmamembranausstülpungen und abschließenden Zerfall in Vesikel charakterisiert. Dabei wurden bisher mehrere Nukleasen identifiziert, die für den Abbau der chromosomalen DNA verantwortlich sind. Dazu gehören CAD und Endonuklease G, welche unspezifisch die DNA zunächst in 50-300 nt große Fragmente und anschließend in Oligomere abbauen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Endonuklease G (EndoG) und ihr spezifischer Inhibitor (EndoGI) aus *Drosophila melanogaster* untersucht. Dabei lag das Augenmerk auf der Untersuchung des EndoG-EndoGI-Komplexes. Mit der Identifizierung von EndoGI wurde erstmalig ein spezifischer Inhibitor für eine eukaryotische Endonuklease G gefunden, welcher als Inhibitor einer potentiell apoptotischen Nuklease einen besonderen Wert besitzt.

Die EndoG aus *Drosophila melanogaster* weist eine 53%ige Sequenzidentität mit der humanen EndoG auf und besitzt eine N-terminale, mitochondriale *targeting*-Sequenz. Die *Drosophila*-EndoG ist, gleich ihren homologen Proteinen, eine DNA/RNA-unspezifische Endonuklease, welche sowohl einzel-, als doppelsträngige Nucleinsäuren hydrolysiert. Dabei wurde eine schwache Präferenz für homopolymeres Poly(dA) und Poly(dT) bestimmt. Als Mitglied der  $\beta\beta\alpha$ -Metall-Superfamilie von Nucleasen ist die nukleolytische Aktivität der EndoG abhängig von divalenten Metallionen, wobei nur  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  eine schnelle Nucleinsäurehydrolyse ermöglichen. KCl-Konzentrationen über 50 mM haben eine hemmende Wirkung auf die enzymatische Aktivität der EndoG. Die *Drosophila*-EndoG liegt als Monomer vor und befindet sich in Schneider2-Zellen in den Mitochondrien.

Bei EndoGI handelt es sich um ein 359 Aminosäuren großes Protein, welches sich in Schneider2-Zellen im Zellkern befindet. Es konnten keine homologen Proteine in den Genomen anderer Spezies gefunden werden. Das Protein besteht aus zwei tandemartig angeordneten, homologen Domänen und liegt als Monomer vor.

EndoGI ist in der Lage die katalytische Aktivität von EndoG unmittelbar und sofort zu inhibieren, wobei vermutlich einfache Assoziation für die Bindung von EndoGI durch EndoG verantwortlich ist. Der EndoG-EndoGI-Komplex besitzt ei-

ne 2:1-Stöchiometrie. Dabei bindet ein monomeres EndoGI ein dimeres Molekül EndoG. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide homologen EndoGI-Domänen in der Lage sind EndoG allein zu inhibieren. Auf diese Weise ist EndoGI ideal an die dimere EndoG-Struktur angepasst. Dass beide EndoGI-Domänen separat nicht die gleiche Affinität für EndoG besitzen wie das vollständige EndoGI, bestätigt die Vermutung, dass je eine der Domänen ein EndoG-Monomer bindet.

Die Mutation des DRGH-Motivs im aktiven Zentrum der EndoG zu DAGA, führt zur kompletten Inaktivierung der katalytischen Aktivität. Selbst bei einem 5000-fachen molaren Überschuss war EndoG $\Delta$ N53 DAGA nicht in der Lage mit EndoG $\Delta$ N53 um EndoGI zu konkurrieren. Dass ein intaktes aktives Zentrum notwendig für die EndoGI-Bindung ist, zeigte die niedrige Affinität der EndoG $\Delta$ N55 N187K für EndoGI. Das dieser Position entsprechende Asparagin bindet in der homologen *Anabaena*-Nuklease das katalytische Magnesiumion. EndoG $\Delta$ N55 N187K besaß darüber hinaus nur eine stark verringerte enzymatische Aktivität, war aber in der Lage stabile Dimere zu bilden. Bei der Interaktion von EndoG mit EndoGI handelt es sich um eine sehr starke Bindung, denn der  $K_D$ -Wert des EndoG-EndoGI-Komplexes beträgt  $1,6 \cdot 10^{-13}$  M. Die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes konnte mit  $3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden. Damit besitzt der EndoG-EndoGI-Komplex eine Halbwertszeit von 3 Tagen und ist einer der stabilsten bisher beschriebenen Proteinkomplexe.

Die *Drosophila*-EndoG ist toxisch für Bakterienzellen, denn die Klonierung und Expression rekombinanter EndoG war nur in Gegenwart von EndoGI möglich. EndoGI ist in *Drosophila melanogaster* essentiell, denn Fliegen eines EndoGI-Deletionsstammes zeigten eine stark verringerte Lebensfähigkeit und die männlichen adulten Tiere waren steril. Diese Tatsache wird dadurch unterstützt, dass EndoGI in allen Entwicklungsphasen von *Drosophila melanogaster* vorhanden ist. Ob EndoG auch in *Drosophila melanogaster* an der apoptotischen DNA-Fragmentierung beteiligt ist, konnte nicht untersucht werden. Jedoch wurde gezeigt, dass EndoGI in apoptotischen Zellen den Zellkern verlässt.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass EndoGI mit niedriger Affinität 14-3-3 $\epsilon$  bindet. Welche Rolle diese Komplexbildung spielt, konnte nicht geklärt werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## A. Literatur

- [Ahrenkoltz *et al.*, 1994] I. Ahrenkoltz, M.G. Lorenz, & W. Wackernagel (1994) The extracellular nuclease of *Serratia marcescens*: Studies on the activity in vitro and effect on transforming DNA in a groundwater aquifer microcosm. *Arch. Microbiol.*, **161**, 176-183
- [Araki, 1903] T. Araki (1903) Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, **38**, 84-97
- [Ball *et al.*, 1992] Timothy K. Ball, Yousin Suh and Michael J. Benedik (1992). Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4971-4974
- [Beaufay *et al.*, 1959] H. Beaufay, D.S. Bendall, P. Baudhuin, C. de Duve (1959) Tissue fractionation studies. 12. Intracellular distribution of some dehydrogenases, alkaline deoxyribonuclease and iron in rat-liver tissue. *Biochem J.*, **73**, 623-8
- [Birnboim & Doly, 1976] Birnboim, H.C. and Doly, J. (1976) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523
- [Bolivar *et al.*, 1977] F. Bolivar, R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95-113
- [Bradford, 1976] Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- [Buckle *et al.*, 1994] Buckle, A. M., Schreiber, G. & Fersht, A. R. (1994). Protein-protein recognition: crystal structure analysis of a barnase barstar complex at 2.0-Ångstrom resolution. *Biochemistry*, **33**, 8878-8889
- [Bortner und Cidlows, 2002] C.D. Bortner and J.A. Cidlows (2002) Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ.*, **9**, 1307-1310
- [Büttner *et al.*, 2007] Sabrina Büttner, Tobias Eisenberg, Didac Carmona-Gutierrez, Doris Ruli,<sup>1</sup> Heide Knauer, Christoph Ruckenstuhl, Carola Sigrist, Silke Wissing, Manfred Kollroser, Kai-Uwe Fröhlich, Stephan Sigrist, and Frank Madeo (2007) Endonuclease G Regulates Budding Yeast Life and Death. *Mol. Cell*, **25**, 233-246

- [Campbell *et al.*, 1997] Janine K. Campbell, Rajendra Gurung, Susana Romero, Caroline J. Speed, Robert K. Andrews, Michael C. Berndt, and Christina A. Mitchell (1997) Activation of the 43 kDa Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase by 14-3-3 $\zeta$ . *Biochemistry*, **36**, 15363-15370
- [Candé *et al.*, 2002] Céline Candé, Francesco Cecconi, Philippe Dessen and Guido Kroemer (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci.*, **2115**, 4727-34
- [Chang & Rubin, 1997] Chang, H.C., Rubin, G.M. (1997) 14-3-3 epsilon positively regulates Ras-mediated signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 1132-1139
- [Chaudhria *et al.*, 2003] Maliha Chaudhria, Marie Scarabela and Alastair Aitken (2003) Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*, **300**, 679-85
- [Chen *et al.*, 1996] Po Chen, William Nordstrom, Bridget Gish, and John M. Abrams (1996) *grim*, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **10**, 1773-1782
- [Côté *et al.*, 1989] Jacques Côté, Jean Renauld and Adolfo Ruiz-Carillo (1989) Recognition of (dG)<sub>n</sub>·(dC)<sub>n</sub> Sequences by Endonuclease G. *Biol. Chem.*, **264**, 3301-3310
- [Côté & Ruiz-Carillo, 1993] Jacques Côté and Adolf Ruiz-Carillo (1993) Primers for Mitochondrial DNA Replication Generated by Endonuclease G. *Science*, **261**, 765-769
- [Cowan, 2001] James A. Cowan (2001) Chemical nucleases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 634-642
- [Curtis *et al.*, 1966] P.J. Curtis, Margery G. Burdon and R.M.S. Smellie (1966) The Purification from Rat Liver of a Nuclease Hydrolysing Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.*, **98**, 813-817
- [Cummings *et al.*, 1987] Oscar W. Cummings, Thomas C. King, Joseph A. Holden, and Robert L. Low (1987) Purification and Characterization of the Potent Endonuclease in Extracts of Bovine Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **5**, 2005-2015
- [Dake *et al.*, 1988] Eve Dake, Ted J. Hofmann, Sarah McIntire, Alan Hudson and H. Peter Zassenhaus (1988) Purification and Properties of the Major Nuclease from Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.*, **263**, 7691-7702
- [David *et al.*, 2006] K.K. David, M. Sasaki, S.W. Yu, T.M. Dawson and V.L. Dawson (2006) EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ.*, **13**, 1147-1155
- [Dougherty & Morrison, 2004] Michele K. Dougherty and Deborah K. Morrison (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *Cell*, **117**, 1875-1884

- [Eaves & Jeffries, 1963] George N. Eaves & Charles D. Jeffries (1963). Isolation and properties of an extracellular nuclease of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **85**, 273-278
- [Flick *et al.*, 1998] Karen E. Flick, Melissa S. Jurica, Raymond J. Monnat Jr. & Barry L. Stoddard (1998) DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-PpoI. *Nature*, **394**, 96-101
- [Franke *et al.*, 1999] Ingo Franke, Gregor Meiss, and Alfred Pingoud (1999) On the Advantage of Being a Dimer, a Case Study Using the Dimeric *Serratia* Nuclease and the Monomeric Nuclease from *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Biol Chem.*, **274**, 825-832
- [Fraser *et al.*, 1989] Murray J. Fraser, Zafer Hatahet, and Xitai Huang (1989) The Actions of *Neurospora* Endo-exonuclease on Double Strand DNAs. *J Biol. Chem.*, **264**, 13093-13101
- [Freed *et al.*, 1994] E. Freed, M. Symons, SG. Macdonald, F. McCormick, R. Ruggieri (1994) Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science*, **265**, 1713-1716
- [Friedhoff *et al.*, 1996a] Peter Friedhoff, Bettina Kolmes, Oleg Gimadutdinow, Wolfgang Wende, Kurt L. Krause and Alfred Pingoud (1996) Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis. *Nuc. Acids Res.*, **24**, 2632-2639
- [Friedhoff *et al.*, 1996b] Peter Friedhoff, Gregor Meiss, Bettina Kolmes, Uwe Pieper, Oleg Gimadutdinow, Claus Urbanke and Alfred Pingoud (1996) Kinetic analysis of the cleavage of natural and synthetic substrates by the *Serratia* nuclease. *Eur J Biochem.*, **242**, 572-580
- [Friedhoff *et al.*, 1999] Peter Friedhoff, Ingo Franke, Kurt L. Krause, Alfred Pingoud (1999) Cleavage experiments with deoxythymidine 3',5'-bis-(p-nitrophenyl phosphate) suggest that the homing endonuclease I-PpoI follows the same mechanism of phosphodiester bond hydrolysis as the non-specific *Serratia* nuclease. *FEBS Letters*, **443**, 209-214
- [Fu *et al.*, 2000] Haian Fu, Romesh R. Subramanian and Shane C. Masters (2000) 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **40**, 617-647
- [Galburt *et al.*, 1999] Eric A. Galburt, Brett Chevalier, Weiliang Tang, Melissa S. Jurica, Karen E. Flick, Raymond J. Monnat Jr. & Barry L. Stoddard (1999) A novel endonuclease mechanism directly visualized for I-Ppo. *Nat Struct Biol.*, **6**, 1096-1099

- [Gerschenson *et al.*, 1995] Mariana Gerschenson, kathryn L. Houmiel and Robert L. Low (1995) Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 88-97
- [Ghosh *et al.*, 2005] Mahua Ghosh, Gregor Meiss, Alfred Pingoud, Robert E. London and Lars C. Pedersen (2005) Structural insights into the mechanism of Nuclease A: a  $\beta\beta\alpha$  metal nuclease from *Anabaena*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 27990-27997.
- [Ghosh *et al.*, 2007] Mahua Ghosh, Gregor Meiss, Alfred Pingoud, Robert E. London and Lars C. Pedersen (2007) The Nuclease A-Inhibitor Complex Is Characterized by a Novel Metal Ion Bridge. *J. Biol. Chem.*, **282**, 5682-90.
- [Gravert & Griffin, 1996] D.J. Gravert, J.H. Griffin (1996) Specific DNA Cleavage by Manganese(III)Complexes. *Metal Ions in Biological Systems*, **33**, 515-536.
- [Haberland, 2001] Bettina Haberland (2001) Die extrazelluläre Endonuklease aus *Serratia marcescens*: Untersuchungen zur Substratbindung und zur Katalyse. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- [Ho *et al.*, 1998] Heng-Chien Ho, Pyng-Fang Shiau, Fon-Chang Liu, Jing-Gung Chung and Ling-Yun Chen (1998) Purification, characterization and complete amino acid sequence of nuclease C1 from *Cunninghamella echinulata var. echinulata*. *Eur. J. Biochem.*, **256**, 112-118
- [Ho & Liao, 1999] Heng-Chien Ho and Ta-Hsiu Liao (1999) Protein structure and gene cloning of *Syncephalastrum racemosum* nuclease. *Biochem. J.*, **339**, 261-267
- [Hsieh *et al.*, 1997] Shih-Yang Hsieh, Tzu-Ping Ko, Ming-Yu Tseng, Wen-yen Ku, Kin-Fu Chak and Hanna S.Yuan (1997) A novel role of ImmE7 in the autoregulatory expression of the ColE7 operon and identification of possible RNase active sites in the crystal structure of dimeric ImmE7. *EMBO*, **16**, 1444-1454
- [Huang *et al.*, 2002] Ke-Jung Huang, Boris V. Zemelman, and I. Robert Lehman (2002) Endonuclease G, a Candidate Human Enzyme for the Initiation of Genomic Inversion in Herpes Simplex Type 1 Virus. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21071-21079
- [Huang *et al.*, 2006] Ke-Jung Huang, Chia-Chi Ku, and I. Robert Lehman (2006) Endonuclease G: A role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *PNAS*, **103**, 8995-9000
- [Irish *et al.*, 1989] Vivian Irish, Ruth Lehmann & Michael Akam (1989) The *Drosophila* posterior-group gene nanos functions by repressing *hunchback* activity. *Nature*, **338**, 646-648

- [Irvine *et al.*, 2005] Ryan A. Irvine, Noritaka Adachi, Darryl K. Shibata, Geoffrey D. Cassell, Kefei Yu, Zarir E. Karanjawala, Chih-Lin Hsieh, and Michael R. Lieber (2005) Generation and Characterization of Endonuclease G Null Mice. *Mol Cell Biol.*, **25**, 294-302
- [Iwanoff *et al.*, 1903] Leonid Iwanoff (1903) Über die fermentative Zersetzung der Thymonucleinsäure durch Schimmelpilze. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, **39**, 31-43
- [Jones *et al.*, 1995] David H. Jones a, Steven Ley b, Alastair Aitken (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters*, **368**, 55-58
- [Kerwitz *et al.*, 2003] Kerwitz, Y., Kuhn, U., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwartz, E. and Wahle, E. (2003) Simulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.*, **22**, 3705-3714.
- [Kleanthous *et al.*, 1999] Colin Kleanthous, Ulrike C. Kühlmann, Ansgar J. Pommer, Neil Ferguson, Sheena E. Radford, Geoffrey R. Moore, Richard James & Andrew M. Hemmings (1999) Structural and mechanistic basis of immunity towards endonuclease colicins. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 243-252
- [Kleanthous & Walker, 2001] Colin Kleanthous and Daniel Walker (2001) Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends Biochem Sci.*, **26**, 624-31.
- [Ko *et al.*, 1999] Tzu-Ping Ko, Chen-Chung Liao, Wen-Yen Ku, Kin-Fu Chak and Hanna S Yuan (1999) The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein. *Structure*, **7**, 91-102
- [Kobe & Deisenhofer, 1996] Bostjan Kobe and Johann Deisenhofer (1996) Mechanism of Ribonuclease Inhibition by Ribonuclease Inhibitor Protein Based on the Crystal Structure of its Complex with Ribonuclease A. *J. Mol. Biol.*, **264**, 1028-1043
- [Körner & Wahle, 1997] Körner, C. and Wahle, E. (1997) Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10448-10456.
- [Kruger *et al.*, 1982] K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling & T.R. Cech (1982) Selfsplicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, **31**, 147-157.
- [Kühlmann *et al.*, 1999] Ulrike C. Kühlmann, Geoffrey R. Moore, Richard James, Colin Kleanthous, Andrew M. Hemmings (1999) Structural parsimony in endonuclease active sites: should the number of homing endonuclease families be redefined? *FEBS Letters*, **463**, 1-2

- [Kyhse-Andersen, 1984] j. Kyhse-Andersen (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys Methods.*, **3-4**, 203-209
- [Laemmli, 1970] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- [LaGrandeur & Parker, 1998] LaGrandeur, T.E. and Parker, R. (1998) Isolation and characterization of Dcp1, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.*, **17**, 1487-1496
- [Li et al., 1997] Wei Li, Caitriona A. Dennis, Geoffrey R. Moore, Richard James, and Colin Kleanthous (1997) Protein-Protein Interaction Specificity of Im9 for the Endonuclease Toxin Colicin E9 Defined by Homologue-scanning Mutagenesis. *J Biol. Chem.*, **272**, 22253-22258
- [Li et al., 1998] Wei Li, Stefan J. Hamill, Andrew M. Hemmings, Geoffrey R. Moore, Richard James, and Colin Kleanthous (1998) Dual Recognition and the Role of Specificity-Determining Residues in Colicin E9 DNase-Immunity Protein Interactions. *Biochemistry*, **37**, 11771-11779
- [Li et al., 2001] L. Li, X. Luo, X. Wang (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
- [Linn & Lehman, 1964a] Stuart Linn and I. R. Lehman (1964) An Endonuclease from *Neurospora crassa* Specific for Polynucleotides Lacking an Ordered Structure I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE ENZYME. *J Biol. Chem.*, **240**, 1287-1293
- [Linn & Lehman, 1964b] Stuart Linn and I. R. Lehman (1964) An Endonuclease from *Neurospora crassa* Specific for Polynucleotides Lacking an Ordered Structure II. STUDIES OF ENZYME SPECIFICITY. *J Biol. Chem.*, **240**, 1294-1304
- [Linn & Lehmann, 1966] Stuart Linn and I.R. Lehmann (1966) An Endonuclease from Mitochondria of *Neurospora crassa*. *J Biol. Chem.*, **241**, 2694-2699
- [Liu et al., 1997] Xuesong Liu, Hua Zou, Clive Slaughter, and Xiaodong Wang (1997) DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis. *Cell*, **98**, 175-184
- [Liu et al., 1998] Xuesong Liu, Peng Li, Piotr Widlak, Hua Zou, Xu Luo, William T. Garrard, and Xiaodong Wang (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 8461-8466

- [Liu *et al.*, 1999a] Xuesong Liu, Hua Zou, Piotr Widlak, William Garrard, and Xiaodong Wang (1999) Activation of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease). *J. Biol. Chem.*, **274**, 13836-13840
- [Liu *et al.*, 1999b] Q.Y. Liu, M. Ribecco, A. Pandey, P.R. Walker, & M Sikorska (1999) Apoptosis-related functional features of the DNaseI-like family of nucleases. *Ann. NY Acad. Sci.*, **887**, 60-76
- [Low, 2003] Robert L. Low (2003) Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion.*, **2**, 225-36
- [Lowe und Shellman, 1972] Lowe, M. J. & Shellman, J. A. (1972). Solvent effects on dinucleotide conformation. *J. Mol. Biol.*, **65**, 91-109.
- [Marston, 1986] Fiona A. O. Marston (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1-12
- [Maté & Kleanthous, 2004] María J. Maté and Colin Kleanthous (2004) Structure-based Analysis of the Metal-dependent Mechanism of H-N-H Endonucleases. *J. Biol. Chem.*, **279**, 34763-34769
- [Meiss *et al.*, 1995] Gregor Meiss, Peter Friedhoff, Meinhard Hahn, Oleg Gimadutdinow, and Alfred Pingoud (1995) Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease. *Biochemistry*, **34**, 11979-88
- [Meiss *et al.*, 1998] Gregor Meiss, Ingo Franke, Oleg Gimadutdinow, Claus Urbanke and Alfred Pingoud (1998) Biochemical characterization of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 non-specific nuclease NucA and its inhibitor NuiA. *Eur. J. Biochem.*, **251**, 924-934
- [Meiss *et al.*, 1999] Gregor Meiss, Frank-Ulrich Gast and Alfred M Pingoud (1999) The DNA/RNA Non-specific *Serratia* Nuclease Prefers Double-stranded A-form Nucleic Acids as Substrates. *J. Mol. Biol.*, **288**, 377-390
- [Meiss *et al.*, 2000] Gregor Meiss, Oleg Gimadutdinow, Bettina Haberland and Alfred Pingoud (2000) Mechanism of DNA/RNA-non-specific *Anabaena* sp. PCC 7120 Endonuclease NucA and its Inhibition by NuiA. *J. Mol. Biol.*, **297**, 521-534
- [Miller *et al.*, 1994] Mitchell D. Miller, Jack Tanner, Mary Alpaugh, Michael J. Benedik and Kurt L. Krause (1994) 2.1 Å structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Struc. Biol.*, **1**, 461-468
- [Miller & Krause, 1996] Mitchell D. Miller and Kurt L. Krause (1996) Identification of the *Serratia* endonuclease dimer: Structural basis and implications for catalysis. *Protein Sci.*, **5**, 24-33

- [Miller *et al.*, 1999] Mitchell D. Miller, Jiwen Cai and Kurt L. Krause (1999) The Active Site of *Serratia* Endonuclease Contains a Conserved Magnesium-Water Cluster. *J. Mol. Biol.*, **288**, 975-987
- [Mullis & Faloona, 1987] K.B. Mullis und F.A. Faloona (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335-50.
- [Muro-Pastor *et al.*, 1992] A.M. Muro-Pastor, E. Flores, A. Herrero and C.P. Wolk (1992) Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microb.*, **20**, 3021-3030
- [Muro-Pastor *et al.*, 1997] A.M. Muro-Pastor, E. Flores, A. Herrero & E. Flores (1997). The *nuiA* gene from *Anabaena* sp. encoding an inhibitor of the NucA sugar non-specific nuclease. *J. Mol. Biol.*, **268**, 589-598.
- [Muslin *et al.*, 1996] Anthony J. Muslin, J. William Tanner, Paul M. Allen, and Andrey S. Shaw (1996) Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897
- [Muslin & Xing, 2000] Anthony J. Muslin, Heming Xing (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular Signalling*, **12**, 703-709
- [Nesterenko *et al.*, 1995] Nesterenko, M.V., Tilley, M., & Upton, S.J. (1995) A metallo-dependent cystein proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios*, **83**, 77-88
- [Nestle & Roberts, 1969a] Marion Nestle and W. K. Roberts (1969) an Extracellular Nuclease from *Serratia marcescens* I. Purification and some properties of the enzyme. *Biol. Chem.*, **244**, 5213-5218
- [Nestle & Roberts, 1969b] Marion Nestle and W. K. Roberts (1969) an Extracellular Nuclease from *Serratia marcescens* II. Specificity of the enzyme. *Biol. Chem.*, **244**, 5219-5225
- [Ohsato *et al.*, 2002] Takashi Ohsato, Naotada Ishihara, Tsuyoshi Muta, Shuyo Umeda, Shogo Ikeda, Katsuyoshi Mihara, Naotaka Hamasaki and Dongchon Kang (2002) Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5765-5770
- [Osborne *et al.*, 1997] Michael J. Osborne, Russell Wallis, Kit-Yi Leung, Glyn Williams, Lu-Yun Lian, Richard James, Colin Kleanthous and Geoffrey R. Moore (1997) Identification of critical residues in the colicin E9 DNase binding region of the Im9 protein. *Biochem. J.*, **323**, 823-831

- [Paddon *et al.*, 1989] C. J. Paddon, N. Vasantha, and R. W. Hartley (1989) Translation and Processing of *Bacillus amyloliquefaciens* Extracellular RNase. *J Bacteriol.* 1989, **171**, 1185-7
- [Parrish *et al.*, 2001] Jay Parrish, Lily Li, Kristina Klotz, Duncan Ledwich, Xiaodong Wang and Ding Xue (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*, **412**, 90-94
- [Parrish & Xue, 2006] Jay Parrish and Ding Xue (2006) Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development. *Chromosoma*, **115**, 89-97
- [Perrin *et al.*, 1996] D.M. Perrin, A. Mazumder, D.S. Sigman (1996) Oxidative Chemical Nucleases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **52**, 123-151
- [Pröll, 2005] Stephanie Pröll, Chlorophyll-Komplexe mit Apo-Myoglobin und Albumin: Präparation, Stabilität und Photochemie, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- [Raff, 1998] Martin Raff (1998) Cell suicide for beginners. *Nature*, 396, 119-22
- [Rangarajan & Shankar, 2001] E. Srinivasan Rangarajan and Vepatu Shankar (2001) Sugar non-specific endonucleases. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 583-613
- [Ruiz-Carillo & Renaud, 1987] Adolfo Ruiz-Carillo and Jean Renaud (1987) Endonuclease G: a (dG)<sub>n</sub>·(dC)<sub>n</sub>-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J.*, **6**, 401-407
- [Saenger *et al.*, 1975] Saenger, W., Riecke, J. & Suck, D. (1975). A structural model for the polyadenylic acid single helix. *J. Mol. Biol.*, **93**, 529-534.
- [Sakahira *et al.*, 2001] Hideki Sakahira, Yasutaka Takemura and Shigekazu Nagata (2001) Enzymatic Active Site of Caspase-Activated DNase (CAD) and Its Inhibition by Inhibitor of CAD. *Arch Biochem Biophys.*, **388**, 91-99
- [Samejima & Earnshaw, 1998] Kumiko Samejima and William C. Earnshaw (1998) ICAD/DFF Regulator of Apoptotic Nuclease Is Nuclear. *Exp Cell Res.*, **243**, 453-459
- [Samejima *et al.*, 2001] Kumiko Samejima, Shigenobu Tone, and William C. Earnshaw (2005) CAD/DFF40 Nuclease Is Dispensable for High Molecular Weight DNA Cleavage and Stage I Chromatin Condensation in Apoptosis. *Nature Rev.*, **6**, 677-688
- [Samejima & Earnshaw, 2005] Kumiko Samejima and William C. Earnshaw (2001) Trashing the genome: the role of the nucleases during apoptosis. *J Biol. Chem.*, **276**, 45427-45432
- [Sanger *et al.*, 1977] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467

- [Sauter *et al.*, 2003] Claude Sauter, Jérôme Basquin and Dietrich Suck (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 4091-4098
- [Schäfer *et al.*, 2004] Patrick Schäfer, Sebastian R. Scholz, Oleg Gimaditdinow, Iwona A. Cymerman, Janusz M. Bujnicki, Adolf Ruiz-Carillo, Alfred Pingoud and Gregor Meiss (2004) Structural and Functional Characterization of Mitochondrial EndoG, a Sugar Non-specific Nuclease which Plays an Important Role During Apoptosis. *J. Mol. Biol.*, **338**, 217-228
- [Schäfer, 2007] Patrick Schäfer (2007) Die apoptotischen Endonukleasen Endonuklease G und Deoxyribonuklease II $\alpha$ , Heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- [Schneider, 1972] Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. Imogene Schneider (1972) *J. Embryol. exp. Morph.*, **27**, 353-365
- [Schreiber & Fersht, 1993] Gideon Schreiber and Alan R. Fersht (1993) Interaction of barnase with its polypeptide inhibitor barstar studied by protein engineering. *Biochemistry*, **32**, 5145-5150
- [Schubert] Dieter Schubert, Analytische Ultrazentrifugation, Biophysikalisches Praktikum Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- [Shlyapnikov *et al.*, 2000] S.V. Shlyapnikov, V.V. Lunin, M. Perbandt, K.M. Polyakov, V.Yu. Lunin, V.M. Levdikov, Ch. Betzel, & A.M. Mikhailov. (2000) Atomic structure of the *Serratia marcescens* endonuclease at 1.1 Å resolution and the enzyme reaction mechanism. *Acta Cryst.*, **56**, 567-572
- [Skoulakis *et al.*, 1996] Skoulakis, E.M.C. and R.L. Davis (1996) Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron*, **17**, 931-944.
- [Smoluchowski, 1917] M.V. Smoluchowski (1917) Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Zeitschrift für physikalische Chemie*, Band XCII, 129-168
- [Tang *et al.*, 1998] Shao Jun Tang, Ting-Chung Suen, Roderick R. McInnes, and Manuel Buchwald (1998) Association of the TLX-2 Homeodomain and 14-3-3 $\nu$  Signaling Proteins. *J Biol Chem.*, **273**, 25356-63

- [Temme, 2004] Temme, C. (2004) Die Deadenylierung von mRNAs durch den CCR4/NOT-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- [Tomkinson *et al.*, 1988] Alan E. Tomkinson, R. Thomas Bonk, and Stuart Linn (1988) Mitochondrial Endonuclease Activities Specific for Apurinic/Apyrimidinic Sites in DNA from Mouse Cells. *J Biol Chem.*, **263**, 12532-12537
- [van Loo *et al.*, 2001] G. van Loo<sup>1</sup>, P. Schotte, M. van Gurp, H. Demol, B. Hoorelbeke, K. Gevaert, I. Rodriguez, A. Ruiz-Carrillo, J. Vandekerckhove, W. Declercq, R. Beyaert and P. Vandenabeele (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.*, **8**, 1136-1142
- [Vaux & Korsmeyer, 1999] David L. Vaux and Stanley J. Korsmeyer (1999) Cell Death in Development. *Cell*, **96**, 245-254
- [Walker *et al.*, 1994] P. Roy Walker, Valerie M. Weaver, Boleslaw Lach, Julie LeBlanc and Marianna Sikorska (1994) Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res.*, **213**, 100-106
- [Walker *et al.*, 2004] Daniel Walker, Lorna Lancaster, Richard James and Colin Kleanthous (2004) Identification of the catalytic motif of the microbial ribosome inactivating cytotoxin colicin E3. *Protein Sci.*, **13**, 1603-1611
- [Wallis *et al.*, 1995] Russell Wallis, Geoffrey R. Moore, Richard James, and Colin Kleanthous (1995) Protein-protein interactions in colicin E9 DNase-immunity protein complexes. 1. Diffusion-controlled association and femtomolar binding for the cognate complex. *Biochemistry*, **34**, 13743-13750
- [Wang & Shakes, 1996] Wenfu Wang and Diane C. Shakes (1996) Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol.*, **43**, 384-98
- [Weißbach, 2005] Weißbach, R. (2005) Isolierung und Charakterisierung einer Nuklease und ihres Inhibitors in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- [Widlak *et al.*, 2001] Piotr Widlak, Lily Y. Li, Xiaodong Wang and William T. Garrard (2001) Action of Recombinant Human Apoptotic Endonuclease G on Naked DNA and Chromatin Substrates. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48404-48409
- [Widlak & Garrard, 2005] Piotr Widlak and William T. Garrard (2005) Discovery, Regulation, and Action of the Major Apoptotic Nucleases DFF40/CAD and Endonuclease G. *J. Cell. Biochem.*, **94**, 1078-1087

- [Wilson, 1991] Geoffrey G. Wilson (1991) Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2539-2566
- [Winkler *et al.*, 1998] David G. Winkler, Richard E. Cutler, Jr., Jonelle K. Drugan, Sharon Campbell, Deborah K. Morrison, and Jonathan A. Cooper (1998) Identification of Residues in the Cysteine-rich Domain of Raf-1 That Control Ras Binding and Raf-1 Activity. *J Biol. Chem.*, **34**, 21578-21584
- [Wolk *et al.*, 1992] A.M. Muro-Pastor, E. Flores, A. Herrero and C.P. Wolk (1992) Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microb.*, **6**, 3021-3030
- [Wyllie *et al.*, 1980] A.H. Wyllie, J.F.R. Kerr, & A.R. Currie (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-305
- [Yaffe *et al.*, 1997] Michael B. Yaffe, Katrin Rittinger, Stefano Volinia, Paul R. Caron, Alastair Aitken, Henrik Leffers, Steven J. Gamblin, Stephen J. Smerdon, and Lewis C. Cantley (1997) The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell*, **91**, 961-971
- [Yonemura *et al.*, 1983] Yonemura, K., Matsumoto, K. & Maeda, H. (1983). Isolation and characterization of nucleases from a clinical isolate of *Serratia marcescens* kums 3958. *J. Biochem.*, **93**, 1287-1295
- [Zhang *et al.*, 2003] Jianhua Zhang, Mei Dong, Lily Li, Yunxia Fan, Purnima Pathre, Jin Dong, Danwen Lou, James M. Wells, Danyvid Olivares-Villagómez, Luc Van Kaer, Xiaodong Wang, and Ming Xu (2003) Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *PNAS*, **100**, 15782-15787

## B. Anhang

### B.1. Sequenzen der verwendeten RNA- und DNA-Substrate

#### RNA-Transkript N<sub>65</sub>A<sub>45</sub>N<sub>63</sub>

5´ - GAATACAAGCTTGGGCTGCAGGTCAGGAGACACTTTCAATAAAGGCAAATGTTTTTATTTGT  
AAACCGTCTTCCCAGGGAATTCCGTA  
ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG - 3´

#### ssDNA-Oligonukleotid

5´ - GGTGGCAGTGGTGGCGTGCACGGTGGTCATCAGACCCTCGACGATCTCGAAGTTGTCATT - 3´

#### dsDNA-Konstrukt

5´ - AACTCTAAGCGGTGGATCACTCGGCTCATGGGTCGATGAAGAACGCAGCAAACACTGTGCGTCATCG  
TGTGAACTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACGCATATCGCAGTCCATGCTG - 3´

## B.2. Lebenslauf

### Zur Person

Name: Rebekka Weißbach  
Geburtsdatum, ort: 06.06.1981, Radebeul  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Harz 19  
06108 Halle  
Email: rebekka.weissbach@biochemtech.uni-halle.de

### Ausbildung

1988-1990 Erich-Weinert-Oberschule in Görlitz  
1990-2000 Gymnasium-Annenschule in Görlitz, Abschluss mit Abitur  
2000-2002 Grundstudium der Biochemie an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2002 Vordiplom in Biochemie  
2002-2004 Hauptstudium der Biochemie  
Schwerpunkte: medizinische Biochemie, Genetik und  
Immunologie  
2004 mündliche Diplomprüfungen  
2004-2005 Diplomarbeit zum Thema „Isolierung und Charakteri-  
sierung einer Nuklease und ihres Inhibitors in *Drosophila  
melanogaster*“ am Institut für Biochemie/Biotechnologie  
Abschluss als Diplom-Biochemiker  
2005-2008 Promotion zum Thema: „Identifizierung eines spezifischen  
Protein-Inhibitors für die Endonuklease G in *Drosophila  
melanogaster*“ am Institut für Biochemie/Biotechnologie  
in der Abteilung Allgemeine Biochemie an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
bei Prof. Dr. Elmar Wahle

### **B.3. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle/Saale, im November 2008

## B.4. Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Elmar Wahle für die engagierte wissenschaftliche Betreuung sowie das stete Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken, und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für die kleineren oder größeren Probleme hatte.

Weiterhin gilt mein Dank Claudia Temme, die den überwiegenden Anteil an den biologischen Untersuchungen zum EndoG-EndoGI-Komplex durchgeführt hat. Darüber hinaus danke ich ihr für die kritische Durchsicht meiner Dissertationsschrift.

Dr. Dr. Anton Meinhart vom MPI in Heidelberg danke ich sehr für die Bereitstellung der EndoG $\Delta$ N55 N187K-Variante, die viele Experimente erst ermöglichte.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. habil. Hauke Lilie, der mir jederzeit sein biophysikalisches Ohr und Auge geliehen hat und damit nicht selten den Fortgang meiner Arbeit katalysieren konnte. Neben zahlreichen konstruktiven Vorschlägen und Hilfestellung verdanke ich ihm auch die Untersuchungen des EndoG-EndoGI-Komplexes in der analytischen Ultrazentrifuge.

Herrn Dr. habil. Ralph Golbik danke ich für die Berechnungen zum theoretischen Teil der EndoG-EndoGI-Komplexbildung und -Dissoziation und die Geduld mit der er meine mangelnde Deutsch korrigierte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Sylke Meyer, Silke Otto, Sophie Siemroth, Maria Weihrauch und Ulrich Berge für die kritische Betrachtung des Manuskriptes während seiner Entstehungsphase und die unermüdlichen Versuche mein Deutsch aufzupolieren.

Frau Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Dr. Stefan König danke ich für die Bereitstellung eines Bürostuhls, der es mir überhaupt erst ermöglichte schmerzfrei die letzten Monate dieser Arbeit zu schreiben.

Herzlich danken möchte ich allen Mitgliedern der Wahle-Arbeitsgruppe in Halle, besonders aber Bodo Moritz, Silke Otto, Heike Berndt und Susan Weinlich, für die Diskussionen fachlicher und weniger fachlicher Art und ihre stete Hilfsbereitschaft. Conny Herrmann möchte ich für ihre große Hilfe und Geduld bei der Beschaffung

von Literatur danken.

Mein letzter und ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester, die mich in jeder Form und zu jeder Zeit mit allen Mitteln unterstützt, motiviert und Anteil an meiner Arbeit genommen haben.