

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Röntgenstrukturanalyse der Caspase-3/XIAP-BIR2, Caspase-7/XIAP-BIR2 Komplexe und der Procaspase-7

Stefan Riedl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

3. apl. Prof. Dr. W. Bode,

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 22.05.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.06.2002 angenommen.

meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 1999 bis April 2002 am Burnham Institute in La Jolla in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Salvesen und in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für dessen Unterstützung und die Ermöglichung diese Arbeit durchzuführen. Sein Interesse am Fortgang der wissenschaftlichen Arbeit und die große wissenschaftliche Freiheit bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit erlaubten die Bearbeitung dieses außerordentlich aufregenden Themengebiets.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode möchte ich mich für die Überlassung dieses außerordentlich aktuellen Themas bedanken. Auch möchte ich mich für die vielen stimulierenden Diskussionen, wertvolle Anregungen und Hilfe, sowie die große Unterstützung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Guy Salvesen für die Einführung in das Themengebiet der Apoptose und der Caspasen. Auch für die ständige Unterstützung, die vielen Anregungen, sein Vertrauen, die große wissenschaftliche Freiheit und seine Hilfe in vielen Angelegenheiten möchte ich mich bedanken.

Für seine unermüdliche Hilfe und seinen Einsatz möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Pablo Fuentes-Prior bedanken. Vielen Dank für die vielen Antworten, Diskussionen und die große Unterstützung!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des *Salvesen Labs* am Burnham Institute, besonders bei *'the amazing'* Scott Snipas für all die Hilfe und die gute Atmosphäre. Auch den Mitgliedern des *Liddington Labs* am Burnham Institute und Prof. Dr. Robert Liddington möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung meinen Dank aussprechen. Besonders hervorheben möchte ich hier Robert Schwarzenbacher für seine unermeßliche Hilfe und Freundschaft.

Am Max Plank Institut für Biochemie danke ich auch der Arbeitsgruppe von Dr. Jenne für die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Renate Rüller, Frau Monika Bumann, Herrn Werner Dersch und Herrn Ottmar Paul für die immer freundliche Hilfe und unverdrossene Unterstützung bei der Überwindung diverser technischer und bürokratischer Hindernisse.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Abt. Strukturforschung, insbesondere Martin Augustin, Werner Atzenhofer, Gerd Bader, Michael Blässe, Hans Brandstetter, Marianne Braun, Constanze Breithaupt, Lorenz Chatwell, Tim Clausen, Mireia Comellas, Oliver Einsle, Michael Engel, Eva Estebanez, Rainer Friedrich, Iris Fritze, Peter Goettig, Daniela Jozic, Norman Kairies, Jens Kaiser, Reiner Kiefersauer, Stephan Krapp, Klaus Maskos, John Richardson, Kathrin Sichler, Peter Sondermann, Stefan Steinbacher, Manuel Than, Markus Wahl, Kerstin Wendt, Rasso Willkom möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Zimmerkollegen Stefanie Bauer, Stefan Gerhardt, Rupert Lang und Holger Dobbek für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Freundschaft bedanken.

Ein liebevoller Dank gebührt meinen Eltern und Geschwistern für ihr Vertrauen und den grenzenlosen Rückhalt.

Finally, I owe my dearest thanks to Denise L. Hanway for her great support and endless patience.

1	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
2	<u>EINLEITUNG</u>	4
2.1	<u>Apoptose</u>	4
2.2	<u>Caspasen – Zentrale Proteasen in der Auslösung und Ausführung des apoptotischen Programms</u>	5
2.2.1	<u>Sequentielle Strukturierung humaner Caspasen</u>	7
2.2.2	<u>Struktur aktiver Inhibitor-gebundener Caspasen</u>	9
2.3	<u>Wege der direkten Regulation der Caspaseaktivität: Inhibition und Aktivierung von Caspasen</u>	12
2.3.1	<u>Aktivierung von Caspasen – Verschiedene Caspasen zeigen unterschiedliche Zymogenitäten - Was ist der Aktivierungsmechanismus der Caspasen?</u>	13
2.3.2	<u>Inhibition von Caspasen – Die IAPs</u>	14
2.3.2.1	<u>XIAP - einer der effektivsten Caspase Inhibitoren unter den IAPs</u>	15
2.3.2.2	<u>BIR2-Struktur und die Inhibition von Caspase-3 und -7 durch BIR2</u>	16
2.3.2.3	<u>Smac – ein Antagonist der Caspase Inhibition durch IAPs</u>	17
2.4	<u>Röntgenstrukturanalyse von Proteinen</u>	20
2.4.1	<u>Überblick</u>	20
2.4.2	<u>Kristalle</u>	20
2.4.3	<u>Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen</u>	21
2.4.4	<u>Berechnung der Elektronendichte</u>	24
2.4.5	<u>Lösung des Phasenproblems</u>	24
2.4.6	<u>Isomorpher Ersatz</u>	25
2.4.7	<u>Multiple Anomale Dispersion</u>	26
2.4.8	<u>Molekularer Ersatz</u>	28
2.5	<u>Ziele der Arbeit</u>	29
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	30
3.1	<u>Material</u>	30
3.1.1	<u>Chemikalien</u>	30
3.1.2	<u>Geräte</u>	30
3.1.3	<u>Säulenmaterial</u>	30
3.1.4	<u>Materialien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten</u>	31
3.1.4.1	<u>Bakterien</u>	31
3.1.4.2	<u>Vektoren</u>	31
3.1.4.3	<u>Enzyme und Kits</u>	32
3.2	<u>Mikrobiologische Methoden</u>	32
3.2.1	<u>Bakterien Flüssigkulturen</u>	32
3.2.2	<u>Bakterien Plattenkulturen</u>	33
3.2.3	<u>Transformation von Fremd-DNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen</u>	33
3.2.4	<u>Heterologe Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i></u>	33
3.2.5	<u>Herstellung von <i>E. coli</i> Rohextrakten</u>	34
3.3	<u>Proteinchemische Methoden</u>	34
3.3.1	<u>Konzentrationsbestimmung der Caspasen und BIR2-Inhibitoren</u>	34

3.3.2	<u>Reinigung rekombinanter Proteine</u>	35
3.3.3	<u>Proteolytische Spaltung inaktiver Caspase-Mutanten</u>	36
3.3.4	<u>Bildung der Caspase/BIR2 Komplexe</u>	36
3.3.5	<u>Gelfiltration</u>	37
3.3.6	<u>Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</u>	37
3.3.7	<u>Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele</u>	38
3.3.8	<u>Transfer von Proteinen durch ElektrobloTTing</u>	39
3.3.9	<u>N-terminale Sequenzierung nach <i>EDMAN</i></u>	39
3.3.10	<u>Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Caspase-3/7 mit BIR2/GST-BIR2</u>	40
3.3.11	<u>Dynamische Lichtstreuung</u>	41
3.4	<u>Kristallographische Methoden</u>	41
3.4.1	<u>Kristallisation</u>	41
3.4.2	<u>Datensammlung und Datenreduktion</u>	43
3.4.3	<u>Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung</u>	43
3.4.4	<u>Analyse von Atommodellen</u>	44
3.4.5	<u>Graphische Darstellungen</u>	44
4	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	46
4.1	<u>Struktur des Caspase-3/BIR2 Komplexes</u>	46
4.1.1	<u>Expression, Kristallisation und Strukturlösung des Caspase-3/BIR2 Komplexes</u>	46
4.1.2	<u>Gesamtstruktur des Caspase-3/BIR2 Komplexes</u>	50
4.1.3	<u>Bindung des Inhibitors</u>	52
4.1.3.1	<u>Bindung der N-terminalen Helix-Region von BIR2 an Caspase-3</u>	53
4.1.3.2	<u>Bindung der <i>Linker</i>-Reste Val-147 bis Arg-156 und der BIR2-Domäne</u>	54
4.1.4	<u>Mechanismus der Inhibition – Vergleich mit peptidischen Inhibitoren</u>	56
4.1.5	<u>Kristallkontakte</u>	58
4.2	<u>Struktur des Caspase-7/BIR2 Komplexes - Vergleich mit dem Caspase-3/BIR2 Komplex</u>	62
4.2.1	<u>Expression, Kristallisation, Strukturlösung des Caspase-7/BIR2 Komplexes</u>	62
4.2.2	<u>Gesamtstruktur des Komplexes</u>	64
4.2.3	<u>Bindung von BIR2 an Caspase-7 - Spezifität von BIR2 für Caspase-3/-7</u>	66
4.3	<u>Inhibition von Caspasen durch IAPs</u>	67
4.3.1	<u>Rolle der <i>Linker</i>-Region und der BIR-Domäne</u>	67
4.3.2	<u>Rolle der BIR-Domäne in der Regulation der Caspase Inhibition</u>	69
4.3.3	<u>Hypothetisches Modell der Inhibition von Caspase-3/7 und -9 durch XIAP</u>	70
4.4	<u>Aktivierung von Caspasen – Kristallstruktur des Caspase-7 Zymogens</u>	74
4.4.1	<u>Expression, Kristallisation, Strukturlösung des Caspase-7 Zymogens</u>	74
4.4.2	<u>Gesamtstruktur von Procaspase-7</u>	77
4.4.3	<u>Unterschiede des Caspase-7 Zymogens zur aktiven Caspase</u>	79
4.4.4	<u>Die Substratbindungstaschen fehlen in Procaspase-7 – Cys/Ala-285 zeigt eine andere Konformation</u>	82
4.4.5	<u>Inaktivität der Procaspase</u>	84
4.4.6	<u>Die <i>Linker</i> bewirken die inaktive Konformation des 330/340-<i>Loops</i></u>	85
4.4.7	<u>Allgemeiner Mechanismus der Caspase Aktivierung – Erklärung der verschiedenen Caspase-Zymogenitäten</u>	88
5	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	92

6 **LITERATUR** **95**

1 Zusammenfassung

- Apoptose ist essentiell für die Homöostase vielzelliger Organismen. Caspasen sind zentrale Cysteinproteasen in der Initiation und Ausführung des apoptotischen Programms.
- Caspasen werden zunächst als Zymogene (Procaspasen) translatiert. Die Aktivität von Caspasen wird durch die sequentielle Aktivierung der Procaspasen und durch die Inhibition aktiver Caspasen durch die IAPs reguliert. Einen der effektivsten Caspase-3/-7 und -9 Inhibitoren stellt XIAP dar. XIAP besteht aus drei BIR-Domänen und einer RING-Domäne, die über *Linker*-Sequenzen verbunden sind. Für die Fähigkeit die *executioner* Caspasen-3 und -7 zu inhibieren, wird ein Teil der BIR1-BIR2 *Linker*-Sequenz (im Folgenden als *Linker* bezeichnet) und die zweite BIR-Domäne benötigt. Dieses Konstrukt bestehend aus *Linker* und zweiter BIR-Domäne wird im Folgenden als BIR2 bezeichnet.
- Die Kristallstrukturen von Caspase-3 und -7 im Komplex mit der BIR2 Region von XIAP erklären den Mechanismus der Inhibition. Die N-terminale Helix des *Linkers* blockiert das katalytische Zentrum der Caspasen. Der übrige Teil des *Linkers* verläuft entgegen der Substratbindungsrichtung durch die Substratbindungsrinne. Die eigentliche BIR-Domäne kommt an sekundärer Stelle im Caspase-3/BIR2 Komplex zu liegen bzw. ist im Caspase-7/BIR2 Komplex nicht in der Elektronendichte sichtbar. Die Funktion der BIR-Domäne bei der Inhibition von Caspase-3/-7 liegt nicht in der direkten Blockade des katalytischen Zentrums, sondern vielmehr in der Stabilisation und Regulation der Inhibition durch den *Linker*.
- Die Komplexstrukturen von Caspase-3/BIR2 und Caspase-7/BIR2 erklären die zuvor gefundene Bedeutung der Reste Leu-141 und Asp-148 von BIR2 auf atomarer Ebene. Leu-141 liegt im Zentrum eines hydrophoben Netzwerks, das die N-terminale Helix des *Linkers* über dem katalytischen Zentrum plaziert. Die katalytische Aktivität der Caspasen ist damit sterisch blockiert, obwohl kein Rest von BIR2 dem katalytischen Cystein der Caspasen näher als 5.8 Å

kommt. Asp-148 ist in ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen einbezogen und ist daher für die Positionierung des *Linkers* in der Substratbindungsrinne der Caspase notwendig. Im Caspase-3/BIR2 Komplex geht Asp-148 eine verborgene Salzbrücke zu Arg-233 ein, so daß die Bindung der BIR-Domäne an die Caspase unterstützt wird.

- Die BIR-Domäne geht verschiedene Kristallkontakte im Caspase-3/BIR2 Komplex ein, die auf biologische Funktionen von BIR-Domänen hinweisen könnten. Von besonderem Interesse ist hierbei die Bindung des N-Terminus der kleinen Untereinheit von Caspase-3 in die Smac-Bindungstasche der BIR2-Domäne des kristallographischen Nachbarn.
- Die Struktur von Procaspase-7 weist keine Veränderung gegenüber dem typischen Caspase-Grundgerüst aktiver Caspasen auf. Die Unterschiede liegen im wesentlichen in zwei *Loop*-Bereichen und in der *Linker*-Region zwischen großer und kleiner Subdomäne.
- Die Inaktivität der Procaspase ist in der völligen Entfaltung der Substratbindungstaschen begründet, die aus einer Verschiebung der *Loop*-Region um die Reste Ser-332 bis Gly-346 (330/340-*Loop*) resultiert. Des Weiteren ist in der Procaspase die Ausbildung eines für die katalytische Aktivität der Caspasen wichtigen „Strang-Bündels“, das in aktiven (Inhibitor-gebundenen) Caspasen die terminalen Regionen der gespaltenen *Linker* beinhaltet, nicht möglich.
- Die ungespaltenen *Linker*-Regionen der Procaspase sind größtenteils flexibel und besetzen den für Caspasen typischen zentralen Hohlraum zwischen den beiden Caspase-Monomeren. Dies führt letztendlich zur Verschiebung des 330/340-Loops und der damit verbundenen Entfaltung der Substratbindungstaschen.
- Der Vergleich dieser Strukturelemente für verschiedene Caspasen läßt auf einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus schließen und liefert eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Aktivierungsverhalten verschiedener Caspase-Klassen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., and Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP, *Cell* *104*, 791-800.

Riedl, S. J./ Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G. S., and Bode, W. (2001). Structural basis for the activation of human procaspase-7, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14790-5.

2 Einleitung

2.1 Apoptose

Apoptose ist ein zellulärer Mechanismus, der essentiell für die Regulation der Zellzahl eines Organismus ist. Die Auslösung des apoptotischen Programms hat einen kontrollierten Selbstzerstörungsprozeß der betroffenen Zellen zur Folge. Der Begriff Apoptose wurde bereits vor 30 Jahren verwendet, um eine bestimmte Zellmorphologie, die sich deutlich vom nekrotischen Zelltod unterschied, zu beschreiben (Kerr et al., 1972; Warner, 1972).

Apoptose ist durch mehrere äußere Merkmale gekennzeichnet. Die Zellen schrumpfen merklich und zeigen blasenartige Ausstülpungen in der Zellmembran bis hin zur Bildung von „*apoptotic bodies*“ (Kerr et al., 1972; Majno and Joris, 1995; Razvi and Welsh, 1995; Weedon et al., 1979; Wyllie et al., 1980). Als Beispiel sind in Abbildung 2.1-1 apoptotische T-Zellen im Thymus dargestellt.

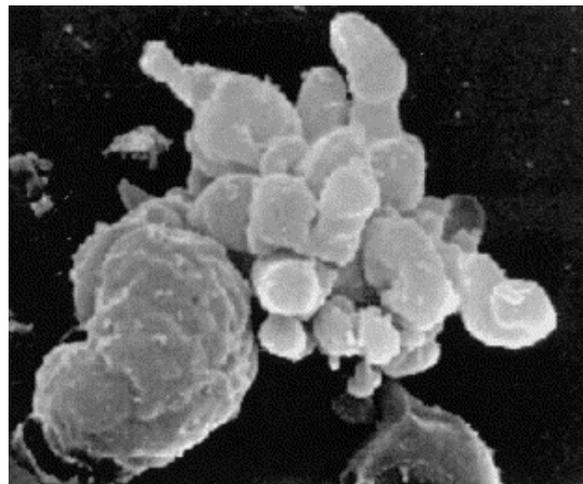


Abbildung 2.1-1 *Apoptotische T-Zellen im Thymus*. Gezeigt ist der apoptotische Phänotyp der Zellen mit den charakteristischen Ausstülpungen (aus Zimmermann et al., 2001).

Im Zuge des apoptotischen Programms kondensiert das im Zellkern befindliche Chromatin und wird kontrolliert fragmentiert

(„*laddering*“). Der Zellkern löst sich auf (Enari et al., 1998; Mukae et al., 1998; Sakahira et al., 1998). In der Endphase der Apoptose werden die „*apoptotic bodies*“ schließlich von Makrophagen oder anderen phagozytierenden Zellen aufgenommen (Bangs et al., 2000; Chimini and Chavrier, 2000; Fadok and Chimini, 2001; Messmer and Pfeilschifter, 2000). Ziel dieses geordneten Prozesses ist die „leise“ Eliminierung unerwünschter Zellen. Dies können z.B. virusinfizierte Zellen oder Zellen mit beschädigter DNA sein. Apoptose spielt des weiteren eine wichtige Rolle bei der

Reifung der T-Zellen im Thymus (Abbildung 2.1-1). Aber auch „normale“ Zellen werden z.B. in der Embryogenese durch Apoptose eliminiert. Es ist daher nicht verwunderlich, daß abnormale Apoptose direkt mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern verbunden ist. Fehlende Apoptose während der Entwicklung führt zu abnormen Phänotypen des Organismus. Um nur einige Beispiele zu nennen, kann ein Ausbleiben des apoptotischen Programms im Zuge einer Virusinfektion oder bei einer DNA Schädigung zu einer fehlerhaften Immunantwort oder zur unkontrollierten Proliferation der betreffenden Zellen (Krebs) führen. Umgekehrt wird ein Übermaß an Apoptose mit Krankheiten wie AIDS, multipler Sklerose und kardio-vaskulären Störungen in Zusammenhang gebracht (Gill et al., 2002; Krammer, 2000; Nerheim et al., 2001; Reed, 1999). Daher haben derzeit apoptotische Faktoren und das Verständnis ihrer Funktion auf struktureller Ebene eine große Bedeutung als Ansatzpunkte für die Entwicklung neuartiger Medikamente (Nicholson, 2000; Reed, 2001).

Zusammenfassend sei gesagt: „*A little death is good for you*“ (Guy S. Salvesen, unzählige Präsentationen); mit dem „deutsch“ anmutenden Zusatz: Soweit alles seine Ordnung hat.

2.2 Caspasen – Zentrale Proteasen in der Auslösung und Ausführung des apoptotischen Programms

Diese Ordnung ist notwendig, um von der Entscheidung eine Zelle zu eliminieren, oder vielmehr die Zelle zur Eigenelimination zu bewegen, bis hin zur kontrollierten „Entsorgung“ der Zellfragmente sicher zustellen, daß dieser Prozeß in eine Richtung abläuft. Ansonsten könnten „halbtote“ Zellen entstehen, die z.B. die Gefahr der unkontrollierten Proliferation in sich bergen. Analog zu anderen Prozessen, die eine irreversible Signalleitung benötigen, wie z.B. der Blutgerinnung (Bode and Huber, 2000; Stubbs and Bode, 1994) spielt in der Auslösung und Ausführung des apoptotischen Programms eine Kaskade aus Proteasen, den Caspasen, eine Schlüsselrolle.

Caspasen sind Cysteinproteasen, die der Familie C14 des Clans CD angehören (Barrett and Rawlings, 2001). Ihr Name leitet sich von deren Präferenz für die

Spaltung nach einem Aspartatrest in der Position P1 ab (*cysteine-dependent aspartate specific protease*, (Alnemri et al., 1996). Sie werden zunächst als Zymogene (Procaspasen) translatiert und erfahren im Zuge eines apoptotischen Signals eine Aktivierungsspaltung.

Abbildung 2.2-1 zeigt ein stark vereinfachtes Schema der apoptotischen Signalwege und macht die zentrale Rolle der Caspasen deutlich. Das apoptotische Programm kann über zwei Hauptwege eingeleitet werden. Im so genannten extrinsischen Signalweg wird nach Bindung eines *death ligands* an einen *death receptor* die apikale Caspase-8 aktiviert. Im intrinsischen Signalweg kommt es aufgrund eines Stresssignals zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und zur Bildung eines multimeren Komplexes aus Cytochrom c, Apaf-1 (*apoptosis protease activator factor-1*), dATP/ATP und (Pro-) Caspase-9, was zur Aktivierung der Caspase führt. Die apikalen Caspasen-8 und -9, die als *initiator-Caspasen* klassifiziert werden, aktivieren dann *executioner-Caspasen*, wie Caspase-3 und -7. Diese spalten dann spezifisch eine Anzahl von Proteinsubstraten, was dann letztendlich den apoptotischen Phänotyp der Zelle zur Folge hat (Salvesen and Dixit, 1997; Thornberry and Lazebnik, 1998).

Dies ist jedoch nur ein stark vereinfachter Überblick. Die Regulation der Apoptose ist sehr komplex und häufig abhängig vom untersuchten Zelltyp. Beispielhaft hierfür sind in Abbildung 2.2-1 einige Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bid, Bcl-2 und Bax) aufgeführt, die sowohl pro-, als auch antiapoptotische Funktion in der Regulation des intrinsischen Signalwegs zeigen. Eine Verbindung beider Signalwege kann durch das Regulatorprotein Bid hergestellt werden, das sowohl ein Caspase-8 Substrat, als auch einen Regulator des intrinsischen Signalwegs darstellt. Die Aktivierung der *executioner-Caspasen* kann auch direkt durch Granzym B im Zuge einer Immunreaktion erfolgen. Sowohl *initiator-Caspasen* als auch *executioner-Caspasen* können sich autokatalytisch aktivieren. Zusätzlich wirken noch andere Caspasen (siehe 2.2.1), die IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*, siehe 2.3.2) und der kürzlich identifizierte Faktor Smac/DIABLO (siehe 2.3.2.3) im apoptotischen Programm mit, worauf in den folgenden Abschnitten eingegangen wird. Für einen umfassenden Überblick der verschiedenen Aspekte von Apoptose sei beispielhaft auf eine Serie

von Übersichtsartikel verwiesen (Hengartner, 2000; Krammer, 2000; Meier et al., 2000; Nicholson, 2000; Rich et al., 2000; Yuan and Yankner, 2000).

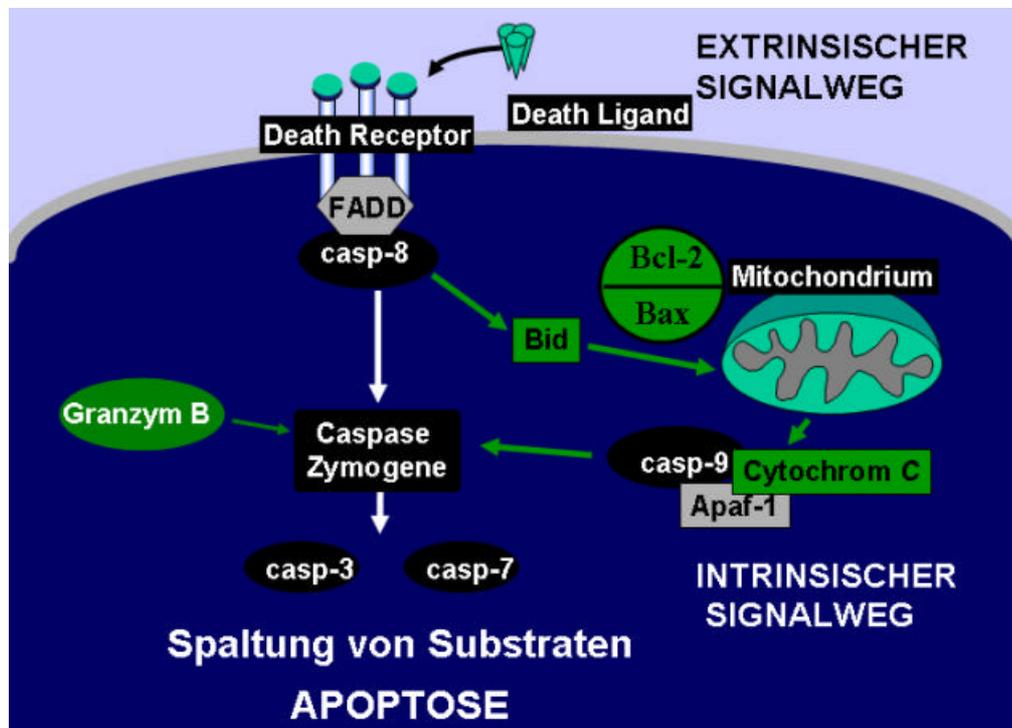


Abbildung 2.2-1 *Rolle der Caspasen in den apoptotischen Signalwegen*. Stark vereinfachtes Schema der Initiation und Ausführung des apoptotischen Programms. Die Aktivierung der Caspasen und damit die Auslösung des apoptotischen Programms in der Zelle können auf zweierlei Wegen erfolgen. Im so genannten extrinsischen Signalweg kommt es infolge der Bindung eines *death ligands* an einen *death receptor* zur Aktivierung der apikalen Caspase-8. Im intrinsischen Signalweg hingegen wird die apikale Caspase-9 durch die Bildung eines Multikomponenten Komplexes aktiviert. Dieses so genannte Apoptosom besteht aus Caspase-9, Apaf-1, dATP/ATP und Cytochrom c, das in Folge eines Stresssignals aus dem Mitochondrium freigesetzt wurde. Pro- und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bcl-2 und Bax) regulieren diese Stressantwort. Durch das Bcl-2 Familienmitglied Bid, das ein Caspase-8 Substrat darstellt, kommt es zu einer Verknüpfung beider Signalwege. Die beiden apikalen Caspasen-8 und -9 werden als *initiator-Caspasen* bezeichnet. Die aktivierten *initiator-Caspasen* spalten und aktivieren dann die *executioner-Caspasen*, deren prominenteste Vertreter, Caspase-3 und -7 hier dargestellt sind. Dies führt zur spezifischen Spaltung verschiedener Substrate und letztendlich zum apoptotischen Phänotyp der Zelle. Die *executioner-Caspasen* können auch im Zuge einer Immunreaktion durch die Serinprotease Granzym B aktiviert werden.

2.2.1 Sequentielle Strukturierung humaner Caspasen

Caspasen werden nach ihrer Primärstruktur bzw. Domänenanordnung und Funktion in drei Klassen eingeteilt, was schematisch in Abbildung 2.2-2 dargestellt ist. Die

Caspasen-4 und -5 zeigen Homologie zur Caspase-1. Diese drei Caspasen sind nicht direkt in Apoptose involviert, sondern werden zu den inflammatorischen Caspasen gerechnet, die an der Cytokin Aktivierung beteiligt sind (Chang and Yang, 2000; Fadeel et al., 2000). Die anderen beiden Klassen umfassen die *initiator* und *executioner-Caspasen*, deren Vertreter Caspase-8 und -9 bzw. Caspase-3 und -7 bereits in Abschnitt 2.2 vorgestellt wurden. Zur Klasse der *executioner-Caspasen* gehört zusätzlich Caspase-6. Die Caspasen-2 und -10 werden aufgrund ihrer Homologie zu den *initiator-Caspasen* gerechnet, obwohl deren exakte Funktionen noch nicht vollständig erfaßt sind. Die Klassifizierung von Caspase-14 ist derzeit noch unklar.

Abbildung 2.2-2 zeigt den Aufbau der Caspasen im schematischen Überblick. Alle Caspasen besitzen ein N-Peptid, das im Zuge der Reifung abgespalten wird (nicht bei Caspase-9 und Caspase-14). Dieser N-terminale Abschnitt kann Adaptoromänen, wie DEDs (*death effector domains*) oder CARDs (*Caspase activator recruitment domains*) enthalten oder, wie bei den *executioner-Caspasen*, nur aus einem relativ kurzen Sequenzabschnitt bestehen. Im Falle der inflammatorischen und *initiator-Caspasen* liegt die Funktion des N-Peptids in erster Linie in der Bindung der Caspase zu anderen Faktoren. Die DEDs der Caspase-8 sind z.B. für die Bindung an die *death receptors* nötig. Welche Rolle die kurzen N-Peptide der *executioner-Caspasen* spielen ist derzeit noch unklar. Erste experimentelle Ergebnisse scheinen zumindest für Caspase-7 auf eine Funktion in der subzellulären Lokalisation der Caspase hinzuweisen (Yaoita, 2002).

Das N-Peptid ist gefolgt von der eigentlichen Proteasedomäne. Diese weist ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa auf. Während die Abspaltung des N-Peptids nur eine geringe (Yamin et al., 1996) oder keine Auswirkung auf die Aktivität der Caspasen hat (Zhou and Salvesen, 1997), findet die eigentliche Aktivierungsspaltung in der katalytischen Domäne statt und führt zur Bildung einer großen (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) (Stennicke and Salvesen, 1998).

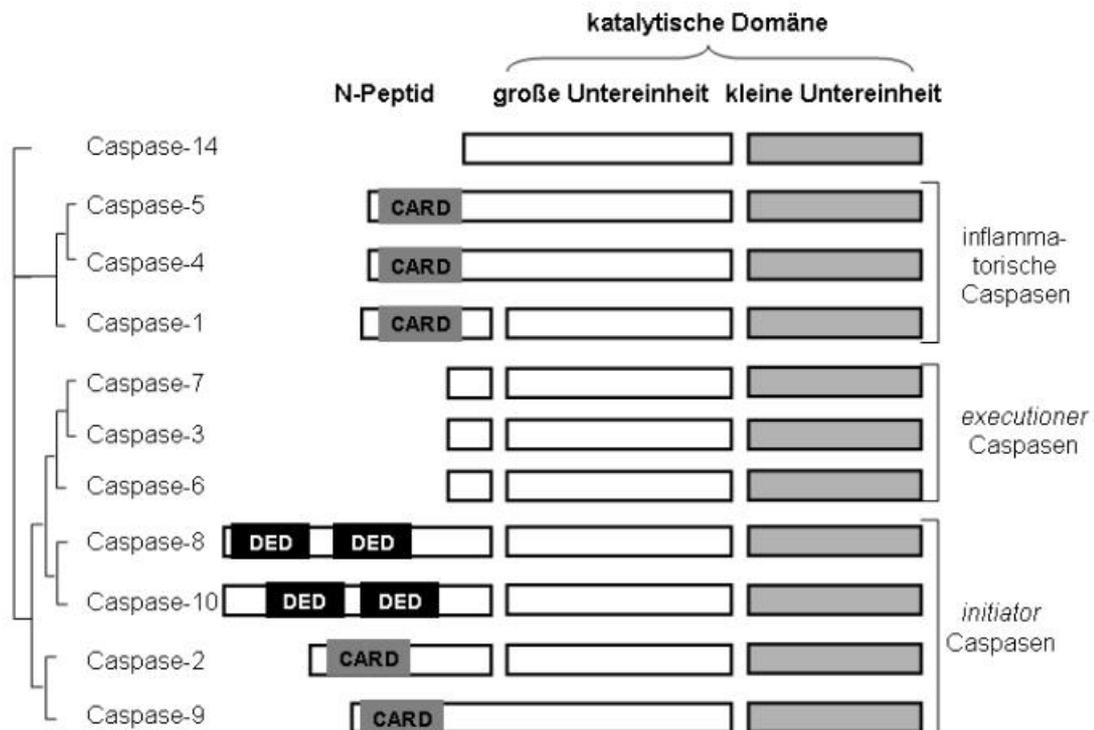


Abbildung 2.2-2 *Humane Caspasen*. Gezeigt ist die Domänenstruktur und Verwandtschaft bzw. Klassifizierung humaner Caspasen. Die sequentielle Verwandtschaft ist durch Klammern (links) dargestellt. Die funktionelle Einteilung in inflammatorische, *executioner* und *initiator-Caspasen* ist rechts im Bild gekennzeichnet. Caspasen bestehen aus einem „N-Peptid“, dessen Länge von 22 bis über 200 Aminosäuren zwischen den Caspasen variiert und der eigentlichen katalytischen Domäne, die in der Regel ca. 250 Reste umfaßt. Das N-Peptid kann aus mehreren Adaptordomänen, wie DEDs (*death effector domains*) oder CARDS (*caspase activator recruitment domains*) bestehen oder, wie im Falle der *executioner-Caspasen*, nur eine Länge von wenigen Aminosäuren aufweisen. Im Zuge der Zymogenprozessierung kommt es zur Abspaltung des N-Peptids (außer bei Caspase-9 und -14) und zur eigentlichen Aktivierungsspaltung in der katalytischen Domäne, so daß eine große und kleine Untereinheit entstehen (verändert nach (Shi, 2002; Stennicke and Salvesen, 1998; Zimmermann et al., 2001)).

2.2.2 Struktur aktiver Inhibitor-gebundener Caspasen

Die ersten Kristallstrukturen von prozessierter, inhibierter Caspase-1 (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994) und später von Caspase-3 (Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996), Caspase-7 (Wei et al., 2000) und Caspase-8 (Blanchard et al., 1999; Watt et al., 1999) zeigen, daß diese Cysteinproteasen aus einem Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten bestehen. Wie in Abbildung 2.2-3 am Beispiel aktiver Caspase-7 (Wei et al., 2000) im Komplex mit dem peptidischen

Inhibitor Ac-DEVD-CHO (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd) leicht zu erkennen ist, kann dieses Heterotetramer auch als Dimer zweier katalytischer Einheiten gesehen werden, die sich jeweils aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammensetzen, und über eine zweifache Symmetrieachse aufeinander abgebildet werden können.

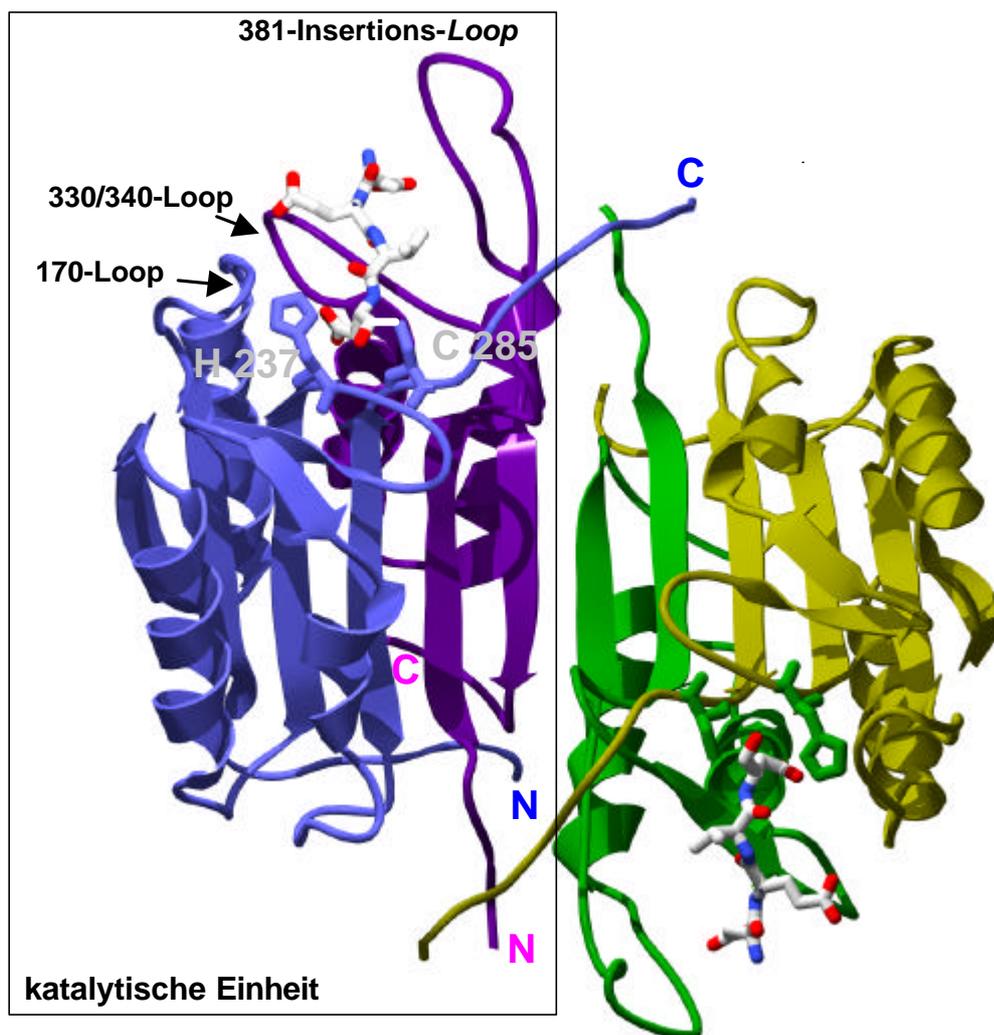


Abbildung 2.2-3 Struktur von aktiver Caspase-7 im Komplex mit Ac-DEVD-CHO in Caspase Standardrepräsentation (Wei et al., 2000). Die zweifache Symmetrieachse verläuft senkrecht zur Bildebene. Die großen und kleinen Untereinheiten des Heterotetramers sind blau und gelb bzw. lila und grün gefärbt. Die peptidischen Inhibitoren sind in Stabrepräsentation dargestellt. Die linke katalytische Einheit ist durch einen Rahmen gekennzeichnet. Die Numerierung aller Reste erfolgt in dieser Arbeit analog zu Caspase-1. Die an der Substratbindung beteiligten Loops von Lys-171 bis Gly-181, von Ser-332 bis Ser-347 und His-379 bis Pro-387 sind als 170-Loop, 330/340-Loop und 381-Insertions-Loop gekennzeichnet. Die katalytischen Reste Cys-285 und His-237 sind in

Stabrepräsentation dargestellt. Die Termini sind für die linke katalytische Einheit in der Farbe der jeweiligen Untereinheit als N bzw. C gekennzeichnet.

Wie Abbildung 2.2-3 zeigt, bildet ein zentrales zwölfsträngiges Faltblatt, das von zehn α -Helices umgeben ist, den strukturellen Kern der Caspase. Die Stränge des Faltblattes verlaufen parallel mit Ausnahme der beiden inneren Stränge an der Interaktionsfläche beider katalytischer Einheiten.

Die katalytischen Reste Cys-285 und His-237 (Numerierung der Caspase Reste erfolgt in dieser Arbeit analog der Caspase-1 Sequenz), sowie die Reste aus denen die Substratbindungstaschen geformt werden, liegen ausnahmslos in *Loop* Regionen zwischen regulären Sekundärstrukturelementen. Die Positionen dieser Reste und *Loops* sind in Abbildung 2.2-3 für die linke katalytische Einheit des Caspase-Heterotetramers gekennzeichnet. So stellen Arg-179 am Ende des 170-*Loops* und Arg-341 des 330/340-*Loops* die Schlüsselreste zur Bildung der S1-Bindungstasche dar. In dieser wird der für Caspasen typische Aspartatrest des Substrat gebunden, nach dem die Spaltung erfolgt. Die Substratbindungstaschen werden überwiegend von Resten des 330/340-*Loops* gebildet. Zusätzlich sind vor allem bei den *executioner-Caspasen-3* und *-7* Reste im Bereich des 381-Insertions-*Loops* an der Substratbindung beteiligt. Dies ist vor allem bei den *executioner-Caspasen* der Fall, die nach dem Rest 381 eine Insertion von neun Resten gegenüber Caspase-1 aufweisen.

Eine Eigenheit der Caspasen ist die „Kommunikation“ zwischen den beiden katalytischen Einheiten. Am C-terminalen Strang der großen Untereinheit befindet sich das katalytische Cystein in Position 285 (Abbildung 2.2-3). Der Strang verläuft weiter zum oberen Ende des Heterotetramers bis er kurz vor seinem C-terminalen Ende mit dem N-terminalen Strang der kleinen Untereinheit der anderen katalytischen Einheit interagiert. Bevor der Strang jedoch mit der N-terminalen Region interagiert, tangiert er den 330/340-*Loop* und den 381-Insertions-*Loop*, so daß hier ein „vier Strang Bündel“ entsteht (Abbildung 2.2-3).

Interessanterweise unterscheiden sich die verschiedenen Caspasen - neben geringfügigen Unterschieden in der relativen Verdrehung zwischen den katalytischen Einheiten - hauptsächlich in Sequenz und Länge dieser *Loops*, welche die

unterschiedlichen P4-P2 Spezifitäten definieren. Neben der Spezifität unterscheiden sich die verschiedenen Caspasen aber auch in den verschiedenen Aktivitäten der ungespaltenen Zymogene im Vergleich mit den gespaltenen Caspasen. Obwohl zu Beginn dieser Arbeit die Caspasefaltung durch die verschiedenen Strukturen aktiver, Inhibitor-gebundener Caspasestrukturen und der Struktur des entfernten Verwandten Gingipain R (Eichinger et al., 1999) eingehend erforscht war, blieb der Aktivierungsmechanismus der Caspasen weitgehend unverstanden, da keine Struktur einer Procaspase bekannt war. Die Caspasefaltung mit ihrem heterotetrameren Charakter und der Aktivierungsspaltung in der „Mitte“ der katalytischen Domäne unterscheidet sich von vielen anderen Proteasen, deren Aktivierungsspaltung N-terminal von der katalytischen Domäne stattfindet, um konstitutiv aktive Proteasen als Folge unvollständiger Translation zu vermeiden (Aviles et al., 1993; Bode and Huber, 1992; Huber and Bode, 1978; Khan and James, 1998). Dieser für die Regulation von Apoptose zentraler Aspekt kann anhand der Inhibitor-gebundenen Caspasestrukturen nicht erklärt werden.

2.3 Wege der direkten Regulation der Caspaseaktivität: Inhibition und Aktivierung von Caspasen

Apoptose ist ein zentraler, aber auch „fataler“ Prozeß für die Zelle. Daher unterliegt das apoptotische Programm einer komplexen Regulation. Da Caspasen Schlüsselenzyme des apoptotischen Programms darstellen, unterliegen auch sie verschiedenen Kontrollmechanismen. Wie in 2.2.1 erwähnt, steuern deren N-Peptide die Lokalisation und Bindung der Caspasen an andere Faktoren.

Ein entscheidendes Element in der Kontrolle des apoptotischen Programms ist aber auch die direkte Regulation der katalytischen Aktivität der Caspasen. Diese Regulation kann an zwei Stellen erfolgen. Zum einen können bereits aktivierte Caspasen inhibiert werden. Dies erfolgt durch Mitglieder der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis protein*). Der zweite Weg beruht auf der Tatsache, daß Caspasen als Zymogene exprimiert werden und eine Aktivierungsspaltung untergehen. Diese

Aktivierungsspaltung zeigt jedoch bei den verschiedenen Caspasen unterschiedliche Auswirkungen.

2.3.1 Aktivierung von Caspasen – Verschiedene Caspasen zeigen unterschiedliche Zymogenitäten - Was ist der Aktivierungsmechanismus der Caspasen?

Die hierarchische Anordnung der Caspasen im apoptotischen Programm bedingt unterschiedliche Charakteristika der verschiedenen Caspase-Klassen. Die *initiator-Caspasen* müssen sensitiv auf äußere oder innere Signale reagieren und diese an die *executioner-Caspasen* weitergeben, welche dann die zügige und irreversible Ausführung des apoptotischen Programms bewirken müssen. Diese Hierarchie spiegelt sich in den Zymogenitäten der Caspasen wieder – also dem Verhältnis der Aktivität der gespaltenen Caspase zur Aktivität des Vorläufers. Die *executioner-Caspasen*-3 und -7 weisen mit Werten von über 10000 relativ hohe Zymogenitäten auf, während die Initiator-Caspasen sehr niedrige Zymogenitäten besitzen. Dies macht im biologischen Kontext Sinn. Die *initiator-Caspasen* befinden sich an der Schaltstelle zwischen apoptotischen Sensoren (wie z.B. den *death receptors*) und der Caspase-Kaskade und müssen daher bereits als Zymogene relevante Aktivitäten besitzen. Caspase-8 besitzt eine Zymogenität von 100, zeigt also als ungespaltene Procaspase bereits 1% der Aktivität von gespaltener Caspase-8.

Die biologische Relevanz dieser Aktivität von Procaspase-8 wird im *induced proximity model* des intrinsischen Signalwegs deutlich. Hier wird angenommen, daß Caspase-8 über seine N-terminale Adaptor-domäne (DED) und weitere Adaptorproteine an einen *death receptor* bindet. Kommt es aufgrund einer Ligandenbindung zu einer Multimerisierung mehrerer Rezeptoren, stehen sich mehrere Caspase-8 Zymogene in hoher lokaler Konzentration gegenüber und die geringe Aktivität der ungespaltenen Zymogene reicht zur Autoaktivierung aus. Ob die Multimerisierung die Bildung von Caspase Heterotetrameren aus zwei katalytischen Einheiten oder ein Zusammentreffen bereits als Heterotetramere vorliegender Caspasen bewirkt, wird derzeit heftig diskutiert im Falle der *initiator* und inflammatorischen Caspasen. Da jedoch alle bis jetzt gelösten Kristallstrukturen ein Caspase Heterotetramer zeigen und die *executioner-Caspasen* permanent als

Heterotetramere vorliegen, werden mögliche Effekte eines Monomer-Dimer Gleichgewichts der katalytischen Einheiten in dieser Arbeit nicht diskutiert.

Die niedrige Zymogenität der Caspase-8 wird von Caspase-9, der *initiator-Caspase* des intrinsischen Signalwegs sogar noch untertroffen. Hier besitzt das Zymogen bereits eine Aktivität, die vergleichbar ist mit der von gespaltenen Caspase-9. Die eigentliche Aktivierung von Caspase-9 hängt vielmehr von der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Bildung des multimeren Komplexes mit Cytochrom c, ATP/dATP und Apaf-1 im sogenannten Apoptosom ab.

Diese Beobachtungen ließen die Frage aufkommen, welcher Aktivierungsmechanismus den Caspasen zugrunde liegt, so daß diese feine Abstufung der Zymogenitäten möglich ist.

Da jedoch zu Beginn dieser Arbeit strukturelle Information nur über aktive, Inhibitor-gebundene Caspasen vorlagen, waren diese und die in Abschnitt 2.2.2 erwähnten Fragen weitgehend unverstanden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Kristallstrukturanalyse eines Caspase Zymogens.

2.3.2 Inhibition von Caspasen – Die IAPs

Der zweite Weg, Apoptose durch die direkte Regulation von Caspasen zu kontrollieren, liegt in der Inhibition bereits aktivierter Caspasen. Viren benützen diesen Weg, um der apoptotischen Immunantwort des Wirtsorganismus zu entgehen. Beispiele für solche Inhibitoren sind das Serpin CrmA (*cytokine response modifier A*) aus dem *cowpox virus*, das Caspase-1, -8, -10 inhibiert (Ray et al., 1992; Renshaw et al., 2000; Simonovic et al., 2000; Zhou et al., 1997) oder der mechanistisch neuartige Inhibitor p35 aus Baculovirus (Clem et al., 1991; Riedl et al., 2001c; Xu et al., 2001; Zhou et al., 1998). Die einzigen Inhibitoren, die auch intrinsisch in Eukarionten vorkommen und z.B. in *Drosophila* oder im Menschen direkt Caspasen inhibieren sind Vertreter der IAP-Familie, deren humane Vertreter in Abbildung 2.3-1 schematisch dargestellt sind.

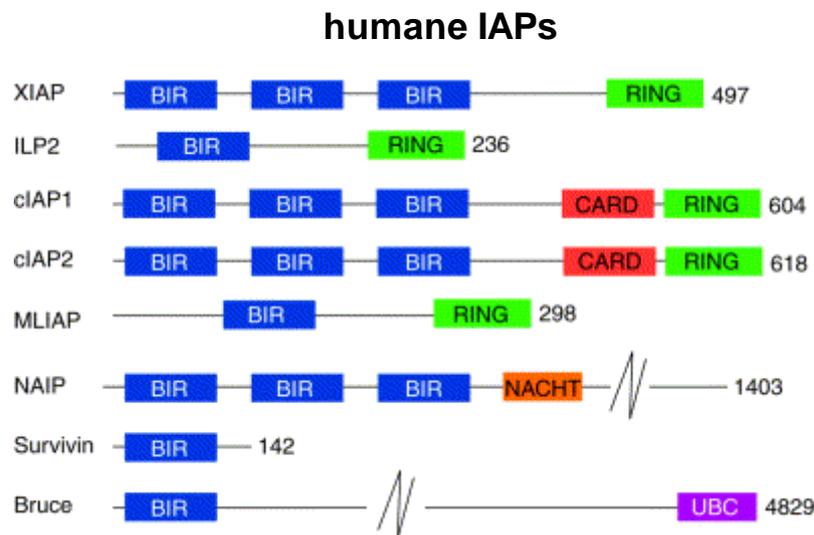


Abbildung 2.3-1 Domänenstruktur und Länge humaner IAPs. IAPs bestehen aus einer oder mehreren BIR Domänen (*baculoviral IAP repeat*). Häufig weisen sie zusätzliche Domänen auf, wie die bereits erwähnte CARD. Die UBC und RING Domänen sind homolog zu E2 bzw. E3-ubiquitin Ligasen. Die NACHT Domäne stellt eine putative ATP-Bindungseinheit dar. Die Längen der IAPs sind schematisch wiedergegeben – NAIP und BRUCE sind verkürzt dargestellt (aus (Stennicke et al., 2002)).

IAPs besitzen eine oder mehrere BIR-Domänen (*baculoviral IAP repeat*), die ein drei-Cystein-ein-Histidin Zinkbindungsmotiv, das BIR-Motiv (Cys-X₂-Cys-X₆-Trp-X₃-Asp-X₅-His-X₆-Cys) gemeinsam haben. Aus Abbildung 2.3-1 ist auch zu erkennen, daß IAPs häufig Multidomänenproteine sind, die neben den BIR-Domänen auch Adaptordomänen, wie CARD oder die Ubiquitinligase-Domänen UBC- (*ubiquitin-conjugating enzymes*) oder eine RING-Domäne aufweisen (Stennicke et al., 2002). Es ist zu erwähnen, daß nicht alle IAPs ihre primäre Funktion in der Inhibition von Caspasen zeigen. So wird z.B. die Aktivität von Survivin eher mit der Cytokinese und/oder der Segregation der Chromosomen in Zusammenhang gebracht (Silke and Vaux, 2001).

2.3.2.1 XIAP - einer der effektivsten Caspase Inhibitoren unter den IAPs

XIAP (*X-linked IAP*) ist ein effektiver Inhibitor der Caspasen-3, -7 und -9. Der Inhibitor besitzt drei BIR-Domänen und eine RING-Domäne. Die RING-Domäne besitzt eine E3-„Ligase“ Funktion und ist für die Ubiquitylierung und anschließende

Degradation des Inhibitors und daran gebundener Caspasen verantwortlich (Suzuki et al., 2001c; Yang et al., 2000). Der ersten BIR-Domäne (BIR1) von XIAP konnte bislang keine Funktion zugewiesen werden, während die dritte BIR-Domäne (BIR3) für die Inhibition von Caspase-9 verantwortlich ist. Erstaunlicherweise reicht für die Inhibition von Caspase-3 und -7 die zweite BIR-Domäne (BIR2-Domäne) alleine nicht aus. Es ist zusätzlich ein Teil der Sequenz zwischen BIR1 und der zweiten BIR-Domäne (der *Linker*) nötig (Deveraux et al., 1999; Sun et al., 1999; Sun et al., 2000; Takahashi et al., 1998). Dieses Konstrukt, bestehend aus der *Linker*-Sequenz zwischen BIR1 und der BIR2-Domäne und der eigentlichen BIR2-Domäne wird im Folgenden der Einfachheit halber als BIR2 bezeichnet.

2.3.2.2 BIR2-Struktur und die Inhibition von Caspase-3 und -7 durch BIR2

Biochemische Experimente zeigen, daß die Caspasen-3 und -7 reversibel in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem BIR2-Molekül pro katalytischer Einheit inhibiert werden. Die K_i -Werte für diese Inhibition liegen im unteren nanomolaren Bereich. Diese Bindung benötigt ein freies katalytisches Zentrum und kann durch Inkubation der Caspasen mit peptidischen Inhibitoren, wie Ac-DEVD-CHO, verhindert werden. Die Mutation des aktiven Cysteins zu Alanin hat hingegen keine Auswirkung auf die Bindung von BIR2 (Riedl et al., 2001b; Sun et al., 1999).

In Abbildung 2.3-2 ist NMR-Struktur von BIR2 (Sun et al., 1999) und schematisch die Inhibition der Caspsaen durch BIR dargestellt. Die BIR2-Struktur zeigt die charakteristische globuläre Struktur für die BIR-Domäne. Der *Linker*-Anteil von BIR2 ist jedoch bis auf eine kurze N-terminale Helix völlig flexibel. Mutationsstudien zeigten überraschenderweise, daß für die Inhibition absolut notwendige Reste (Asp-148, Leu-141) nicht in der globulären BIR-Domäne, sondern im flexiblen Linker-Bereich von BIR2 zu finden waren (Sun et al., 1999) (Abbildung 2.3-2).

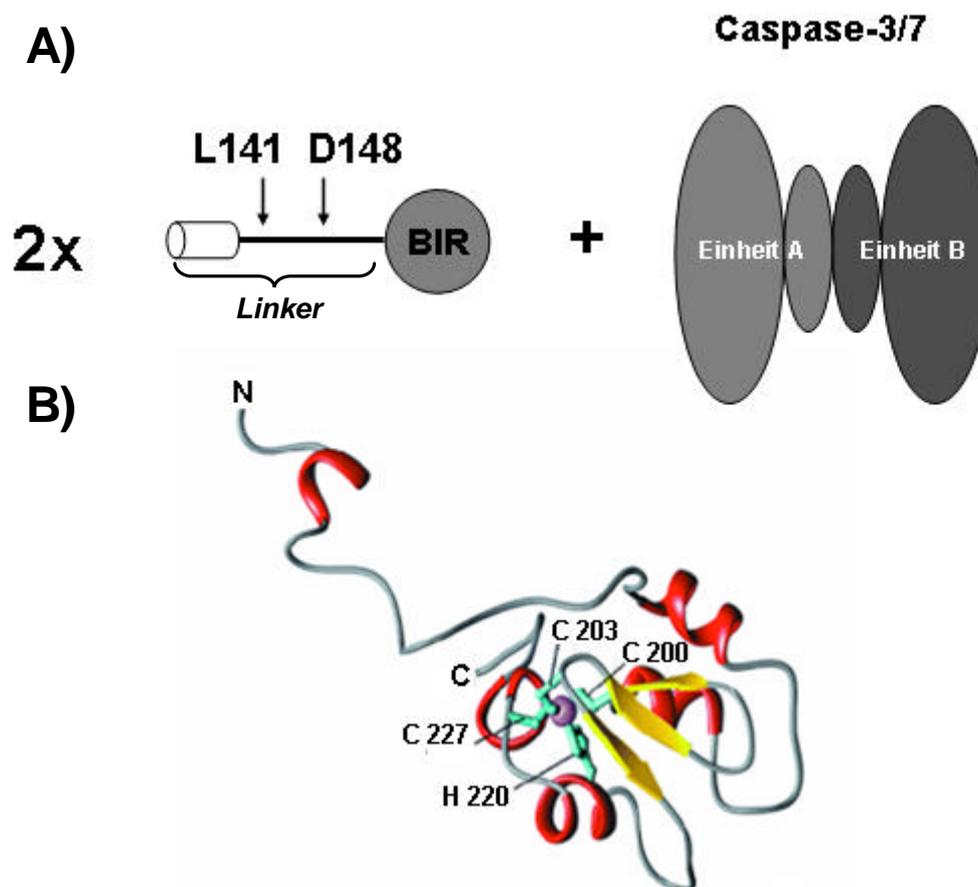


Abbildung 2.3-2 *Caspaseinhibition und NMR-Struktur von BIR2*. **A)** Schematische Darstellung der BIR2 Struktur und dessen Inhibition von Caspase-3/7. Für die Inhibition der Caspasen durch BIR2 ist der *Linker* und die eigentliche BIR-Domäne nötig. Die BIR-Domäne zeigt eine globuläre Struktur, während der *Linker* bis auf eine kurze N-terminale Helix flexibel ist. In dem flexiblen Bereich liegen die Reste Leu-141 und Asp-148, deren Mutation zu Alanin einen Verlust der inhibitorischen Aktivität zur Folge hat. Ein BIR2 Molekül inhibiert eine katalytische Einheit der Caspasen. **B)** NMR-Struktur von BIR2 (aus (Sun et al., 1999)). Dargestellt sind die Reste, die das Zinkion der globulären BIR-Domäne koordinieren. Gut zu erkennen ist der weitgehend unstrukturierte *Linker*.

2.3.2.3 Smac – ein Antagonist der Caspase Inhibition durch IAPs

Die Caspase Inhibition kann durch den kürzlich identifizierten Faktor Smac (*second mitochondrial activator of caspases*) (Du et al., 2000) bzw. sein murines Homolog DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) (Verhagen et al., 2000) aufgehoben werden. Smac wird im Zuge eines apoptotischen Signals aus dem Mitochondrium freigesetzt. Abbildung 2.3-3 zeigt schematisch die Ergebnisse biochemischer Experimente und die Struktur von Smac im Komplex mit BIR3. Es ist

zu erkennen, daß für die antagonistische Funktion von (reifem) Smac hauptsächlich dessen N-terminale Reste Ala-Val-Pro-Ile verantwortlich sind. Diese Reste binden in eine Tasche auf der Oberfläche der BIR3-Domäne (Chai et al., 2000; Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). Weitere biochemische Untersuchungen weisen auf eine analoge Bindung von Smac an BIR2 hin. Da jedoch zu Beginn dieser Arbeit keine Struktur einer BIR-Domäne im Komplex mit einer Caspase bekannt war, konnte über den Mechanismus wie Smac der IAPs Inhibition entgegenwirkt nur spekuliert werden. Inzwischen wurde ein weiteres Protein, Omi/HtrA2 (*high temperature requirement A2*) (Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2001a; van Loo et al., 2002; Verhagen et al., 2002) mit einem ähnlichen N-Terminus identifiziert. Neben einer Smac-ähnlichen (proapoptotischen) Wirkungsweise besitzt HtrA2 Chaperon- und Serinprotease-Funktionen, welche womöglich mit seiner proapoptotischen Funktion einhergehen.

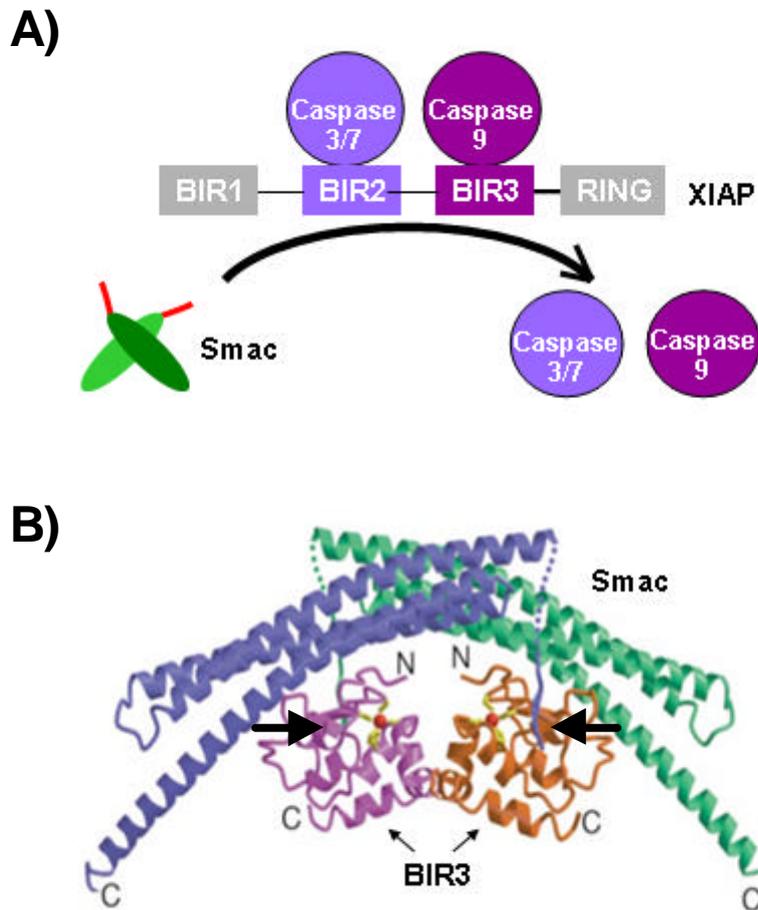


Abbildung 2.3-3 *Der IAP-Antagonist Smac*. **A)** Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Smac. Die Caspasen-3/7 und -9 werden durch ein IAP (hier XIAP) inhibiert. Das dimere Smac antagonisiert die Inhibition. Die freien Caspasen können dann Apoptose auslösen. Die für die Interaktion wichtigen N-Termini von Smac sind rot gekennzeichnet. **B)** Strukturelle Grundlage der Smac-BIR Interaktion (aus (Chai et al., 2000)). Auf die Bindung der Smac N-Termini an die BIR3-Domäne weisen Pfeile hin.

Diese Ergebnisse warfen die Frage nach dem Inhibitionsmechanismus von BIR2 auf struktureller Ebene auf. Wie kann es sein, daß manche BIR Domänen an der Inhibition von Caspasen teilnehmen, andere nicht? Warum ist der *Linker* von BIR2 für die Inhibition von Caspase-3 und -7 nötig? Was bewirkt die Spezifität von BIR2 für die *executioner-Caspasen-3* und -7? Könnte aus einer Caspase-BIR Struktur auf die Wirkungsweise von Smac rückgeschlossen werden?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Kristallstruktur von BIR2 im Komplex mit Caspase-3/-7.

2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.4.1 Überblick

Die Methode der Röntgenkristallographie zur Strukturaufklärung von Proteinen und Nucleinsäuren ist in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell and Johnson, 1976; Drenth, 1994; Stout and Jensen, 1989). Daher werden im Folgenden nur wichtige Grundprinzipien dieser Methode kurz dargestellt.

Die erreichbare Auflösung mikroskopischer Techniken ist stark durch die verwendete Wellenlänge limitiert. Um atomare Distanzen auflösen zu können, benötigt man Strahlung im spektralen Bereich der Röntgenstrahlen. Während jedoch in der Lichtmikroskopie Bilder eines Objekts durch die Verwendung von Linsen erhalten werden können, sind für Röntgenstrahlen solche Linsen nicht verfügbar. Man benützt statt dessen Interferenzeffekte, die durch die Beugung von Röntgenstrahlen an einer dreidimensionalen periodischen Anordnung des Objekts, einem Kristall, entstehen. Der erste Schritt und eines der Grundprobleme der Proteinstrukturaufklärung in der Röntgenkristallographie ist somit die Erzeugung eines Proteinkristalls.

2.4.2 Kristalle

Zur Erzeugung von Proteinkristallen sind heute eine Anzahl von Methoden beschrieben (McPherson, 1990), von denen die Methode der Dampfdiffusion die häufigste Anwendung findet. Dazu wird die hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und ein Konzentrationsgradient über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Präzipitans erzeugt. Durch Diffusion des Lösungsmittels innerhalb eines abgeschlossenen Gefäßes bildet sich eine übersättigte Proteinlösung, in der sich bei günstigen intermolekularen Wechselwirkungen Kristallisationskeime aneinander gelagerter Proteinmoleküle bilden. An diesen Keimen kann dann ein definiertes Kristallwachstum erfolgen. Die Ausbildung eines Proteinkristalls ist jedoch stark von den Bedingungen, wie pH-Wert, Salzkonzentration, chemische Eigenschaften und Konzentration des Fällungsmittels, Temperatur etc. abhängig. Dieses vieldimensionale Problem kann durch faktorielle Ansätze eingegrenzt werden (Carter and Carter, 1979; Jancarik and Kim, 1991), stellt

aber noch immer einen limitierenden Faktor in der Proteinkristallographie dar, da es bis heute meist rein empirisch gelöst werden muß.

Ein Kristall besteht aus einer periodischen Anordnung von Gitterbausteinen und kann durch die Translation einer sogenannten *Elementarzelle* um ganzzahlige Vielfache der Elementarzellvektoren in alle drei Raumrichtungen beschrieben werden. Die Elementarzelle ist durch die Länge ihrer drei Achsen a , b und c und deren Winkel α , β und γ charakterisiert. Die Elementarzelle wird durch die Anwendung aller Symmetrieeoperatoren der jeweiligen kristallographischen Raumgruppe auf die kleinste sich wiederholende Einheit, der *asymmetrischen Einheit*, gebildet.

2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der Atome im Proteinkristall zur Schwingung mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und emittieren ihrerseits Sekundärstrahlung gleicher Frequenz. Diese ist für freie Elektronen gegenüber der einfallenden Strahlung um 180° phasenverschoben. Im Normalfall können die Elektronen im untersuchten System als freie Elektronen betrachtet werden, was im Falle der anomalen Streuung nicht mehr gilt (2.4.7).

Die periodische Anordnung der Elementarzelle hat die Bildung eines *Kristallgitter* zur Folge. Zur Beschreibung der Beugung werden diesem Gitter sogenannte Netzebenen zugeordnet, die verschiedene Gitterpunkte enthalten. Die Netzebenen werden durch ihre Schnittpunkte mit den Achsen der Elementarzelle identifiziert und durch die sogenannten *Miller-Indizes* bezeichnet. Erfolgt die Streuung kohärent an einer Netzebenenschar des Kristallgitters, so kommt es für einen bestimmten Einfallswinkel Θ zu einem Gangunterschied von einer Wellenlänge λ oder einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge $n\lambda$. Damit ist die Bedingung der konstruktiven Interferenz erfüllt. Diese wird durch die *BRAGG'sche Gleichung* beschrieben:

$$n\mathbf{l} = 2d \sin \Theta$$

d der Abstand der Netzebenenscharen

Θ der Winkel zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenschar

λ die eingestrahlte Wellenlänge

Die Beugung von Röntgenstrahlen an den Netzebenenscharen des realen Gitters des Kristalls erzeugt auf diese Weise ein dreidimensionales Gitter von Beugungsmaxima. Da die geometrischen Eigenschaften dieses Gitters zu denen des realen Gitters invers sind, wird es als **reziprokes Gitter** bezeichnet. Das reziproke Gitter wird aus der Ansammlung der Normalenvektoren von Netzebenenscharen mit der Länge des reziproken Netzebenenabstandes gebildet. Unter Verwendung des reziproken Gitters läßt sich das *BRAGG*'sche Gesetz als Vektordiagramm darstellen (*EWALD*-Konstruktion, (Ewald, 1921)) (Abbildung 2.4-1).

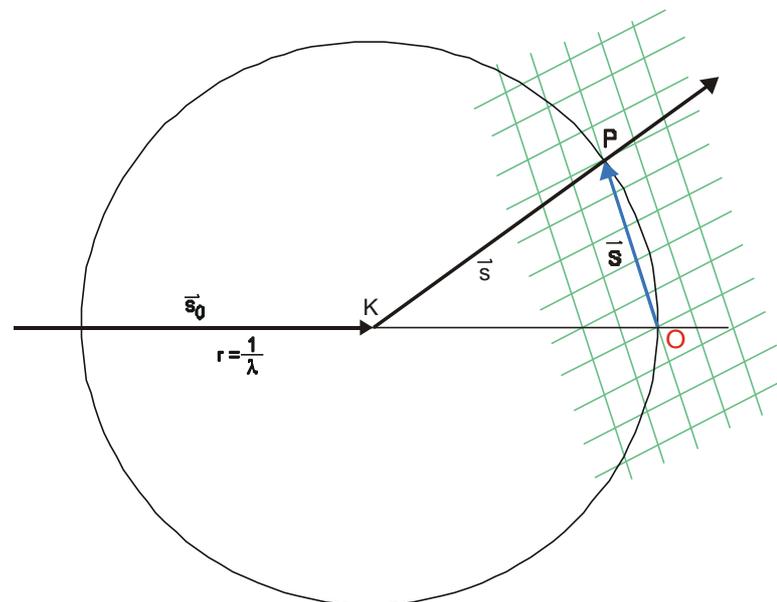


Abbildung 2.4-1 *EWALD*-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahles s_0 geht vom Drehpunkt des Kristalls K zum Ursprung O des reziproken Gitters. Um den Kristall wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gezeichnet (Ewaldkugel). Der gebeugte Strahl wird durch den Vektor s und ein reziproker Gittervektor durch den Vektor S repräsentiert.

Die Reflexionsbedingung ist exakt erfüllt, wenn ein reziproker Gitterpunkt P die *EWALD*-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ durchquert. Die Richtung des gebeugten Strahles

ergibt sich aus der Verbindung des Kristalldrehpunktes K mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunkt P . Kristallgitter mit identischen Abmessungen beugen demnach auch Röntgenstrahlung in identischer Richtung.

Tatsächlich ist die Beugung des Primärstrahles das Ergebnis der Interferenz aller an den Elektronen der Atomhülle gebeugten Röntgenstrahlen. Betrachtet man eine isolierte Elementarzelle, an der sich eine Röntgenwelle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Beugungsbild. Durch die periodische Anordnung des Kristalls können, wie oben beschrieben, diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren. Die so erhaltenen Reflexe werden durch die komplexen Strukturformfaktoren beschrieben. Der mathematische Zusammenhang zwischen den Positionen der Atome (oder besser deren Elektronenhüllen) in der Elementarzelle und den komplexen Strukturformfaktoren kann durch eine **FOURIER**-Transformation hergestellt werden:

$$\vec{F}(h, k, l) = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot (h, k, l)}$$

Der Strukturformfaktor \vec{F} für den Reflex h, k, l beschreibt die Summe der Streubeiträge über alle Atome j mit den fraktionellen Koordinaten \vec{r}_j in der Elementarzelle; f_j ist der Atomformfaktor, der die Abhängigkeit der Streuintensität vom Streuwinkel und eingestrahelter Wellenlänge an dem jeweiligen Atom repräsentiert und unter Annahme von kugelsymmetrischer Ladungsverteilung von der Elektronenzahl des jeweiligen Elementes abhängig ist.

Die Streuleistung eines Atoms verringert sich zusätzlich in auflösungsabhängiger Weise durch dessen thermische Schwingung. Dieser Sachverhalt wird durch die Einführung des Temperaturfaktors berücksichtigt. Der Term $T(iso)$, der den Temperaturfaktor B enthält, wird mit dem atomaren Formfaktor multipliziert:

$$T(iso) = e^{-B \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}}$$

Der Temperaturfaktor ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung wie folgt verknüpft:

$$B = 8p^2 \cdot \overline{u^2}$$

Ein Temperaturfaktor von $B = 40 \text{ \AA}^2$ würde demnach einer mittleren quadratischen Auslenkung $\overline{u^2}$ der atomaren Schwingung um eine Gleichgewichtsposition von $0,7 \text{ \AA}$ entsprechen.

2.4.4 Berechnung der Elektronendichte

Da die Röntgenstrahlen an der Atomhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die genauen Atompositionen sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als **Elektronendichteverteilung** bezeichnet wird. Die Elektronendichteverteilung \mathbf{r} an jedem Punkt (x, y, z) in einem Kristall kann durch die Gesamtheit der Größen f_j und \vec{r}_j ausgedrückt werden, womit sie sich als inverse FOURIERtransformierte der Strukturformfaktoren ergibt:

$$\mathbf{r}(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left| \vec{F}_{hkl} \right| e^{i\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}_{hkl}} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Der Phasenwinkel \mathbf{f}_{hkl} eines Reflexes, der den Gangunterschied des Reflexes im Vergleich zu einer am Ursprung der Elementarzelle gestreuten Welle angibt, ist hierbei einer direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $\left| \vec{F}_{hkl} \right|$, die proportional zu den Quadratwurzeln der gemessenen Intensitäten sind, bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als **Phasenproblem** bezeichnet.

2.4.5 Lösung des Phasenproblems

Das Phasenproblem kann durch die Lokalisierung einer Substruktur gelöst werden, wobei zur Bestimmung der Substruktur direkte Methoden oder Patterson-Methoden verwendet werden können. Den Patterson-Methoden liegt eine Funktion zugrunde, die nur von den Strukturformfaktoramplituden und nicht von den Phasen abhängig ist, die sogenannte **PATTERSON-Funktion**:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left| \vec{F}_{hkl} \right|^2 \cos(2\mathbf{p} \cdot [hu + kv + lw])$$

Die Maxima dieser Funktion entsprechen jedoch nicht den Atompositionen, sondern stellen die interatomaren Distanzvektoren dar. Daher entspricht die Symmetrie der Patterson-Synthese derjenigen der Elektronendichte ohne jegliche translatorische Symmetrieelemente mit Hinzufügung eines Inversionszentrums. Bedingt durch die kristallographischen Symmetrieelemente der jeweiligen Raumgruppe kommt es in bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche werden **HARKER**-Ebenen genannt.

Aufgrund der großen Anzahl von Atomen in einem Protein ist es jedoch nicht möglich aus der Patterson-Synthese auf die Proteinstruktur zu schließen und so ein Modell für die initiale Phaseninformation zu erhalten. Statt dessen müssen Methoden angewandt werden, in denen Patterson-Synthesen von einfacheren Substrukturen interpretiert werden, um die Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten (SIR, MIR, siehe 2.4.6, MAD, siehe 2.4.7), oder in denen experimentelle Patterson-Synthesen mit theoretischen verglichen werden, um ein ausreichend homologes Modell zur initialen Phasierung zu plazieren (MR, siehe 2.4.8).

2.4.6 Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des Isomorphen Ersatzes werden ein Datensatz eines Proteinkristalls (**NATI**) und in den meisten Fällen mehrere Datensätze unabhängiger isomorpher Schweratom-Derivate (**DERI**) der Kristalle aufgenommen (MIR). Verwendbare Derivat-Kristalle müssen dabei eine möglichst gute Kristallisomorphie, sowie die geordnete Bindung der Schweratome aufweisen. Es kann dann in guter Näherung angenommen werden, daß die Differenzen der Strukturfaktoramplituden ($\Delta|\vec{F}|$) von DERI und NATI auf die Differenzen in den Strukturen, also die im DERI zusätzlichen Schwermetallatome zurückzuführen sind. Eine aus den $\Delta|\vec{F}|$ berechnete Patterson-Synthese sollte also nur die interatomaren Distanzvektoren der Schweratome beinhalten und daher durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein. Dies ist in der Praxis aufgrund der wesentlich geringeren Anzahl der Schwermetallatome im Vergleich zu den Proteinatomen möglich.

Durch Vergleich von Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Struktur Faktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel

für die Proteinstrukturfaktoren bestimmt werden. In manchen Fällen lassen sich bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen, (*Single Isomorphous Replacement*, SIR) oft sind jedoch mindestens zwei unabhängige Schweratom-Derivate nötig (*Multiple Isomorphous Replacement*, MIR).

Abbildung 2.4-2 zeigt die Ermittlung initialer Phasenwinkel durch MIR.

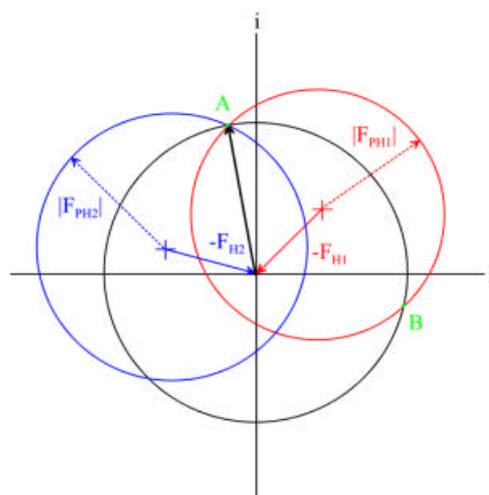


Abbildung 2.4-2 Harkerkonstruktion (Harker, 1956). Um den Ursprung wird ein Kreis mit dem Radius $|FP|$ für den jeweiligen Reflex gezeichnet (schwarz). Um $-F_{H1}$ (Lage und damit Phase des Schwermetalls sind bekannt) wird ein weiterer Kreis mit dem Radius $|F_{PH1}|$ gezeichnet. Die beiden Schnittpunkte A und B ergeben zwei Möglichkeiten für \vec{F}_p . Mit einem zweiten Derivat kann diese Prozedur wiederholt werden und so die eindeutige Phase des Reflexes bestimmt werden (Schnittpunkt A).

2.4.7 Multiple Anomale Dispersion

Eine weitere Möglichkeit zur Lösung des Phasenproblems bietet das Phänomen der anomalen Streuung. Wie in 2.4.3 erwähnt, werden die Elektronen an denen die Streuung erfolgt normalerweise in guter Näherung als freie Elektronen beschrieben. Dies gilt in der Nähe der Absorptionskante eines Elements nicht mehr. Die inneren Elektronen interagieren mit dem Nukleus, so daß der gestreute Strahl nicht mehr die Phasendifferenz von 180° aufweist.

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (*multiple wavelength anomalous dispersion*, MAD) wird die Eigenschaft von Schweratomen als anomaler Streuer in Proteinkristallen ausgenutzt. Dazu wird Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante

der Schweratome verwendet. In der Nähe dieser Absorptionskante des Elementes findet keine elastische Streuung der Elektronen statt. Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern durch Ionisation eines Elektrons aus der K-Schale, bedingt eine Phasenverschiebung (*anomale Streuung oder Dispersion*), die sich von der Phasenverschiebung elastischer Streuung (180°) unterscheidet. Der Atomformfaktor ist somit nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexwertige Zahl.

Dieses bedingt, daß die *FRIEDEL*-Partner \vec{F}_{hkl} und \vec{F}_{-h-k-l} (Reflexe mit identischen Strukturformfaktoramplituden und Phasenwinkeln mit umgekehrten Vorzeichen) weder betragsmäßig noch in ihrem Phasenwinkelbetrag identisch sind, also die Strukturformfaktoren \vec{F}_{hkl} und \vec{F}_{-h-k-l} keine komplex-konjugierten Zahlen mehr sind (siehe Abbildung 2.4-3). Dadurch kann aus den Amplitudendifferenzen (**BIJOVET-Differenzen**) dieser Reflexe eine *PATTERSON*-Synthese errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

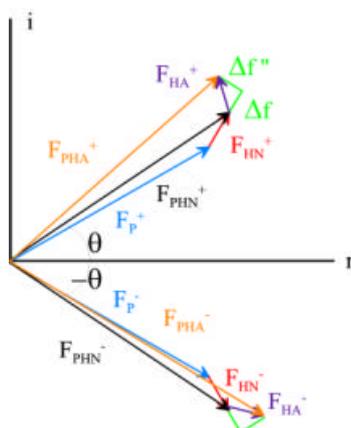


Abbildung 2.4-3 Der Einfluß der anomalen Dispersion auf Strukturformfaktoren mit entgegengesetzten Vorzeichen für den Phasenwinkel. Ohne anomale Streuung gilt $F_{PHN}^+ = F_{PHN}^-$. Diese Strukturformfaktoren setzen sich aus einem Beitrag des Proteins F_P und einem „normalen“ Beitrag F_{HN} des Schweratoms zusammen. Im Falle anomaler Streuung addiert sich eine reelle Komponente Δf in Verlängerung zu F_{HN} und senkrecht dazu eine imaginäre Komponente $\Delta f''$, die stets einen kleinen Phasenwinkel dazu addiert. Als Folge davon weisen die kombinierten Strukturformfaktoren aus „normalen“ und „anormalen“ Beiträgen F_{PHA}^+ und F_{PHA}^- sowohl unterschiedliche Amplituden als auch Phasenwinkel auf.

Analog zum *MIR*-Fall können nun durch eine *HARKER*-Konstruktion die initialen Proteinphasenwinkel bestimmt werden (siehe Abbildung 2.4-4).

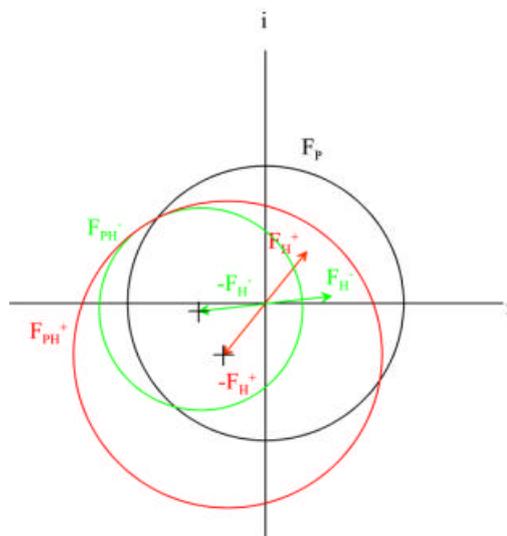


Abbildung 2.4-4 Vereinfachte Harkerkonstruktion, die die Ableitung eines eindeutigen Phasenwinkels mit Hilfe der anomalen Streuung erlaubt. Der Vektor für die „normalen“ Strukturfaktoramplituden ist mit F_P gegeben. Die beiden *BIVVOET*-Paare sind mit F_H^+ und F_H^- gekennzeichnet. F_H^- ist vereinfacht mit einem Phasenwinkel mit entgegengesetztem Vorzeichen dargestellt, damit sich die drei Kreise in einem Punkt schneiden. Im MAD Experiment wird F_P durch Messung eines remote Datensatzes bestimmt, dessen Wellenlänge weit von der Absorptionskante entfernt ist.

2.4.8 Molekularer Ersatz

In der Methode des Molekularen Ersatzes auch Falzmolekülmethode oder „*Molekular Replacement*“ (MR) genannt, (Hoppe, 1957; Huber, 1965; Rossmann and Blow, 1962)) muß bereits ein Atommodell einer bekannten Kristallstruktur mit hinreichender Ähnlichkeit zum untersuchten Modell vorliegen, daß dann entsprechend des native Proteindatensatzes korrekt positioniert werden muß, um zur initialen Phasierung herangezogen werden zu können. Dies geschieht in der Regel unter Benutzung der Patterson-Funktion, die es erlaubt Rotations- und Translationsmöglichkeiten zur Positionierung des Modells getrennt abzusuchen. Aus dem Modell berechnete Patterson-Dichten können dann mit experimentellen verglichen werden und bei maximaler Überlappung von intramolekularen Differenzvektoren (hauptsächlich Patterson-Vektoren im Bereich der erwarteten Molekülgröße) die korrekten Orientierung (Rotationslösung) des Modells erhalten werden.

Die Positionierung des orientierten Modells (Translationslösung) wird dann meist mit Hilfe der intermolekularen Pattersonvektoren durchgeführt.

2.5 Ziele der Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Inhibitionsmechanismus der Caspasen-3 und -7 durch BIR2 aus XIAP auf struktureller Ebene. Dazu sollten die Caspasen-3 und -7, sowie BIR2 rekombinant exprimiert und gereinigt, die Komplexe gebildet, kristallisiert und deren Struktur aufgeklärt werden.

Ein weiteres Ziel war die Kristallstruktur eines Caspase-Zymogens zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der Caspasen. Dazu sollte Procaspase-7 exprimiert, gereinigt, kristallisiert und deren Struktur gelöst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche-Biochemicals (Mannheim), Qiagen (Hilden), Amersham Pharmacia (Freiburg), oder Sigma (Deisenhofen), Calbiochem (Bad Soden) in p.a. Qualität bezogen.

3.1.2 Geräte

Dioden-Array Photometer DU 7500 (Beckmann, München)

Eagle EyeII (Stratagene, Heidelberg)

Äkta (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Goniometerkopf (Huber Diffraktionstechnik, Rimsting)

Kühlzentrifuge J2-21 (Beckmann, München)

PHM 82 Standard pH-Meter (Radiometer Copenhagen, Dänemark)

Schüttelinkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

PVDF Membran und Sterilfilter (Millipore GmbH, Eschborn)

Branson Sonifier Modell 250 (Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

Drehanoden RU200 (RIGATU) mit MARRESEARCH (Hamburg) *Image Plate* Detektoren

Zur Datenverarbeitung aller Art wurden Server und Workstations der Firma DIGITAL *alpha-stations* (OSF), SILICON GRAPHICS *work-stations* und *compute server* (IRIX) oder IBM-kompatible *personal computer* eingesetzt.

3.1.3 Säulenmaterial

Q-Sepharose-Fast-Flow (Amersham Pharmacia)

Superdex 200 HR 30/30 (Amersham Pharmacia)

3.1.4 Materialien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten

3.1.4.1 Bakterien

Folgende Derivate des *E. coli* Stammes K12 wurden für mikrobiologische Arbeiten und für die heterologe Expression rekombinanter Proteine verwendet:

<u><i>E. coli</i> DH5α</u>	(Stratagene GmbH) (Hanahan, 1983)
Genotyp:	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15F λ ⁻
<u><i>E. coli</i> BL21(DE3)</u>	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) (Studier, 1991; Studier and Moffatt, 1986; Studier et al., 1990)
Genotyp:	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)

Alle Bakterienstämme wurden als chemisch kompetente Zellen bezogen. Die Lagerungstemperatur der kompetenten Zellen liegt bei -80°C.

3.1.4.2 Vektoren

- Caspase-3/-7 Wildtyp und Cys-285-Ala Mutanten

Zur rekombinanten Expression von Caspase-3/-7 und deren inaktiven Cys-285-Ala Mutanten wurden Derivate des Plasmids pET23b (Novagen) (Studier and Moffatt, 1986) verwendet. Die codierenden Sequenzen für Caspase-3/-7 bzw. Caspase-3/-7 Cys-285-Ala befanden sich zwischen den *Nde1*- und *Xho1*-Restriktionsschnittstellen des Plasmids (Stennicke et al., 1998).

- BIR2-Region von XIAP

Das zur Kristallisation des Caspase-3/BIR2 Komplexes verwendete BIR2-Konstrukt (BIR2 Cys-202-Ala, Cys-213-Gly (Reste 124-240 von XIAP)) stammt aus einem pET15b Derivat (Novagen) (Studier and Moffatt, 1986) und wurde freundlicherweise von Dr. Chaohong Sun bereitgestellt (Sun et al., 1999).

Zur Untersuchung der Caspase-Inhibition und zur Kristallisation des Caspase-7/BIR2 Komplexes wurde ein BIR2-Konstrukt aus einem pGEX4T-1 Derivat (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet, das freundlicherweise von Dr. Ryosuke Takahashi bereitgestellt wurde. Die codierenden Sequenzen für BIR2 (Reste 124-242 von

XIAP) befanden sich zwischen den *EcoR*I- und *Xho*I-Restriktionsschnittstellen des Plasmids (Suzuki et al., 2001b).

- Unterdrückung von Hintergrundexpression

Zur Unterdrückung von Hintergrundexpression vor der Induktion durch IPTG wurde das Plasmid pLysS (Novagen) verwendet, das für T7 Lysozym codiert (Studier, 1991).

3.1.4.3 Enzyme und Kits

Restriktionsenzyme (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

Qiagen Plasmid Preparation Kit (Mini) (Qiagen, Hilden)

Qiagen Plasmid Preparation Kit (Midi) (Qiagen, Hilden)

3.2 Mikrobiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der verwendeten Arbeitsgeräte, Medien und Lösungen geachtet. Medien, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen steril filtriert. Standardisierte mikrobiologische, sowie molekularbiologische Methoden wurden nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Für DNA-Aufreinigungen und Plasmid-Schnellisolierungen fanden Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben Anwendung.

3.2.1 Bakterien Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium wurde zur Expression rekombinanter Proteine und zur Vermehrung von Plasmid-DNA mit den jeweiligen Antibiotika versetzt und – soweit nicht anders beschrieben – bei 37°C und 200 bis 250 U/min im Schüttler kultiviert. Von den Antibiotika wurden 1000fach überkonzentrierte Stammlösungen erstellt, steril filtriert und diese bei –20°C gelagert.

- Antibiotika-Lösungen:
- Ampicillin 1000fach (100 mg/ml in ddH₂O)
 - Chloramphenicol 1000fach (25 mg/ml in Ethanol)

<u>LB-Medium:</u>	5 g NaCl 16 g Bacto-Trypton 10 g Hefe-Extrakt mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt ddH ₂ O ad 1 Liter
-------------------	---

3.2.2 Bakterien Plattenkulturen

LB-Medium wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurde das entsprechende Antibiotikum in gewünschter Endkonzentration zugegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden über Nacht in der Sterilbank belassen, anschließend steril verpackt und bei 4°C gelagert. Bakterienflüssigkulturen wurden mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf den LB-Agar-Platten vereinzelt und diese anschließend für 12 Std. bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Transformation von Fremd-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

200 µl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,01–1 µg Plasmid-DNA versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 30 sec bei 42°C hitzeschockbehandelt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400 µl LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium wurde der Transformationsansatz für 1 Std. bei 37°C kultiviert. 150 µl der Ansätze wurden auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert oder direkt zum Animpfen von Expressionskulturen verwendet.

3.2.4 Heterologe Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

Transformanten wurden in 50 ml LB-Medium (siehe 3.2.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Diese Übernachtskulturen wurden in 0,5 Liter Expressionskulturen überführt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 auf einem Schüttler bei 150–200 U/min inkubiert. Die Induktion der Expression rekombinanten Proteins erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG und weiterem Schütteln bei 30 °C für 4-8 Stunden. Anschließend wurden die Bakteriensuspension abzentrifugiert und das Pellett aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.5 Herstellung von *E. coli* Rohextrakten

Bakterienzellen wurden im Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) resuspendiert und mittels Ultraschall (MacroTip 3 x 5 min auf Stufe 8 bei 80 % Puls-Zyklus) aufgeschlossen (Branson, Sonifier 250). Die Trennung von Cytoplasma und unlöslicher Membranfraktion erfolgte durch Zentrifugation (30 min, JA 25.50, 20 000 U/min, 4°C).

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Konzentrationsbestimmung der Caspasen und BIR2-Inhibitoren

Die Konzentration aktiver Caspase-3 und -7 wurde durch Titration der aktiven Zentren mit dem irreversiblen Inhibitor Z-VAD-FMK (Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon) bestimmt. Dazu wurden die Caspasen auf eine Endkonzentration von ca. 25 nM in Caspase-Puffer (20 mM piperazin-N,N-bis(2-ethanesulfonsäure)(PIPES), 100 mM NaCl, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.1% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (CHAPS), 10% Sucrose, pH 7.2) verdünnt (Stennicke and Salvesen, 1997). Dabei erfolgte die Abschätzung der Konzentration anhand des theoretisch errechneten Extinktionskoeffizienten bei einer Lichtwellenlänge von 280 nm in 6 M Guanidiniumhydrochlorid (Gill and von Hippel, 1989). Anschließend wurden verschiedene Mengen Z-VAD-FMK zugegeben und 20 min bei 37° C inkubiert. Die Restaktivität und Konzentration aktiver Caspase wurde anschließend durch die photometrische Beobachtung (bei einer Wellenlänge von 405 nm) der Hydrolyse des Substrates Ac-DEVD-pNA (Acetyl-Asp-Glu-Val-paranitroanilin) ermittelt. Dabei wurde eine Endkonzentration von 100 µM Substrat und ein Endvolumen von 100 µl bei einer Temperatur von 37° C verwendet.

Die Konzentration an aktiven BIR2-Inhibitor-Konstrukten wurde analog durch die Titration von Caspasen mit bekannter aktiver Konzentration ermittelt.

Da die theoretisch anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelten Konzentrationen weniger als 10 % von den enzymatisch ermittelten

Konzentrationen abwich, wurde diese Methode zur Abschätzung der Konzentration der inaktiven Cys-285-Ala Mutanten von Caspase-3 und -7 verwendet.

3.3.2 Reinigung rekombinanter Proteine

- Caspasen

Für die Expression der Caspasen wurden pET23b-Vektoren verwandt, die eine C-terminale Extension um Leu-Glu-(His)₆ (His-tag) der Caspasen bewirken. Dies ermöglicht die Aufreinigung über eine Nickelsepharose-Säule. Dazu wurden die Extrakte aus 3.2.5 auf eine *Ni-NTA Superflow*-Säule (Quiagen, Bettvolumen in der Regel 1ml pro 20 mg erwarteten Proteins) bei einer Temperatur von 4°C gegeben. Die Säule wurde dann mit dem 10fachen Bettvolumen Waschpuffer-1 (50 mM Tris/HCl, 100 mM Natriumchlorid, pH 8,0) und dem 10fachen Bettvolumen Waschpuffer-2 (50 mM Tris/HCl, 500 mM Natriumchlorid, pH 8,0) gewaschen. Die Elution des immobilisierten Proteins erfolgte durch einen linearen Imidazolgradienten von 0-200 mM Imidazol in Waschpuffer-1. Für die Kristallisation von Procaspase-7 (Cys-285-Ala) erfolgte die Elution durch Zugabe des 3fachen Säulenvolumens von 150 mM Imidazol in Waschpuffer-1.

-BIR2

Das BIR2-Konstrukt (BIR2 Cys-202-Ala, Cys-213-Gly (Reste 124-240 von XIAP)) zur Kristallisation des Caspase-3/BIR2 Komplexes wurde freundlicherweise von Dr. Chaohong Sun bereitgestellt.

Die zur Kristallisation des Caspase-7/BIR2 Komplexes und zur Untersuchung der Caspase-Inhibition verwendeten BIR2 und GST-BIR2 (Reste 124-242 von XIAP) Proteine wurden durch Affinitätschromatographie an *Glutathione Sepharose*TM 4B (Pharmacia Amersham) gereinigt. Dazu wurde das Rohextrakt nach dem in 3.2.5 beschriebenen Aufschluß bei Raumtemperatur auf die Säule gegeben (Bettvolumen ca. 1ml pro 20 mg erwarteten Protein). Anschließend wurde mit dem 30fachen Bettvolumen Waschpuffer-1 (50 mM Tris/HCl, 100 mM Natriumchlorid, pH 8,0) gewaschen. Zur Abspaltung des BIR2-Proteins von GST wurden 50 Einheiten bovinen Thrombins (Pharmacia Amersham) pro erwarteten 10 mg BIR2 Protein in 1ml Waschpuffer-1 zum Säulenmaterial gegeben. Die Suspension wurde für 4-6 Stunden

bei Raumtemperatur unter ständigem Invertieren inkubiert. Für die kinetische Charakterisierung der Caspase-Inhibition durch BIR2 versus GST-BIR2 wurde parallel ein Teil des Säulenmaterials analog, jedoch ohne Thrombin behandelt.

Im Falle des Ansatzes mit Thrombin erfolgte die Elution von BIR2 durch Waschen mit dem dreifachen Bettvolumen Waschpuffer-1.

GST-BIR2 wurde durch Zugabe des dreifachen Bettvolumens Waschpuffer-1 mit 20 mM reduziertem Glutathion (Pharmacia Amersham) vom Säulenmaterial eluiert.

3.3.3 Proteolytische Spaltung inaktiver Caspase-Mutanten

Während aktive Caspasen-3 und -7 bereits während bei der rekombinanten Expression eine autoproteolytische Aktivierungsspaltung untergehen, so daß automatisch die aktive Konformation der Caspasen gereinigt werden kann, werden bei der rekombinanten Expression von Caspase-3/-7 Cys-285-Ala Mutanten die Procaspaseformen erhalten. Diese wurden nach der Aufreinigung durch den natürlichen Caspase-Aktivator Granzym B gespalten und somit in die „aktive“ Konformation überführt. Dazu wurden die Caspase-Mutanten in Elutionspuffer im molaren Verhältnis 1:1000 (Caspase : Granzym B) vermischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde noch einmal Granzym B im Verhältnis 1:4000 zugegeben und weitere 10 min inkubiert, um eine maximale Spaltungseffizienz zu erreichen. Das verwendete Granzym B wurde freundlicherweise von Dr. C.J. Froelich zur Verfügung gestellt (Hanna et al., 1993).

3.3.4 Bildung der Caspase/BIR2 Komplexe

Zur Bildung der Caspase/BIR2 Komplexe wurden die mit Granzym B prozessierten Caspase-3/-7 Cys-285-Ala Mutanten nach der Elution mit 10 mM DTT (Endkonzentration) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die 1,5 fache (molare) Menge an BIR2 zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.5 Gelfiltration

Zur Abtrennung der Caspase/BIR2 Komplexe von den Einzelkomponenten und Granzyme B, sowie zur weiteren Reinigung der Komplexe bzw. der Procaspase-7 und zum finalen Pufferwechsel wurde für jedes Projekt abschließend ein Gelfiltrationslauf durchgeführt. Dazu wurde als Laufpuffer 10 mM HEPES/NaOH, 100 mM Natriumchlorid, 2 mM DTT, pH 7,6 im Falle des Caspase-3/BIR2 Komplexes und der Procaspase-7 und 10 mM Tris/HCl, 100 mM Natriumchlorid, 10 mM DTT, pH 7,5 im Falle des Caspase-7/BIR2 Komplexes verwendet. Vor den Gelfiltrationsläufen wurden die Puffer entgast und sterilfiltriert (SteritopTM, Ausschlußgrenze 0,4 µm, Millipore).

Die Gelfiltrationsläufe wurden an Äkta-Systemen (Pharmacia Amersham) unter Verwendung von Superdex 200 HR 30/30-Säulen (Amersham Pharmacia) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die nach den Läufen erhaltenen Proteinlösungen wurden anschließend mit Hilfe von amicon-Rührzellen (Amicon) unter Druck (Stickstoff) mit Membranfiltern der Ausschlußgrenze 20 kDa (Diaflo, Irland) auf die in 3.4.1 aufgeführten Konzentrationen aufkonzentriert. Anschließend wurden diese aliquotiert (50 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Kristallisation bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.6 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes wurde durch eine diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht (Laemmli, 1970). Die durch SDS aus dem Probenpuffer stark negativ geladenen Proteine (ca. 1,4 g SDS pro g Protein) werden unter den denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einem vernetzten Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld ihrer Größe nach getrennt. Dabei ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion ihres Molekulargewichtes. Dieser Zusammenhang kann zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine genutzt werden.

Die SDS-PAGE wurde mit einem 5 % igen Sammelgel und einem 12 % igen Trenngel durchgeführt. Es wurden jeweils acht Gele (8,5 x 8 cm²) in einer Gelgießkammer gegossen.

Sammelgel 5 %: 10 ml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
 7,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8
 41,6 ml H₂O
 300 µl 20 % (w/v) SDS

Trenngel 12 %: 36 ml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
 17 ml 2 M Tris/HCl pH 8.8
 36 ml H₂O
 450 µl 20 % (w/v) SDS

Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 100 µl TEMED und 100 µl (0,1 g/ml) APS in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig Isopropanol blasenfrei überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 100 µl TEMED und 100 µl (0,1 g/ml) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Die Kämme für zehn bis zwölf Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Die ausgehärteten Gele wurden in Haus-haltsfolie luftdicht verschlossen und bis zu drei Wochen bei 4°C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 10fach Probenpuffer versetzt und 5 min bei 96°C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei konstantem Strom von 15 mA je Gellänge im SDS-Laufpuffer. Zur Molekular-gewichtsbestimmung der getrennten Proteine wurde ein SDS-PAGE-Größenstandard (Low-Range SDS-Marker BioRad) mitgetrennt.

10x Probenpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 6.8
 200 mM DTT
 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
 20 % (w/v) Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8.3
 200 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS

3.3.7 Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele

Trenngele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung durch Mikrowellen kurz erwärmt und 10 min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien und anschließend getrocknet.

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
	40 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
<u>Entfärbelösung:</u>	40 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure

3.3.8 Transfer von Proteinen durch ElektrobloTTing

Durch ElektrobloTTing werden Proteine elektrophoretisch aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinyliden-difluorid(PVDF)-Trägermembran transferiert und dort fixiert. Der Membrantransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde in einer Transblot-Transfer-Cell durchgeführt (Towbin et al., 1979). Die hydrophobe PVDF-Membran wurde zunächst 1 min in Methanol benetzt und anschließend in ddH₂O gewaschen. Die Transfermembran wurde danach für weitere 5 min im Transferpuffer inkubiert. Der Aufbau des „*Blotting-Sandwiches*“ war wie folgt:

Anode

2 Lagen 3 MM Papier (Whatman)
 PVDF Membran
 Polyacrylamid-Gel
 2 Lagen 3 MM Papier

Kathode

Alle Komponenten des „*Blotting-Sandwiches*“ wurden vor dem Zusammenbau mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 2 Std. bei 0,65 mA/cm² Gel.

<u>Transferpuffer:</u>	20 % (v/v) Methanol
	48 mM Tris/HCl pH 8.3
	39 mM Glycin
	0,037 % (w/v) SDS

3.3.9 N-terminale Sequenzierung nach *EDMAN*

Nach der Methode des *EDMAN*-Abbaus (Edman and Henschen, 1975) wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und dabei als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten. Nach einer HPLC-Auftrennung wird die Aminosäure durch Vergleich eines mitgetrennten Standard-Aminosäuregemisches identifiziert.

Die durch ElektrobloTTing an PVDF Membranen fixierten Proteine wurden, wie unter 3.3.7 beschrieben, mit Coomassie Blue G-250 gefärbt und einer N-terminalen Sequenzanalyse zugeführt.

Zur Sequenzanalyse gereinigter rekombinanter Proteine wurden 60 bis 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von max. 100 µl auf eine mit 10 µl Methanol vorbehandelten

ProSorb PVDF-Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA) pipettiert und dort immobilisiert.

Die anschließende Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt.

Am Burnham Institute wurde die Sequenzierung freundlicherweise von Scott Snipas auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 476A analog durchgeführt. Dabei wurde eine Immobilon-P Membran (Millipore, Bedford, MA) verwendet.

3.3.10 Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Caspase-3/7 mit BIR2/GST-BIR2

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten von Caspase-3/7 mit BIR2/GST-BIR2 wurden 25 µl verschiedener BIR2 bzw. GST-BIR2 Vorverdünnungen (in Caspasepuffer (siehe 3.3.1) mit 20 mM reduziertem Glutathion) mit 25 µl Z-Asp-Glu-Val-Asp-AFC-Substrat (Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-(trifluoromethyl)cumarin) (in Caspasepuffer mit 20 mM reduziertem Glutathion) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer Caspase-3 oder -7 Vorverdünnung (in Caspasepuffer mit 20 mM reduziertem Glutathion) zugegeben. Die Endkonzentrationen betragen 0 bis 6,6 nM BIR2 bzw. GST-BIR2, 0,2 nM Caspase-3 bzw. -7 und 100 µM Substrat.

Anschließend wurde die Substrathydrolyse anhand der Fluoreszenz an einem Perkin-Elmer LS50B-Gerät (Perkin-Elmer) verfolgt (Anregungswellenlänge: 400 nm, Emissionswellenlänge: 505 nm). Im Bereich linearer Substrathydrolyse wurden die Hydrolyseraten für die nicht inhibierten Caspasen und die verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen bestimmt. Die Inhibitionskonstanten wurden wie in (Zhou et al., 1997) beschrieben ermittelt:

Aus dem Vergleich der nicht inhibierten (v_0) mit den inhibierten Hydrolyseraten (v_i) bei den jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen (I) können über die Beziehung

$$v_0/v_i = 1 + I/K_{i(\text{app})}$$

die apparenten Inhibitor konstanten ($K_{i(\text{app})}$) für die jeweilige Inhibition bestimmt werden. Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) der Enzyme für das verwendete Z-DEVD-AFC Substrat ($2,4 \times 10^{-5}$ M für Caspase-3 und $7,7 \times 10^{-5}$ M für Caspase-7, (Zhou et al., 1998)) können daraus die Inhibitionskonstanten (K_i) über die folgende Beziehung ermittelt werden.

$$K_i = K_{i(\text{app})} / (1 + S/K_M)$$

Hierbei stellt S die verwendete Substratkonzentration dar.

3.3.11 Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung des Multimerisierungszustandes von Procaspase-7 wurden dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Lösung von Procaspase-7 aus 3.3.5 auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml verdünnt (mit Gelfiltrationspuffer) und filtriert (Ausschlussgrenze des Filters: 0,02 μm , Whatman). Als Kontrolle wurde ein Aliquot dieser Lösung durch Behandlung mit Granzyme B (siehe 3.3.3) in die aktive Form überführt. Mit Procaspase-7, sowie mit gespaltener Caspase-7 als Kontrolle, wurden in einem DynaPro *light-scattering instrument* (Protein Solutions, Lakewood, NJ) dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt. Als Standard wurde hierbei Rinder-Serum-Albumin verwendet. Für die Procaspase-7 bzw. gespaltene Caspase-7 wurden Molekulargewichte von 70 kDa bzw. 71 kDa erhalten (siehe 4.4.1).

3.4 Kristallographische Methoden

3.4.1 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1990) im sitzenden Tropfen „*sitting drop*“ in *CrystalClear Strips* (Douglas Instruments). Die *CrystalClear Strips* wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc.) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Wochen bei 20°C verfolgt.

Für das *Screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt (Carter and Carter, 1979; Jancarik and Kim, 1991; McPherson, 1990). Dabei wurden jeweils 2 µl (7,5 - 8 mg/ml) Proteinlösung mit 1 µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 100 µl Reservoirlösung äquibriert. Bei Lösungen, die initiale Kristallbildung zeigten, wurden anschließend Fällungsmittel und pH-Werte variiert, sowie unterschiedliche Additive (Hampton Research, USA) verwendet. Dabei wurden auch immer die Verhältnisse von Proteinlösung zu Kristallisationspuffer im Tropfen variiert.

Die Finalen Tropfenverhältnisse und Puffer sind im Folgenden dargestellt.

- Caspase-3 Cys-285-Ala / BIR2 Cys-202-Ala, Cys-213-Gly (Reste 124-240 von XIAP) Komplex:

9 µl der Proteinlösung (Proteinkonzentration: 8 mg/ml, in 10 mM HEPES/NaOH, 100 mM Natriumchlorid, 2 mM DTT, pH 7,6) wurden mit 9 µl Reservoirlösung (0,1 M Natriumazetat, 1,8 M Natriumformiat, pH 5.2) vermischt.

- Caspase-7 Cys-285-Ala / BIR2 (Reste 124-242 von XIAP) Komplex :

2 µl Proteinlösung (Proteinkonzentration: 7,5 mg/ml, in 10 mM Tris/HCl, 100 mM Natriumchlorid, 10 mM DTT, pH 7,5) wurden mit 1 µl Reservoirlösung vermischt (*Emerald Bio Structures – Wizzard II*, Bedingung 36 : 10 % (w/v) PEG-3000, 0,2 M Natriumchlorid, 100 mM Natriumphosphat/-citrat-Puffer, pH 4,2 (Laut Hersteller wurden eine 0,5 M Natriumhydrogenphosphatlösung und 0,5 M Zitronensäure vermischt um einen pH-Wert von pH 4,2 zu ergeben).

- Caspase-7 Cys-285-Ala:

3 µl der Procaspase-7 Lösung (Proteinkonzentration: 8 mg/ml, in 10 mM HEPES/NaOH, 100 mM Natriumchlorid, 2 mM DTT, 7,6) wurden mit 0,4 µl einer 0,1 molaren Ammoniumsulfatlösung und 1 µl Reservoirlösung (50 mM Mes/NaOH, 100 mM Ammoniumsulfat, 10 mM Magnesiumchlorid, 20 % PEG 8000, pH 5,6) vermischt.

3.4.2 Datensammlung und Datenreduktion

Zur Messung von Cryo-Daten wurden Kristalle in Schlaufen aus Nylon (Hampton Research) aufgenommen, in Cryopuffer (Reservoirpuffer mit 15-30 % Glycerin) transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Erste Datensätze des Caspase-3/BIR2 Komplexes und der Procaspase-7 wurden bei 100 K aufgenommen, wobei verschiedene *Image Plates* Detektoren der Firma MarResearch, die auf Rigaku-Drehanoden-Röntgeneratoren installiert waren (Wellenlänge 1,541 nm), verwendet wurden. Die zur Lösung der Kristallstrukturen verwendeten Datensätze für die Caspase-3/BIR2 und Caspase-7/BIR2 Komplexe wurden an der *Beamline* 7-1 und 9-2 des *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory* (SSRL) bei 100K aufgenommen. Der Datensatz zur Bestimmung der Procaspase-7 Struktur wurde an der *Wiggler Beamline* BW6 am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY, Hamburg aufgenommen).

Zur Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe, Elementarzellparameter sowie zur Integration der Reflexintensitäten wurden die Programme MOSFLM v6.01 (Leslie, 1998) und DENZO (Otwinowski and Minor, 1997) eingesetzt. Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SCALA (Collaborative Computational Project, 1994), TRUNCATE (Collaborative Computational Project, 1994) und SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997) durchgeführt.

3.4.3 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Kristallstrukturen des Caspase-7/BIR2 Komplexes und der Procaspase-7 wurden durch *PATTERSON*-Suchmethoden „*Molecular Replacement*“ (Hoppe, 1957; Huber, 1965; Rossmann and Blow, 1962) gelöst. Die Berechnungen wurden mit dem Programm MOLREP (Collaborative Computational Project, 1994) und AMoRe (Navaza, 1994) durchgeführt.

Als Suchmodell für den Caspase-7/BIR2 Komplex wurden die Koordinaten der Caspase-7 aus einem Caspase-7/BIR2 Komplex (Huang et al., 2001), (PDB Eintrag 1I4O) verwendet. Zur Lösung der Procaspase-7 Struktur wurden als Suchmodell die Koordinaten der Caspase-7 aus einem Caspase-7/Ac-DEVD-CHO Komplex (Wei et al., 2000), (PDB Eintrag 1F1J) verwendet.

Identifizierung und Verfeinerung der Zink-Positionen des Caspase-3/BIR2 Komplexes aus den MAD-Datensätzen erfolgte durch das Programm Solve (Terwilliger and Berendzen, 1999). Die anschließende Dichtemodifikation wurde mit dem Programm DM (Collaborative Computational Project, 1994) vorgenommen.

Atomare Proteinmodelle wurden auf einer SILICON GRAPICS *work station* mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) in die Elektronendichte eingepaßt. Diese Atommodelle wurden mit CNS (Brunger et al., 1998) verfeinert. Als Zielfunktion wurde der kristallographische *R*-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh and Huber, 1991) berücksichtigt wurden, da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im allgemeinen nicht ausreichend überbestimmt ist. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als *TESTset* nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992). *Least square*- und *simulated-annealing* - Koordinatenoptimierung alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manuellem Einpassen. Danach wurden Wassermoleküle automatisiert mit CNS eingebaut. Abschließend wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert.

Aufgrund des Vorliegens von nicht-kristallographischer Symmetrie (*NCS*) konnten Einschränkungen der Positionen und Temperaturfaktoren für lokal symmetrie-äquivalente Atome in den Verfeinerungen verwendet werden.

3.4.4 Analyse von Atommodellen

Die Molekülgeometrien wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (Collaborative Computational Project, 1994) durchgeführt. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm STRIDE (Frishman and Argos, 1995) zugeordnet.

3.4.5 Graphische Darstellungen

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1993), Raster3D (Merritt and Murphy, 1994) und Swiss-

PdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdv>), Dino (DINO: Visualizing Structural Biology (2001) <http://www.dino3d.org>) und Spock (Christopher, J.A.; Spock: The Structural Properties Observation and Calculation Kit) benutzt.

Zur Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) angewandt.

Zur Nachbearbeitung von Bildern, sowie zu deren Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) ILLUSTRATOR (Adobe Systems Inc., USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

4 Ergebnisse und Diskussion

Für die Strukturen der Caspase-3/BIR2 und Caspase-7/BIR2 Komplexe, sowie von Procaspase-7 wurden Caspase Cys-285-Ala Mutanten verwendet. Diese werden im Folgenden, wenn nicht anders vermerkt, vereinfacht als Caspase-3/-7 bzw. Procaspase-7 bezeichnet.

4.1 Struktur des Caspase-3/BIR2 Komplexes

4.1.1 Expression, Kristallisation und Strukturlösung des Caspase-3/BIR2 Komplexes

Expression, Reinigung, Prozessierung, Isolierung des Komplex

Zur Lösung der Caspase-3/BIR2 Struktur wurden eine katalytisch inaktive Caspase-3 Cys-285-Ala Mutante mit C-terminalen His-tag und ein GST-Fusionsprotein mit BIR2 (Reste 124-242 von XIAP) rekombinant exprimiert. Die Ausbeuten betragen ca. 10 mg Caspase-Mutante bzw. ca. 30 mg GST-BIR2 pro Liter Bakterienkultur. Die Caspasen und BIR2 wurden durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose bzw. Glutathionsepharose (siehe 3.3.2) gereinigt. Vor der Komplexbildung wurde der GST-Anteil des BIR2-Konstruktes durch Thrombin mit einer Effizienz von ca. 75 % am Säulenmaterial abgespalten und BIR2 von der Säule abgewaschen. Die Caspase-3 wurde durch Granzym B mit einer Effizienz von ca. 90 % prozessiert und somit in die „aktive Form“ überführt. Die Spaltung durch Granzym B erfolgt nach der Sequenz Ile-294-Glu-Thr-Asp-297 (Ile294-Gln-Ala-Asp-297 für Caspase-7) und ist identisch mit der (Auto-) Katalyse der Caspasen durch die *initiator-Caspasen* oder durch bereits aktivierte *executioner-Caspasen*. Zur Komplexbildung wurde ein Verhältnis von 1,5 Molekülen BIR2 pro Caspase-3 (katalytische Einheit) verwendet. Der Komplex (Molekulargewicht: 93 kDa) zeigte im anschließenden Gelfiltrationslauf ein apparentes Molekulargewicht von ca. 89 kDa und konnte gut von den Einzelkomponenten abgetrennt werden. Die Proteinlösung wurde anschließend auf eine Konzentration von 8 mg/ml aufkonzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Die Integrität der Konstrukte wurde durch Gelelektrophorese und Edman-Abbau überprüft. In *sitting drop* Kristallisationsansätzen konnten jedoch nur Kristalle erhalten werden, die bis zu einer Auflösung bis zu 8 Å streuten.

Zu besseren Kristallen führte die analoge Verwendung eines BIR2 Cys-202-Ala, Cys-213-Gly Konstruktes (Reste 124-240 von XIAP), das freundlicherweise von Dr. Chaohong Sun bereitgestellt wurde. Da diese Mutationen nicht an Strukturelementen der Komplexbildung beteiligt waren und bis auf das bessere Kristallisationsverhalten keine weiteren Einflüsse zeigten, wird dieses Konstrukt vereinfacht als BIR2 bezeichnet (Sun et al., 1999).

Kristallisation und Strukturlösung

Zur Kristallisation wurden 9 µl der Proteinlösung mit 9 µl Reservoirlösung (0,1 M Natriumacetat, 1,8 M Natriumformiat, pH 5,2) vermischt. Durch *sitting drop*-Dampfdiffusion konnten nach 5-10 Tagen bei 20°C Kristalle der Ausmaße 0,3 x 0,1 x 0,1 mm³ erhalten werden (Abbildung 4.1-1).

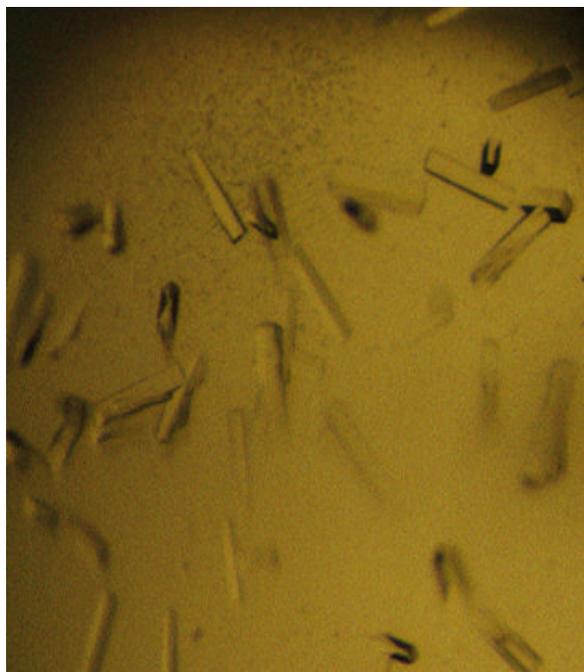


Abbildung 4.1-1 *Kristalle des Caspase-3/BIR2-Komplex*. Zur Kristallisation wurden 9 µl Proteinlösung mit 9 µl Reservoirlösung (0,1 M Natriumacetat, 1,8 M Natriumformiat, pH 5,2) vermischt. Die Kristalle wuchsen nach 5-10 Tagen durch *sitting drop*-Dampfdiffusion.

Mit 30 % Glycerin als Cryoprotektans konnten ein MAD-Datensatz an der *beamline* 9-2 / *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory* (SSRL) mit einer Auflösung bis 2.8 Å und ein nativer Datensatz an der *beamline* 7-1 / SSRL mit einer Auflösung bis 2.7 Å aufgenommen werden. Die Kristalle gehörten der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit Zellkonstanten von $a = 70,5 \text{ \AA}$, $b = 95,5 \text{ \AA}$ und $c = 144,2 \text{ \AA}$ an. Dies ergibt einen Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) von $2.6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ für ein Caspase-Heterotetramer mit jeweils einem gebundenen BIR2 pro katalytischer Einheit in der asymmetrischen Einheit.

Ein niedriger aufgelöster Datensatz (bis 3.3 Å, aufgenommen am Burnham Institute mit einer R-Axis IV *image plate* auf einem Röntgendrehanodengenerator) erlaubte bereits die Positionierung des Caspase-Heterotetramers mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994). Als Suchmolekül wurde hierbei eine Caspase-3 Struktur aus einem Inhibitor-Komplex mit Ac-DEVD-CHO verwendet (PDB-Eintrag: 1PAU (Rotonda et al., 1996)). Die Position von BIR2 konnte jedoch nicht mit der NMR-Struktur von BIR2 (Sun et al., 1999) als Suchmodell gefunden werden. Die anschließende MAD-Phasierung, bei der das intrinsische Zinkion der BIR-Domäne als anomaler Streuer benutzt wurde, lieferte umgehend mit Hilfe des Programms *Solve* (Terwilliger and Berendzen, 1999) die Position der beiden zentralen Zinkionen und eine interpretierbare Elektronendichtekarte. Nach Dichtemodifikation (mit Hilfe des Programms *DM* (Collaborative Computational Project, 1994)) waren beide BIR-Domänen nahezu vollständig sichtbar (siehe 4.1.2) und konnten eindeutig lokalisiert werden. Auch das Caspase-Heterotetramer war vollständig durch die experimentelle Dichte definiert, so daß ein initiales Modell nach *rigid body refinement* und *simulated annealing* (CNS, (Brunger et al., 1998)) R-Faktoren von 35,6 % bzw. 39,6 % (kristallographischer- und freier R-Faktor) ergab. Weitere Zyklen von Modellbau und Verfeinerung unter Einbezug von NCS-Operatoren zwischen beiden katalytischen Domänen der Caspase und den beiden BIR-Molekülen ergaben finale R-Faktoren von 24,9 % und 27,8 % (kristallographischer- und freier R-Faktor). Das finale Modell enthielt die Caspase-3 Reste Ser-148 bis Thr-296 und Ser-310 bis Tyr-401 der einen katalytischen Einheit und Ser-148 bis Asp-297 und Ser-310 bis Tyr-401 der anderen katalytischen Einheit und die Reste Phe-127 bis Ile-237 bzw. Thr-135 bis Ser-169 und Leu-179 bis Asn-236 der daran gebundenen

BIR2-Moleküle (siehe auch 4.1.2). In Tabelle 4.1-1 sind die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken dargestellt.

Kristallographische Datentabelle				
Datenprozessierung				
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
Zellkonstanten, Å	a = 70,5, b = 95,5, c = 144,2			
	<i>native</i>	<i>remote</i>	<i>edge</i>	<i>inflection</i>
Wellenlänge, Å	1,080	1,181	1,282	1,283
Auflösungsbereich, Å	19,92-2,7		19,72-2,8	
gemessene Reflexe	174633	81987	84386	84839
unabhängige Reflexe	27119	23817	23991	24035
Vollständigkeit der Daten, % (gesamt / äußere Schale)	99,4 (99,3)	96,4 (95,7)	95,8 (91,3)	95,9 (91,5)
R_{merge} , % [†] (gesamt / äußere Schale)	6,2 (42,4)	6,2 (45,4)	6,6 (42,3)	6,5 (46,7)
Figure of merit (nach Dichtemodifikation)			0,78	
Verfeinerung				
R_{cryst} , % [*] (gesamt / äußere Schale)	24,8			
R_{free} , % [#] (gesamt / äußere Schale)	27,8			
Anzahl der Reflexe im Arbeits- / Test-Set	25826 / 1244			
<i>r.m.s.</i> -Abweichung von Bindungslängen, Å	0,009			
Bindungswinkel, °	1,30			
Mittlerer B-Faktor, Å ²	56,8			
Anzahl Proteinatome (nicht H-Atome)	5578			
Anzahl der Metallionen	2			
Anzahl der Lösungsmittelmoleküle	13			
[†] $R_{\text{merge}} = \sum S_{\text{hkl}} S_{\text{hkl}}(hkl) - \langle I_{\text{hkl}} \rangle / \sum S_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}(hkl) $, wobei $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ die durchschnittliche Intensität für mehrfache Messung symmetrieverwandter Reflexe darstellt [*] $R_{\text{cryst}} = \sum S_{\text{hkl}} F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} / \sum S_{\text{hkl}} F_{\text{obs}} $ [#] R_{free} berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden				

Tabelle 4.1-1 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik des MAD-Datensatz und des nativen Datensatzes des Caspase-3/BIR2 Komplexes.

4.1.2 Gesamtstruktur des Caspase-3/BIR2 Komplexes

Die Gesamtstruktur des Komplexes (Abbildung 4.1-2) zeigt ein Caspase-Heterotetramer mit jeweils einem BIR2 Inhibitor pro katalytischer Einheit. Wie in Abschnitt 2.2.2 gezeigt, besteht jede dieser katalytischen Einheiten aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, die aus der Aktivierungsspaltung nach der Sequenz Ile-294-Glu-Thr-Asp-297 resultieren. Die in Abbildung 4.1-2 verwendete Caspase-Standard Darstellung senkrecht auf die zentrale β -Faltblattstruktur zeigt, daß die Gesamtstruktur der Caspase-3 im Komplex mit BIR2 sehr ähnlich der von bekannten Caspase Strukturen mit tetrapeptidischen substratähnlichen Inhibitoren ist. Ein Vergleich mit Ac-DEVD-CHO bzw. Ac-DEVD-FMK inhibierten Caspase-3 Strukturen (Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996) ergibt *r.m.s.*-Abweichungen von 0.6 Å und 0.7 Å für die Positionen der Ca-Atome. Das verwendete Caspase-3 Cys-285/Ala Konstrukt enthielt das für *executioner*-Caspasen typisch kurze N-terminale Propeptid von 28 Aminosäuren, das nicht durch Granzym B abgespalten werden kann. Diese Region und vier weitere Reste bis Ile-147 waren jedoch nicht durch Elektronendichte definiert.

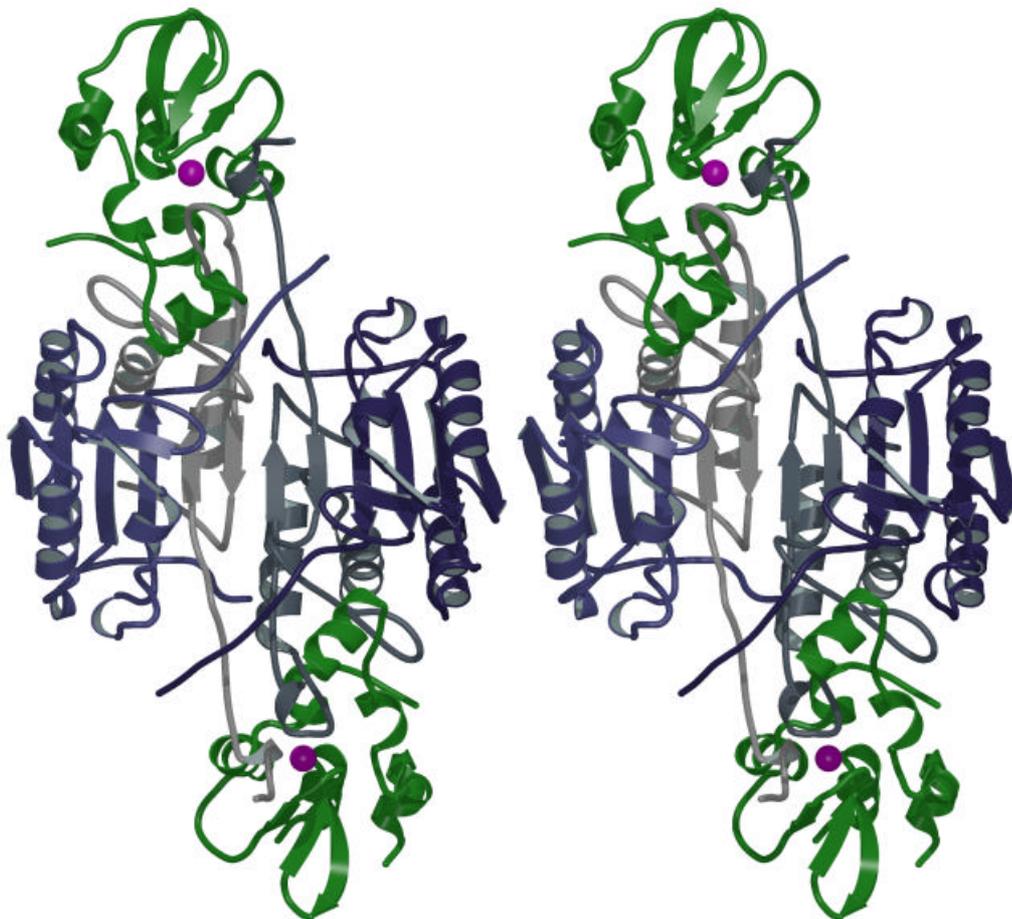


Abbildung 4.1-2 *Gesamtstruktur des Caspase-3/BIR2 Komplexes*. Stereodarstellung des Caspase-3 Heterotetramers in Standard-Caspase-Orientierung mit jeweils einem BIR2-Molekül pro katalytischer Einheit. Die beiden kleinen und beiden großen Untereinheiten der Caspase sind hell- und dunkelgrau bzw. hell- und dunkelblau gefärbt. Die daran gebundenen BIR2-Moleküle sind in grün mit den zentralen Zinkionen in magenta dargestellt. Die Region von Phe-170 bis His-179 ist im „unteren“ BIR2-Molekül aufgrund der fehlenden Elektronendichte nicht dargestellt.

Über die Substratbindungsregion beider katalytischer Einheiten der Caspase erstrecken sich jeweils ein gebundenes BIR2 Inhibitormolekül, um einen 95 kDa Komplex der Ausmaße $100 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$ zu bilden. Die beiden BIR2 Moleküle in der asymmetrischen Einheit sind fast völlig identisch bis auf die durch unterschiedliche Kristallkontakte verursachte verschiedene Flexibilität der Inhibitormoleküle. Als Folge dessen fehlt die Elektronendichte für einen zehn Reste langen *Loop* der BIR2-Domäne distal von der Caspase-Bindungsregion (Phe-170 bis

His-179). Auch am N-Terminus dieses BIR2-Moleküls konnten im Vergleich zum anderen Inhibitormolekül acht Reste (Phe-127-Glu-134) weniger zugeordnet werden.

Die Struktur der BIR2-Domänen im Komplex ist ähnlich der des ungebundenen BIR2 in NMR-spektroskopischen Untersuchungen (Sun et al., 1999). Eine Überlagerung der Ca-Atome beider Modelle für die Reste Tyr-161 bis Leu-231 ergibt eine r.m.s.-Abweichung von 1.2 Å. Die BIR2-Domäne selbst zeigt eine globuläre Gestalt bestehend aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt und vier Helices. Das Zinkion wird von den Seitenketten der Reste Cys-200, Cys-203, His-220 und Cys-227 chelatisiert, die sich im sequentiell hinteren Faltblattstrang sowie den beiden darauf folgenden Helices befinden.

Die *Linker*-Region von BIR2 ist von Phe-127 (bzw. Thr-135) bis zum Beginn der BIR-Domäne gut in der Elektronendichte definiert. Reguläre Sekundärstrukturelemente in dieser Region sind eine Helix von Thr-135 bis Thr-143, sowie kurze helikale Windungen von Ile-149 bis Ile-153 und Asn-157 bis Tyr-161.

4.1.3 Bindung des Inhibitors

Die Interaktionsfläche von BIR2 mit Caspase-3 ist in Abbildung 4.1-3 dargestellt. Sie erstreckt sich von der N-terminalen Helix des Inhibitors, die im Bereich des katalytischen Zentrums der Caspase liegt, über den Rest des *Linkers*, der durch die Substratbindungsrinne verläuft, bis zur eigentlichen BIR2-Domäne. Diese bindet neben den bekannten Substratbindungsstellen an sekundärer Stelle. Insgesamt bindet jedes BIR2 Molekül über eine Fläche von 2600 Å² an die Caspase. Eine Einteilung der Bindungsregionen von BIR2 in die N-terminale Helix-*Linker* Region (bis Val 146) und die *Linker*-BIR-Domänenregion (ab Asp 148) läßt die im Folgenden beschriebenen Interaktionen erkennen.

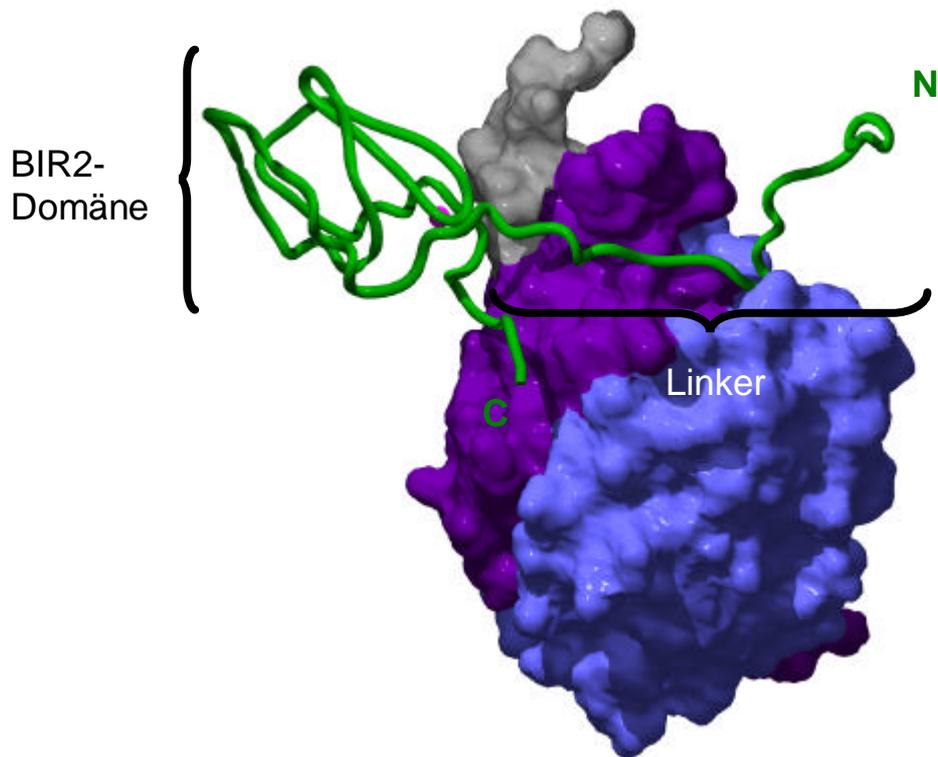


Abbildung 4.1-3 *Bindung des Inhibitors*. Oberflächendarstellung von Caspase-3 in Standard-Protease-Orientierung mit den Substratbindungstaschen S4-S1 von links nach rechts verlaufend. Gezeigt sind die Oberfläche einer katalytischen Einheit, wobei die große Untereinheit blau und die kleine Untereinheit lila eingefärbt sind, und die Oberfläche des N-Terminus der kleinen Untereinheit der anderen katalytischen Einheit (grau). Das gebundene BIR2-Molekül ist wieder in grün mit dem Zinkion in magenta gefärbt. Gekennzeichnet sind der *Linker*, der nach der N-terminalen Helix durch die Substratbindungsrinne der Caspase verläuft und die eigentliche BIR-Domäne, die an sekundärer Stelle zu liegen kommt.

4.1.3.1 Bindung der N-terminalen Helix-Region von BIR2 an Caspase-3

Abbildung 4.1-4 zeigt eine Vergrößerung dieser Region. Es wird ein Netzwerk hydrophober Reste im C-terminalen Bereich der *Linker*-Helix (Leu-140, Leu-141 und Val-146) von BIR2 mit den Seitenketten von Leu-290, Tyr-338, Trp-340 und Phe-381h deutlich. Die zentrale Position von Leu-141 läßt den Verlust inhibitorischer Aktivität einer Leu-141-Ala Mutation (Sun et al., 1999) erklären. Auch Val-146 und damit der Verlauf des Polypeptidstranges jenseits der N-terminalen Helix wird von diesem hydrophoben Netzwerk beeinflusst. Die korrekte Positionierung der N-terminalen Helix von BIR2 und des daran angrenzenden Bereichs über dem

katalytischen Zentrum der Caspase (siehe auch 4.1.4) wird zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt, an denen die Reste Asp-138, Thr-143, Gly-144, Val-146 von BIR2 und Gly-175c, Thr-177, Tyr-338, Arg-341 von Caspase-3 beteiligt sind. So wird der *Linker* von BIR2 fixiert und ist in der Elektronendichte eindeutig definiert (Abbildung 4.1-4).

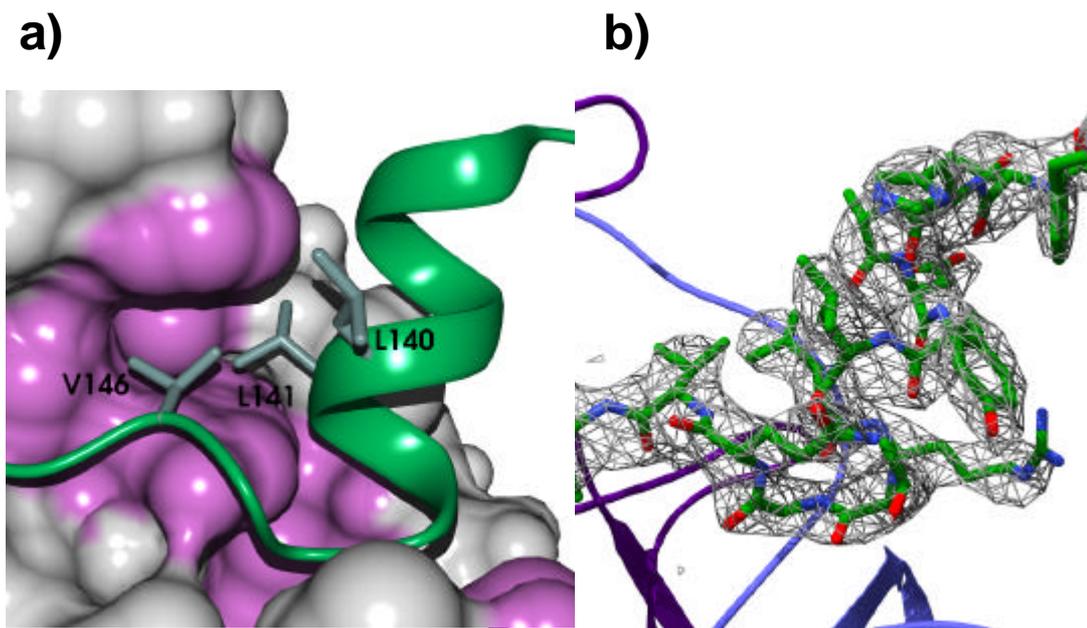


Abbildung 4.1-4 *Bindung der N-terminalen Helix und der daran anschließenden Region des Linkers von BIR2 an Caspase-3.* **a)** Oberflächendarstellung der Caspase mit dem gebundenen BIR2 in grüner Bänderdarstellung. Hydrophobe Bereiche der Caspase-Oberfläche sind violett gezeichnet. Die N-terminale Helix und der daran angrenzende Bereich von BIR2 wird direkt über dem katalytischen Zentrum der Caspase (siehe auch 4.1.4) positioniert. Dies geschieht neben der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen vor allem über eine hydrophobe Interaktionsfläche. An dieser sind die BIR2-Reste Leu-140, Leu-141 und Val-146 beteiligt, deren Seitenketten in Stabrepräsentation dargestellt sind. **b)** $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte für BIR2 (bei 1,5 Å konturiert). Während in der NMR-Struktur von BIR2 nur ein Teil der Helix strukturiert vorlag und der Rest des *Linkers* flexibel war, sind hier in der Kristallstruktur von Caspase-3/BIR2 die N-terminale Helix und der Rest des *Linkers* strukturiert und gut in der Elektronendichtekarte definiert.

4.1.3.2 Bindung der *Linker*-Reste Val-147 bis Arg-156 und der BIR2-Domäne

Auch die zweite Interaktionsfläche ist durch ein hydrophobes Netzwerk (Reste Ile-149, Ile-153, Tyr-154, Phe-228 von BIR2 und Met-316', His-319', Phe-380, Phe-381b, Phe-381d der Caspase, Abbildung 4.1-5) und

Wasserstoffbrückenbindungen charakterisiert. Neben dem anschließend diskutierten Rest Asp-148 sind die BIR2 Reste Ile-149, Asp-151, Ile-153, Asn-226 und Arg-233 an Wasserstoffbrückenbindungen mit den Caspase Resten His-319, Arg-341, Asn-342, Ser-343, Lys-344, Glu-381, Phe-381b und Phe-381d beteiligt. Auf diese Weise wird der kurze helikale Abschnitt von Ile-149 bis Ile-153, sowie die globuläre BIR2-Domäne an die Caspase gebunden.

Eine zentrale Rolle bei der Inhibition von Caspasen durch BIR2 spielt der BIR2-Rest Asp-148. Die Mutation dieses Restes zu Alanin hat einen vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität von BIR2 zur Folge (Sun et al., 1999). Diese Ergebnisse können durch die Komplexstruktur erklärt werden. Zum einen sind sowohl die Seitenkette, als auch Carbonyl- und Amidfunktion von Asp-148 in Wasserstoffbrückenbindungen zu den Caspase-Resten Arg-341, Ser-343, Lys-344, Trp-348 (Abbildung 4.1-5) involviert. Zum anderen bildet die Carboxylgruppe von Asp-148 zusätzliche eine vom Lösungsmittel abgeschirmte Salzbrücke mit Arg-233 am C-terminalen Ende der BIR2-Domäne aus und klammert so die helikale Region von Ile-149 bis Ile-153 und die BIR2-Domäne an Caspase-3.

Die interagierenden Reste von Caspase-3 stammen fast alle von der kleinen Untereinheit der inhibierten katalytischen Einheit. Ein Teil der Bindungsfläche wird jedoch vom N-Terminus der kleinen Untereinheit der zweiten katalytischen Einheit gebildet, der die oben genannten Reste Met-316', das in der Nähe des Zinkions von BIR2 zu liegen kommt, und His-319' bereitstellt (Abbildung 4.1-5).

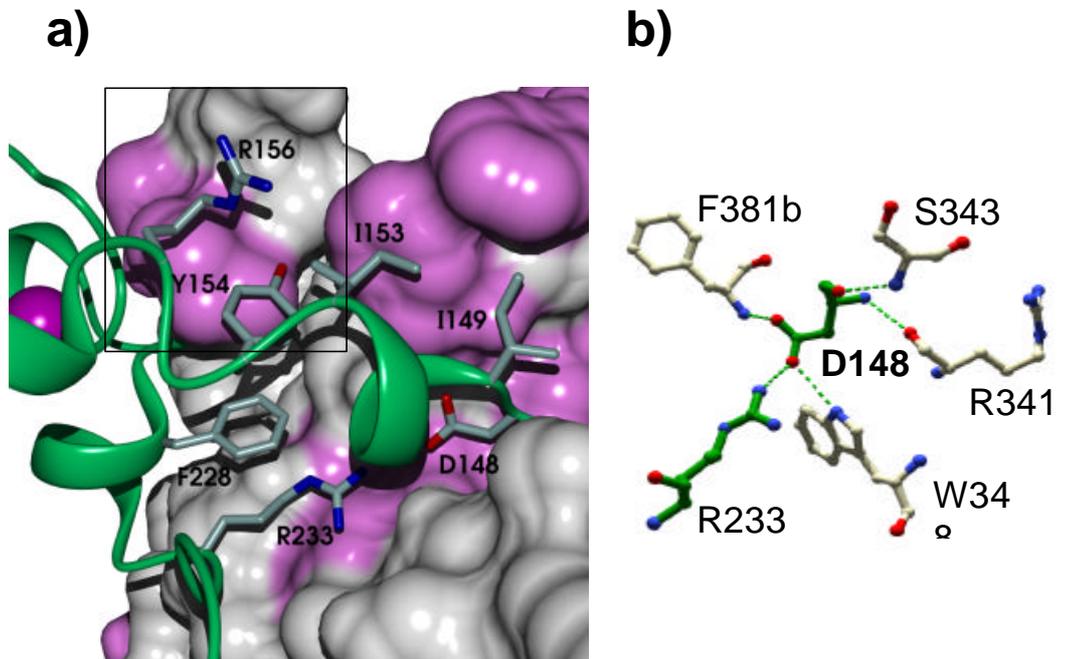


Abbildung 4.1-5 *Bindung des restlichen Linkers und der BIR2-Domäne.* **a)** Oberflächendarstellung der Caspase mit dem gebundenen BIR2 in grüner Bänderdarstellung. Hydrophobe Bereiche der Caspase-Oberfläche sind violett gezeichnet. Der Oberflächenanteil der durch den N-Terminus der anderen katalytischen Einheit gebildet wird, ist durch einen Rahmen gekennzeichnet. Das BIR-Molekül ist in grüner Bänderdarstellung mit dem Zinkion in magenta dargestellt. Es wird eine Interaktionsfläche deutlich, die von einem helikalen *Turn* des *Linkers* und der BIR-Domäne von BIR2 gebildet wird und die hydrophoben Reste Ile-149, Ile-153, Tyr-154, Arg-156 und Phe-228 einschließt. Auf Caspase-Seite sind hauptsächlich Reste des 381-Insertions-*Loops*, überraschenderweise jedoch auch Reste der N-terminalen Region der kleinen Untereinheit der anderen katalytischen Einheit an dieser Interaktion beteiligt. Auch die zentrale Rolle des BIR2-Rests Asp-148 wird deutlich. Dieser Rest bildet eine verborgene Salzbrücke zu Arg-233 von BIR2 aus und verknüpft so den helikalen *Turn* des *Linkers* und die BIR-Domäne. **b)** Neben dieser Salzbrücke geht Asp-148 eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Caspase-Resten Arg-341, Ser-343, Trp-348 und Phe-381b ein (BIR2-Reste sind grün gefärbt).

4.1.4 Mechanismus der Inhibition – Vergleich mit peptidischen Inhibitoren

Der Mechanismus der Inhibition von Caspasen durch BIR2 wird deutlich beim Vergleich des Caspase-3/BIR2 Komplexes mit einer Caspase-3 Struktur im Komplex mit dem tetrapeptidischen Inhibitor Ac-DEVD-CHO (Rotonda et al., 1996), der in substratähnlicher Weise an Caspase-3 bindet. In Abbildung 4.1-6. ist der tetrapeptidischen Inhibitor dem Caspase-3/BIR2 Komplex überlagert. Auf dem ersten

Blick wird deutlich, daß der *Linker* zwischen der N-terminalen Helix und der BIR2-Domäne in umgekehrter Richtung (im Vergleich zum substratähnlichen Inhibitor) durch die Substratbindungsrinne verläuft.

Genau über der S1-Bindetasche und dem katalytischen Cys-285 (hier Ala-285) kommt die N-terminale Helix zu liegen. Dies hat einen sterischen Block des katalytischen Zentrums zur Folge. Zusätzlich verhindern die oben genannten Wechselwirkungen eine Annäherung des Proteinrückgrates von BIR2 an das katalytische Cystein (hier Alanin). Dadurch kommt kein Carbonyl-Kohlenstoffatom von BIR2 diesem näher als 5.8 Å, was eine Spaltung des Inhibitors *a priori* ausschließt. Im weiteren verläuft die Polypeptidkette zwar in gestreckter Konformation entlang der Substratbindungsrinne und blockiert diese, kommt aber „über“ den Substratbindungstaschen (vgl. Abbildung 4.1-6) zu liegen. Nur die Interaktion von Asp-148 kann mit einer Bindung in die S4 Bindungstasche, wie sie von peptidischen Inhibitoren besetzt wird, verglichen werden. Die Positionen der Ca- und C^γ-Atome von Asp-148 sind jedoch um 1.6 Å bzw. 1.3 Å gegenüber dem N-terminalen Aspartat des substratähnlichen Inhibitors verschoben.

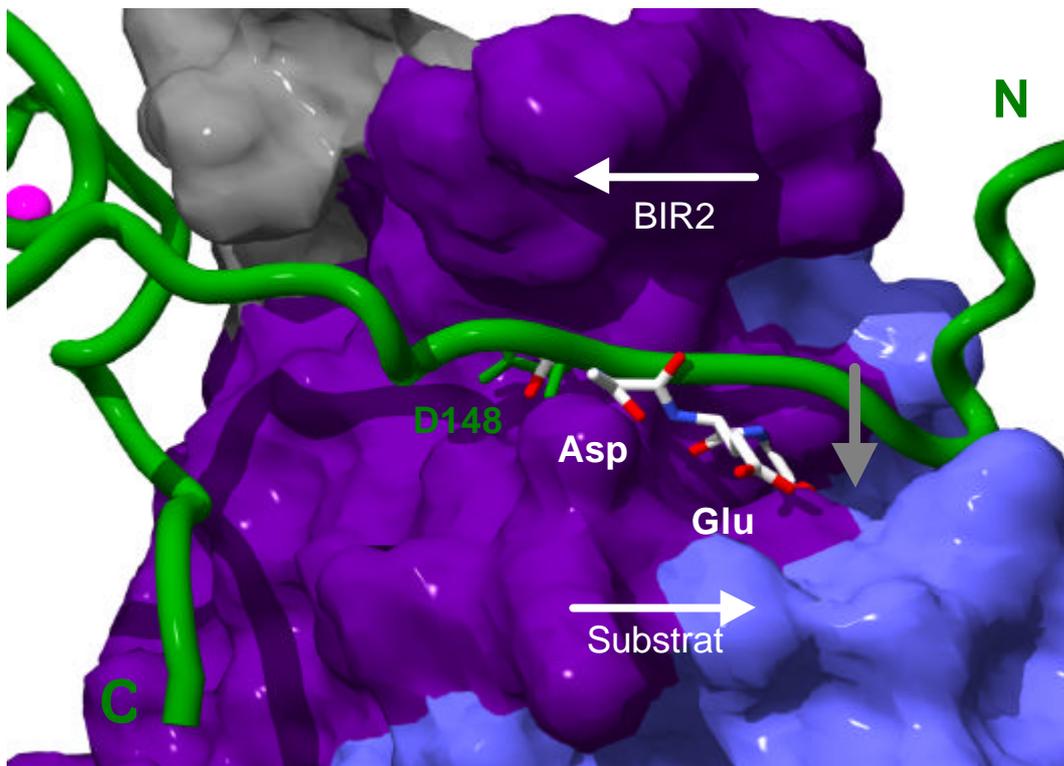


Abbildung 4.1-6 *Mechanismus der Inhibition von Caspase-3 durch BIR2*. Caspase-3 und BIR2 sind analog Abbildung 4.1-3 dargestellt. Dem Komplex wurde der Inhibitor Ac-DEVD-CHO aus einer anderen Caspase-3 Struktur (pdb-Eintrag: 1PAU, (Rotonda et al., 1996)) überlagert. Während dieser in substratartiger Weise bindet und dessen C-terminaler Aspartatrest völlig in der S1-Tasche des Enzyms (grauer Pfeil) verborgen liegt, sind keine der Substratbindungstaschen von BIR2 Resten besetzt. Das kritische Asp-148 kommt in der Nähe des Aspartats in der P4 Position zu liegen. Die N-terminale Helix des *Linkers* von BIR2 ist „über“ dem aktiven Zentrum positioniert und blockiert dieses. Im weiteren Verlauf erstreckt sich der *Linker* durch die Substratbindungsrinne und blockiert diese, verläuft jedoch entgegengesetzt zur Substratbindungsrichtung.

4.1.5 Kristallkontakte

Im Caspase-3/BIR2 Kristall sind vornehmlich BIR2-Moleküle an Kristallkontakten beteiligt. Ein Kristallkontakt umfaßt die N-terminale Helix von BIR2, Bereiche der inhibierten Caspase und die BIR2-Domäne des im Kristall benachbarten Moleküls (Abbildung 4.1-7). Dieser Kristallkontakt wird nur von einer der beiden inhibierten katalytischen Einheiten gebildet und hat eine bessere Definition der beteiligten Partner in der Elektronendichte zur Folge. Vor allem der stabilisierende Effekt dieser Interaktion auf die N-terminale Helix von BIR2, die über dem katalytischen Zentrum zu liegen kommt, könnte von Interesse für die Inhibition sein (durchschnittlicher

Temperaturfaktor der Helix: 49 \AA^2 gegenüber 61 \AA^2 der über NCS verwandten Helix).

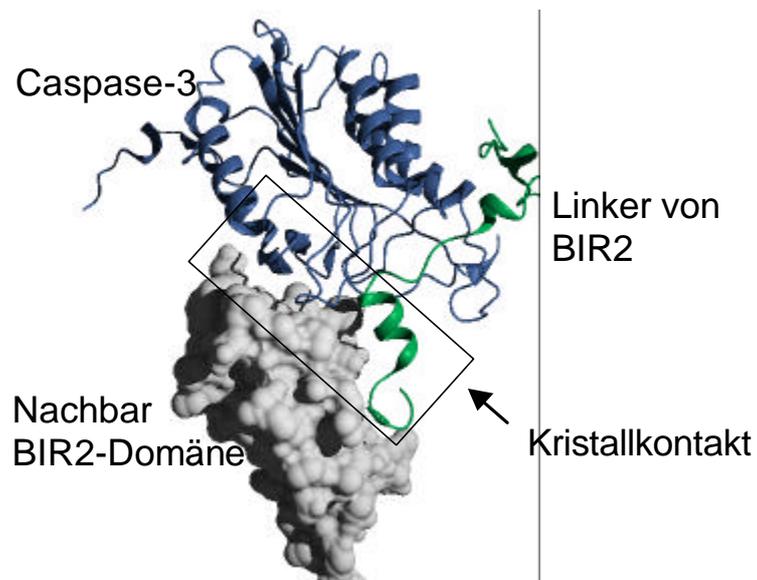


Abbildung 4.1-7 Die N-terminale Helix eines der beiden BIR2-Moleküle wird durch den Kristallkontakt mit einer Nachbar-BIR-Domäne stabilisiert. Dargestellt ist eine katalytische Einheit von Caspase-3 (blau) und der Linker-Bereich des daran gebundenen BIR2 (grün). Die BIR-Domäne des Kristallnachbars ist in Oberflächendarstellung gezeigt.

Ein weiterer, äußerst interessanter Kristallkontakt ist in Abbildung 4.1-8 dargestellt. Dieser besteht aus einer Bindung des N-Terminus der kleinen Caspase-Untereinheit (blau in Abbildung 4.1-8a) mit einer Bindungstasche auf der Oberfläche der BIR-Domäne des Kristallnachbars. Zusätzlich bindet der entsprechende N-Terminus des Nachbarkomplexes in symmetrischer Weise an die BIR-Domäne des betrachteten Moleküls (grün in Abbildung 4.1-8a). Die Abbildung zeigt, daß es sich bei besagten N-Termini, jeweils um den N-Terminus der kleinen Untereinheit der „anderen“ katalytischen Einheit handelt, also nicht der durch das dargestellte BIR2-Molekül inhibierten Einheit. Dieser nimmt in der oben beschriebenen Weise an der Interaktionsfläche der BIR-Domäne mit dessen „inhibierter“ katalytischen Caspase-Einheit teil und verläuft dann weiter in die Bindungstasche der Nachbar-BIR-Domäne. Der N-Terminus kommt in einer negativ geladenen Region (bedingt durch die Carboxylgruppen der BIR2 Reste Asp-214 und Glu-219) am Ende der Tasche zu

liegen. Des Weiteren bilden die Caspase Reste (Ser-310 bis Asp-315) Wasserstoffbrücken und weitere hydrophobe Kontakte mit BIR2-Resten in der Bindungstasche aus. Erstaunlicherweise ist diese Bindungstasche identisch mit der Region, die auf der BIR3-Domäne von XIAP als Smac Bindungstasche (siehe Einleitung 2.3.2.3, Seite 17) identifiziert wurde (Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). Auch die Interaktionen der ersten drei Reste des Caspase-N-Terminus mit BIR2 ähneln denen von Smac/DIABLO mit BIR3 stark (Abbildung 4.1-8b).

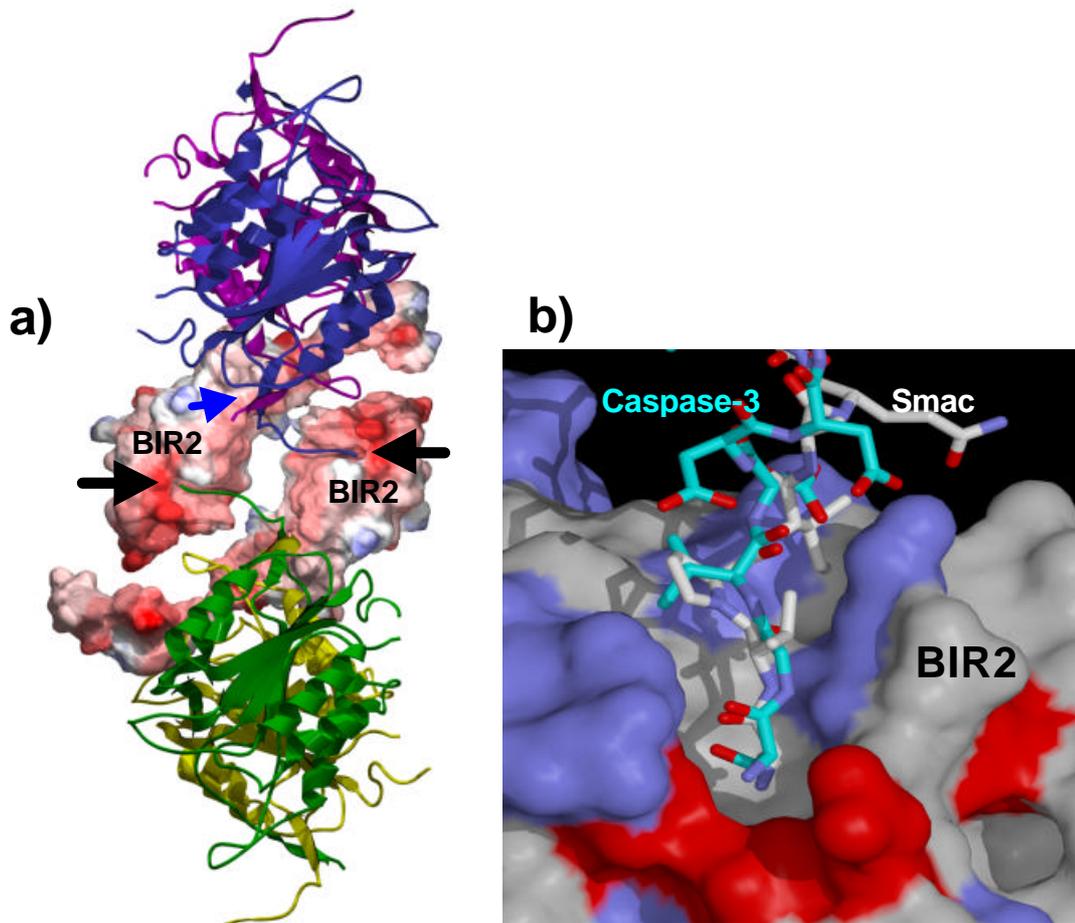


Abbildung 4.1-8 Die N-Termini der kleinen Untereinheit der „anderen“ katalytischen Einheit binden in die „Smac-Bindungstaschen“ auf der BIR-Domäne des Kristallnachbars. **a)** Gezeigt sind zwei benachbarte Caspase-3 Heterotetramere in Bänderdarstellung mit jeweils einem der beiden BIR2-Moleküle in Oberflächendarstellung, die nach elektrostatischem Potential eingefärbt ist. Die katalytischen Einheiten der Caspasen sind blau und lila bzw. grün und gelb dargestellt. Der Kristallkontakt wird im Folgenden ausgehend von der in der Darstellung oben liegenden Caspase beschrieben. Das dargestellte BIR2-Molekül inhibiert hier die lila eingefärbte katalytische Einheit. Wie in 4.1.3.2 beschrieben, verläuft die N-terminale Region der kleinen Untereinheit der anderen katalytischen Einheit (blau) durch die Interaktionsfläche der BIR-Domäne mit der inhibierten Caspase (blauer Pfeil). Der eigentliche N-Terminus ist in einer Oberflächentasche der BIR-Domäne des kristallographischen Nachbarn gebunden. Diese Bindungstasche von BIR2 und die homologe Region auf BIR3 von XIAP sind für die Bindung des IAP-Antagonisten Smac (siehe auch 2.3.2.3 und 4.3.3) verantwortlich und werden daher als „Smac-Bindungstaschen“ bezeichnet. Aufgrund der Symmetrie dieses Kristallkontakts kommt es zu einer dimeren Anordnung dieser Interaktion. **b)** Überlagerung des Smac-N-Terminus aus der Smac-BIR3 Komplexstruktur (Chai et al., 2000) auf den Caspase-BIR2 Kristallkontakt. Die BIR2 Oberfläche ist nach sauren und basischen Resten in rot bzw. blau eingefärbt.

4.2 Struktur des Caspase-7/BIR2 Komplexes - Vergleich mit dem Caspase-3/BIR2 Komplex

4.2.1 Expression, Kristallisation, Strukturlösung des Caspase-7/BIR2 Komplexes

Expression, Reinigung, Prozessierung, Isolierung des Komplex

Für die Kristallisation des Caspase-7/BIR2 Komplexes erfolgte die Expression, Reinigung, Komplexformation und Isolierung wie für den Caspase-3/BIR2 Komplex beschrieben (siehe 4.1.1). Es wurde eine katalytisch inaktive Caspase-7 Cys-285-Ala Mutante mit C-terminalem His-tag verwendet, deren rekombinante Expression eine Ausbeute von ca. 15 mg/ml Protein pro Liter Medium ergab. Diese wurde, wie in 4.1.1 beschrieben, mit Granzym B gespalten (Spaltungseffizienz: > 90 %) und dadurch in die „aktive“ Form überführt. Der BIR2 Inhibitor wurde wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben aus einem GST-Fusionsprotein erhalten. Der Komplex (Molekulargewicht: 98 kDa) wurde gebildet, über Gelfiltration isoliert (apparentes Molekulargewicht: ca. 96 kDa) und auf eine Konzentration von 7,5 mg/ml konzentriert. Die Integrität der Konstrukte wurde durch Gelelektrophorese und Edman-Abbau überprüft, wobei ein geringfügiger Teil das Caspase-7 Cys-285-Ala Konstrukts einen um 44 Reste verkürzten N-Terminus in der großen Untereinheit aufwies (siehe auch 4.4.1).

Kristallisation und Strukturlösung des Caspase-7/BIR2 Komplexes

Zur Kristallisation wurden 2 µl Proteinlösung mit 1 µl Reservoirlösung (10 % (w/v) PEG-3000, 0,2 M Natriumchlorid, 100 mM Natriumphosphat/-citrat-Puffer (3.4.1), pH 4,2) vermischt. Nach ca. 20 Tagen konnten Kristalle der Ausmaße 0,2 x 0,1 x 0,1 mm³ mittels *sitting drop* Dampfdiffusion erhalten werden (Abbildung 4.2-1). Ein Kristall des Caspase-7/BIR2 Komplexes lieferte an der *beamline* 7-1 des SSRL einen Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,9 Å.



Abbildung 4.2-1 *Kristall des Caspase-7/BIR2 Komplexes*. Zur Kristallisation wurden 2 μ l Proteinlösung mit 1 μ l Reservoirlösung (10 % (w/v) PEG-3000, 0,2 M Natriumchlorid, 100 mM Natriumphosphat/-citrat-Puffer (siehe 3.4.1), pH 4,2) vermischt. Kristalle wuchsen nach ca. 20 Tagen durch *sitting drop*-Dampfdiffusion.

Automatisches Indizieren unter Verwendung des Programms *Denzo* (Otwinowski and Minor, 1997) ergab unter Berücksichtigung der systematischen Auslöschungen die trigonale Raumgruppe $P3_221$ mit den Zellkonstanten $a = b = 88,1 \text{ \AA}$, $c = 186,5 \text{ \AA}$. Erstaunlicherweise weicht diese in den Zellkonstanten weniger als 2 % von der für Caspase-7 im Komplex mit Ac-DEVD-CHO ab (Wei et al., 2000). Diese Packung erlaubt also zusätzlich die Präsenz der globulären BIR-Domäne (siehe auch 4.2.2). Für ein Caspase-7 Heterotetramer und zwei daran gebundene BIR2 Moleküle ergibt sich ein Matthews-Koeffizient von $2,1 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Mit Hilfe der Patterson-Suchmethode konnte das Caspase-7 Heterotetramer aus einer anderen Caspase-7/BIR2 Struktur (Huang et al., 2001) positioniert werden. Rotations- und Translationssuche mit dem Programm *MOLREP* (Collaborative Computational Project, 1994) ergaben klar abgehobene Lösungen, die zu einem Korrelationswert von 0,705 und einem R-Faktor von 40,7 % führten.

Ein erster Verfeinerungszyklus (mit CNS, (Brunger et al., 1998)) ergab R-Faktoren von 31,1 % bzw. 33,4 % (kristallographischer- und freier R-Faktor). Mit diesem Modell berechnete $2F_o - F_c$ bzw. $F_o - F_c$ Elektronendichtekarten zeigten eindeutig die Präsenz des *Linkers* von BIR2 in der Substratbindungsrinne von Caspase-7. Dieser

konnte in die Dichte eingebaut werden und nach mehreren Bau- und Verfeinerungszyklen konnte ein finales Modell mit den R-Faktoren 23,4 und 27,5 (kristallographischer- und freier R-Faktor) erhalten werden. Das finale Modell beinhaltet die Caspase-7 Reste Thr-150 bis Gln-295 und Arg-318 bis Gln-402 der einen katalytischen Einheit und Pro-149 bis Gln-295 und Arg-318 bis Ser-401 der anderen katalytischen Einheit und Glu-134 bis Ser-150 bzw. Glu-134 bis Ser-150 der daran gebundenen BIR2-Moleküle (siehe auch 4.2.2). In Tabelle 4.2-1 sind die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken dargestellt.

Kristallographische Datentabelle	
Raumgruppe	P3 ₂ 21
Zellkonstanten	a = b = 88,13,
Auflösungsbereich, Å	39,84-2,90
gemessene Reflexe	92536
unabhängige Reflexe	18981
Vollständigkeit der Daten, % (gesamt / äußere Schale)	98,5 (93,9)
R_{merge} , % [†] (gesamt / äußere Schale)	5,1 (27,7)
R_{cryst} , % [*] (gesamt / äußere Schale)	23,4 (31,2)
R_{free} , % [#] (gesamt / äußere Schale)	27,5 (35,9)
Reflexe im Arbeits- / Test-Set	18077 / 914
<i>r.m.s.</i> -Abweichung von Idealwert der Bindungslängen, Å	0,007
Bindungswinkel, °	1,32
Mittlerer B-Faktor, Å ²	53,03
Anzahl Proteinatome (nicht H-Atome)	4021
Anzahl der Lösungsmittelmoleküle	25
[†] $R_{\text{merge}} = \sum_i S_i I_i(\text{hkl}) - \langle I_{\text{hkl}} \rangle / \sum_i S_i I_i(\text{hkl})$, wobei $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ die durchschnittliche Intensität für mehrfache Messung symmetrieverwandter Reflexe darstellt [*] $R_{\text{cryst}} = \sum_i S_i F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} / \sum_i S_i F_{\text{obs}} $ [#] R_{free} berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden	

Tabelle 4.2-1 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik der Caspase-7/BIR2 Komplexstruktur.

4.2.2 Gesamtstruktur des Komplexes

In der Caspase-7/BIR2 Struktur besteht die asymmetrische Einheit, wie in der Caspase-3/BIR2 Struktur, aus einem Caspase-Heterotetramer mit jeweils einem BIR2 Inhibitor pro katalytischer Einheit. Auch das Caspase-7 Heterotetramer zeigt fast keinerlei Veränderung gegenüber einer bekannten Caspase-7 Struktur im Komplex mit dem peptidischen Inhibitor Ac-DEVD-CHO (*r.m.s.*-Abweichung für die Positionen der Ca-Atome beträgt 0,9 Å). Analog der Caspase-3/BIR2 Struktur ist im

Caspase-7/BIR2 Komplex das N-Peptid von Caspase-7 vorhanden, jedoch aufgrund seiner Flexibilität ebenfalls nicht in der Elektronendichte sichtbar (vergleiche 4.4.1). Die Bindung des Inhibitors gleicht der für Caspase-3 beschriebenen mit der wichtigen Ausnahme, daß nur die Reste Glu-134 bis Ser-150 des *Linkers* von BIR2 in der Elektronendichte zu erkennen sind und der Rest des Linkers und die gesamte BIR-Domäne nicht definiert sind. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls von zwei anderen Gruppen gefunden, obwohl *Linker* und BIR-Domäne von BIR2 physikalisch im Kristall vorhanden waren (Chai et al., 2001a; Huang et al., 2001). Das Fehlen der Elektronendichte für die BIR-Domäne wird in erster Linie dem Fehlen jeglicher Kristallkontakte der BIR2-Moleküle zugeschrieben, was im vorliegenden Komplex zu einer erhöhten Flexibilität der BIR2-Domäne und daran angrenzender Sequenz-Bereiche führt. Ein weiterer Grund könnte aber auch in einer unterschiedlichen Bindung der Domäne liegen (siehe auch 4.3.1 und 4.3.3).

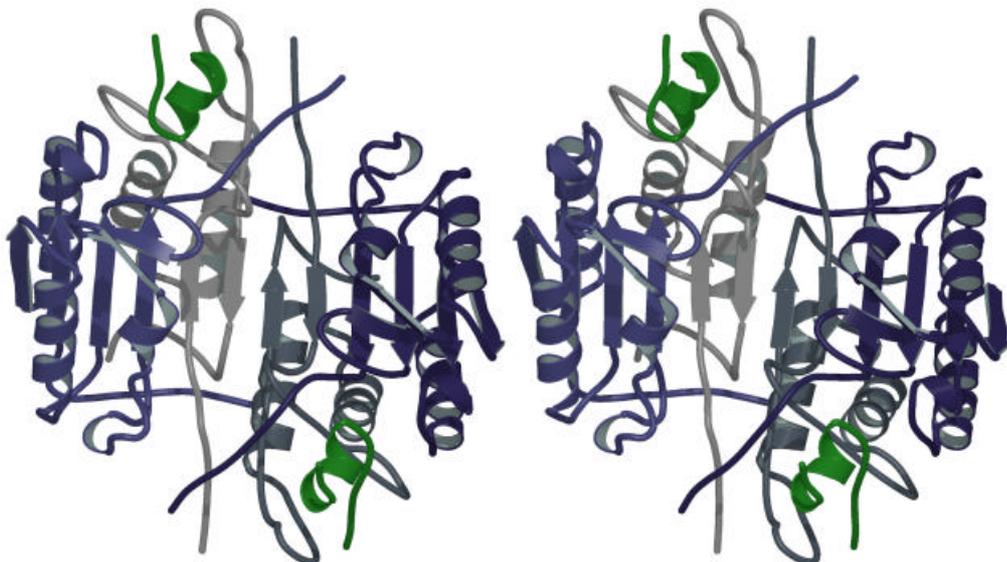


Abbildung 4.2-2 *Gesamtstruktur des Caspase-7/BIR2 Komplexes*. Stereodarstellung in der Standard-Caspase-Orientierung des Caspase-7 Heterotetramers mit jeweils einem BIR2-Molekül pro katalytischer Einheit. Die beiden kleinen und beiden großen Untereinheiten der Caspase sind hell- und dunkelgrau bzw. hell- und dunkelblau gefärbt. Die beiden BIR2-Moleküle sind in grün gezeichnet. Die Darstellung beinhaltet nur die Reste Glu-134 bis Ser-150 des *Linkers* von BIR2, da der Rest des *Linkers* und die BIR-Domäne nicht durch Elektronendichte definiert waren.

4.2.3 Bindung von BIR2 an Caspase-7 - Spezifität von BIR2 für Caspase-3/-7

Wie im Caspase-3/BIR2 Komplex beginnen im Caspase-7/BIR2 Komplex die interagierenden Reste von BIR2 mit Asp-138 in der N-terminalen Helix von BIR2 und erstrecken sich über den Rest der Helix und den angrenzenden Bereich des *Linkers*, können jedoch aufgrund der fehlenden Dichte nicht über Ser-150 hinaus beobachtet werden (Abbildung 4.2-3).

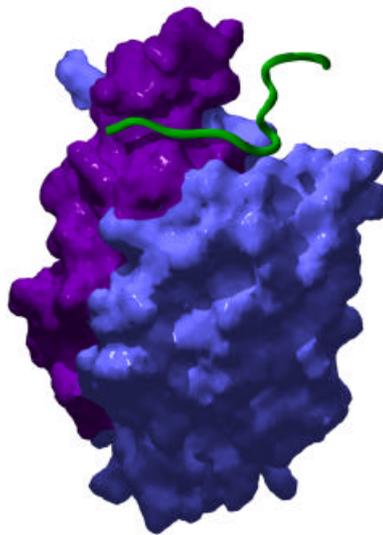


Abbildung 4.2-3 *Bindung von BIR2 an Caspase-7*. Die Darstellung des Komplexes erfolgt wie in Abbildung 4.1-3 mit großer und kleiner Untereinheit von Caspase-7 in Oberflächenrepräsentation (blau bzw. lila) und BIR2 als Schlauchmodell (grün). Die N-terminale Helix bindet über dem reaktiven Zentrum und blockiert dieses in analoger Weise zum Caspase-3/BIR2 Komplex. Der Rest des *Linkers* verläuft in umgekehrter Richtung (im Vergleich zur Substratbindung) durch die Substratbindungsrinne, ist jedoch nach dem Rest Ser-150 nicht mehr definiert. Auch für die gesamte BIR-Domäne konnte keine Elektronendichte gefunden werden.

Fast identisch mit dem Caspase-3/BIR2 Komplex nehmen die Reste Leu-140, Leu-141 und Val-146 von BIR2 an einem hydrophoben Netzwerk mit den Resten Leu-290, Tyr-338, Trp-340 und Phe-381h teil. Diese Reste sind nur in Caspase-3 und -7 konserviert und bilden dadurch ein Hauptspezifitätsmerkmal. Andere Caspasen weisen hier verschiedene Reste auf. Der Rest Phe-381h, zum Beispiel, befindet sich im „381-Insertions-Loop“, der in dieser Länge nur bei den *executioner*-Caspasen vorkommt. Doch schon die *executioner*-Caspase-6, die nicht von XIAP inhibiert

wird, zeigt einen Alanin-Rest in Position 381h und hat von den oben genannten Resten nur Tyr-338 mit Caspase-3/7 gemeinsam. Die Interaktion von BIR2 mit den Caspase Resten Phe-381h und Tyr-338 ist von speziellem Interesse. Bilden sie in Strukturen mit peptidischen substratähnlichen Inhibitoren zusammen mit Trp-340 die S2 Bindungstasche aus (Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Wei et al., 2000), so zeigen sie im Komplex der Caspasen mit BIR2 eine veränderte Konformation. Gegenüber der substratähnlichen Bindung sind die Seitenketten von Phe-381h und Tyr-338 um 70° bzw. 85° um die C β -C γ bzw. Ca-C β Bindung rotiert. Aufgrund der strikten Selektion der Caspasen für die P1 und auch P4 Position des Substrates spielt jedoch die S2-Tasche eine untergeordnete Rolle in der Substratbindung. BIR2 jedoch benutzt diese Reste als Bindungspartner um die N-terminale Helix und damit den Kern der sterischen Blockade über dem katalytischen Zentrum zu positionieren. Inhibitor Design-Versuche in jüngerer Zeit gebrauchen ebenfalls diese S2-Reste um eine höhere Spezifität in der Inhibition von Caspase-3 und -7 zu erreichen (Lee et al., 2000; Lee et al., 2001).

4.3 Inhibition von Caspasen durch IAPs

4.3.1 Rolle der *Linker*-Region und der BIR-Domäne

Die Struktur des Caspase-3(-7)/BIR2 Komplexes zeigt einen erstaunlichen Inhibitionsmechanismus auf. XIAP gebraucht nicht nur die BIR2-Domäne, sondern einen weitgehend flexiblen Bereich aus der Sequenz zwischen den BIR1- und BIR2-Domänen, um eine effektive, reversible Inhibition der *executioner*-Caspasen-3 und -7 zu erreichen (Chai et al., 2001a; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001b). Dieser Bereich, der *Linker* von BIR2, ist in Lösung bis auf eine Helix in seiner N-terminalen Region völlig flexibel. Er scheint jedoch von der Natur im Laufe der Evolution dazu optimiert worden zu sein, das aktive Zentrum von Caspase-3 und -7 zu blockieren, um dann entgegen der gemeinen Bindungsrichtung von Substraten durch die Substratbindungsfurche zu verlaufen. Die Folge ist eine effektive, reversible Inhibition der Caspasen. Die BIR2-Domäne selbst bindet an sekundärer Stelle im Caspase-3/BIR2 Komplex und zeigt abhängig von den Kristallkontakten bereits eine

erhebliche Flexibilität bzw. ist in der Caspase-7/BIR2 Struktur überhaupt nicht definiert. In der Tat weisen Experimente mit GST-*Linker* Fusionsproteinen und die Struktur des Caspase-7/BIR2 Komplexes darauf hin, daß für eine Bindung an die Caspasen in erster Linie der *Linker* benötigt wird und die BIR2-Domäne nur eine unterstützende Funktion hat (Chai et al., 2001a; Huang et al., 2001). In *surface plasmon resonance*-Experimenten zeigen ein GST-BIR2-Fusionsprotein und ein GST-*Linker*-Fusionsprotein Dissoziationskonstanten von 0,5 nM bzw. 35 nM mit Caspase-7, was eine 70fach schwächere Bindung in Abwesenheit der BIR2-Domäne bedeutet (Huang et al., 2001). Der *Linker* selbst weist jedoch keine nennenswerte inhibitorische Aktivität auf (Sun et al., 1999). Eine „Fähigkeit“ der BIR2-Domäne und der GST den Linker von einer bindungsinkompetenten Form in eine kompetente Form zu überführen (Chai et al., 2001a; Fesik and Shi, 2001), stellt eine mögliche Erklärung für das Fehlen inhibitorischer Aktivität des *Linkers* ohne die BIR-Domäne dar. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Stabilisierung des Linkers durch die BIR-Domäne bzw. die GST-Fusion. Die dimere Anordnung der BIR2-Moleküle in einem GST-Fusionsprotein (Reinemer et al., 1991) könnte weitere Effekte bewirken. In der Tat zeigt die GST-BIR2-Fusion eine 6-10fach erhöhte Inhibition von Caspase-3 und -7 gegenüber freiem BIR2, was die in Abbildung 4.3-1 dargestellten Inhibitor-Kinetiken zeigen.

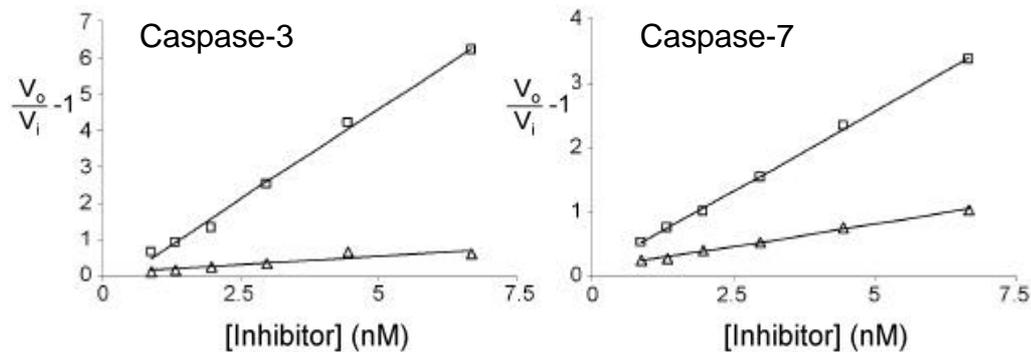


Abbildung 4.3-1 *Inhibition von Caspase-3/-7 durch GST-BIR2 versus BIR2*. Die Auftragung von $v_0/v_i - 1$ (v_0 bzw. v_i stellt die Substrathydrolyserate in Ab- bzw. Anwesenheit von Inhibitor dar) gegen die Inhibitorkonzentration erlaubt die Ermittlung von apparenten Inhibitorkonstanten ($K_{i(app)}$) aus denen mit Hilfe der Michaelis-Menten-Konstanten der Caspasen für das verwendete Z-DEVD-AFC Substrat die Inhibitorkonstanten (K_i) ermittelt werden können (siehe 3.3.10). Für die Inhibition von Caspase-3 und -7 durch BIR2 (?) ergeben sich somit Inhibitorkonstanten von 5 nM bzw. 3 nM. Die Verwendung einer GST-BIR2 Fusion (?) dagegen ergibt Inhibitorkonstanten von 0,4 nM und 0,9 nM. Der Einfluß des dimeren GST-Anteils bewirkt eine ca. 6-12fache Verstärkung der inhibitorischen Aktivität von BIR2.

Die dominante Rolle des *Linkers* gegenüber der BIR-Domäne wirft die Frage nach der eigentlichen Funktion der BIR-Domäne auf.

4.3.2 Rolle der BIR-Domäne in der Regulation der Caspase Inhibition

Neben der oben aufgeführten unterstützenden Rolle der BIR2-Domäne bei der Inhibition von Caspase-3 und -7, liegt eine weitere Funktion der BIR2-Domäne in der Bindung des pro-apoptotischen Faktors Smac (Chai et al., 2000; Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). Die Bindung von Smac an die BIR3-Domäne von XIAP wurde durch eine Kristall- und eine NMR-Struktur charakterisiert (Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). Diese Strukturen zeigen in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Chai et al., 2000), daß die Basis der Interaktion in der Bindung des N-Terminus (Reste Ala-1 bis Ile-4) von reifem Smac in eine Bindungstasche auf der Oberfläche der BIR3-Domäne liegt. Obwohl über die Bindung von Smac an BIR2 keine strukturelle Information vorhanden ist, wird eine ähnliche Bindung angenommen. Die Caspase-3/BIR2 Komplexstruktur stellt die derzeit einzige Struktur dar, die die Bindung einer BIR-Domäne an eine Caspase zeigt. Der hier ersichtliche Bindungsmodus zeigt die „Smac Bindungstasche“ auf BIR2 distal von der

Interaktionsfläche mit Caspase-3, und spricht gegen eine direkte Konkurrenz des Smac N-Terminus mit der Caspase-3. Daher erscheint es plausibler, daß Smac die BIR-Domäne als eine Art Griff benützt, um BIR2 von der Caspase abzuziehen.

Die Einbeziehung des in 4.1.5 beschriebenen Kristallkontaktes, der eine Bindung des N-Terminus der kleinen Caspase-3 Untereinheit in die Smac-Bindungstasche der benachbarten BIR2-Domäne zeigt, führt zu dem in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Modell.

Auch der zweite in 4.1.5 erläuterte Kristallkontakt könnte auf eine Funktion einer BIR-Domäne hinweisen. Hier hat der Kontakt der N-terminalen Helix mit der benachbarten BIR2-Domäne eine Stabilisierung dieses für die Inhibition zentralen Elements zur Folge. Dieser Kontakt könnte ein Ansatzpunkt für die Wirkungsweise der bisher unverstandenen BIR1 Domäne sein, nämlich eine Stabilisierung der durch BIR2 verursachten Inhibition.

4.3.3 Hypothetisches Modell der Inhibition von Caspase-3/7 und -9 durch XIAP

Die Inhibition durch BIR2 im Caspase-3 Komplex und die Anordnung der Komplexe im Kristall ist in Abbildung 4.3-2 schematisch dargestellt. Die unter 4.3.2 diskutierten Kontakte und deren mögliche biologische Relevanz könnten eine Szenerie wiedergeben, die Züge der Gesamtinhibition von XIAP mit Caspase-3/7 und Caspase-9 beinhaltet (Abbildung 4.3-2). Demnach würde BIR1, das sequentiell ca. 40 Reste vor der N-terminalen Helix von BIR2 liegt, zu einer Stabilisierung der Helix/Caspase-Interaktion im *Linker* von BIR2 beitragen.

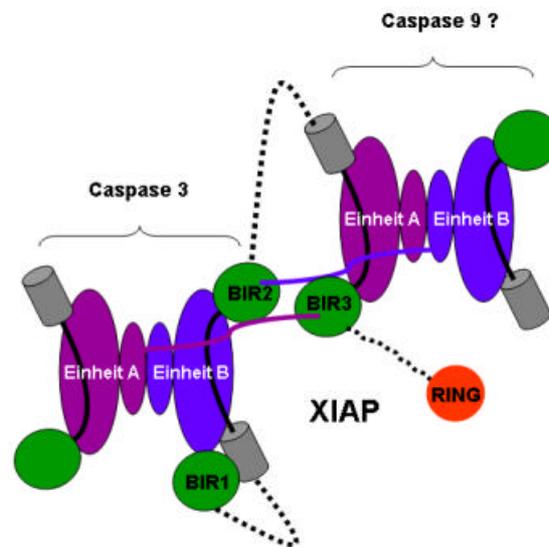


Abbildung 4.3-2. *Hypothetisches Modell der Inhibition der Caspase-3/-7 und -9 durch XIAP.* Gezeigt ist schematisch die Anordnung der Caspase-3/BIR2 Komplexe im Kristall. Es ist vorstellbar, daß die beobachteten Kristallkontakte auf zusätzliche Merkmale der Inhibition von Caspase-3/-7 und -9 durch XIAP hinweist, also der hier gezeigte Kristallnachbar ein Caspase-9 Heterotetramer darstellt. So könnte die Funktion von BIR1 in der Stabilisierung der Linker-Helix und somit der Inhibition von Caspase-3 und -7 liegen. Des Weiteren könnten die Interaktionen der N-Termini von Caspase-3/-7 und -9 mit den Smac-Bindungstaschen der BIR3- bzw. BIR2-Domänen auch in Lösung vorliegen und so eine dimere Anordnung und Verstärkung der Inhibition bewirken. Diese dimere Anordnung könnte auch für die Regulation durch den dimeren IAP-Antagonisten Smac von Bedeutung sein.

BIR2 und BIR3 würden benachbart liegen und jeweils über den N-Terminus der kleinen Untereinheit der anderen katalytischen Einheit, der in die Smac-Taschen des Nachbar BIR-Moleküls bindet, verbunden sein. Die dadurch bewirkte komplexe Kommunikation der Einheiten wird sofort offensichtlich. Wie im Caspase-3/BIR2 Komplex gezeigt, verläuft dieser Strang auch durch die Interaktionsfläche der BIR-Domäne mit der Caspase. Dies kann abhängig von dessen Rigidität zu einer Stabilisierung oder Destabilisierung der Interaktion führen. Der eigentliche N-Terminus kommt dann in der benachbarten Smac-Bindungstasche zu liegen. Die Anordnung hier suggeriert einen dimeren Charakter dieser Interaktion, was in Lösung durch die kovalente Verbindung von BIR2 und BIR3 und die dadurch hohe lokale Konzentration der Bindungspartner erreicht werden könnte. Auf ein pro-apoptisches Signal hin wird dann Smac freigesetzt um die Inhibition aufzuheben (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Der durch die dimere Anordnung der BIR-Domänen vorliegende Abstand der Smac-Bindungstaschen würde sehr gut dem Abstand der

beiden kritischen N-Termini des Smac Dimers (Chai et al., 2001a) entsprechen und so einen idealen Angriffspunkt für den IAP-Antagonisten bieten. In Abwesenheit eines apoptotischen Signal würde schließlich die E3-Ligase Aktivität der RING Domäne zur Ubiquitinylierung und somit zur Degradation der aktiven Caspasen führen (Suzuki et al., 2001c; Yang et al., 2000). Es läge also ein sehr sensibles System vor, das eine schnelle und effektive posttranslationale Regulation der Caspaseaktivität und somit des apoptotischen Programms erlaubt.

Es sei hier erneut darauf verwiesen, daß dieses Modell Grundzüge der Inhibition und Regulation wiedergeben soll und im Detail deutlich von der tatsächlichen Struktur des Komplexes aus XIAP, Caspase-3/7 und Caspase-9 abweichen kann. Mutationsstudien und Sequenzvergleiche zwischen BIR2 und BIR3 weisen auf einen Inhibitionsmechanismus von BIR3/Caspase-9 hin, der sich von dem für Caspase-3/-7 mit BIR2 gefundenen unterscheidet. So reicht für die Inhibition von Caspase-9 die BIR3-Domäne und ein kurzer C-terminaler Sequenzabschnitt aus (Sun et al., 2000). Auch wäre gerade für die BIR3/Caspase-9-Interaktion eine direkte Bindung des N-Terminus von der anderen katalytischen Einheit von Caspase-9 in die Smac-Tasche von BIR3 denkbar (Shi, 2002; Srinivasula et al., 2001). Außerdem sind die Reste im besprochenen N-terminalen Abschnitt der Caspase, der im Caspase-3/BIR2 Komplex an der BIR-Domänen Bindungsfläche beteiligt ist, in Caspase-3 und -7 nicht konserviert. Es kann also auch sein, daß dieser in Caspase-7 nicht an der direkten Interaktion teilnimmt, was zusätzlich zu den fehlenden Kristallkontakten die hohe Flexibilität der BIR2-Domäne im Caspase-7 Komplex erklären kann. Ein weiterer Punkt ist die Tatsache, daß die Caspasen ebenfalls Dimere sind, wodurch es zu einer Vernetzung mehrerer Komplexe und so zu einer verschiedenen Anordnung der Bindungselemente kommen kann.

Jedoch wurde mittlerweile bekannt, daß in der Tat der N-Terminus der anderen katalytischen Einheit von Caspase-9 die Smac-ähnliche Sequenz Ala-Thr-Pro-Phe besitzen muß, um von XIAP inhibiert zu werden (Srinivasula et al., 2001). Nur die N-Termini von Caspase-3,-7 und -9 zeigen Reste, die fähig sind in die Smac-Taschen von BIR2 und BIR3 zu binden, was aus dem in Abbildung 4.3-3 dargestellten Sequenz-alignment ersichtlich ist. Auch macht eine dimere Präsentation der

Smac-Bindungstaschen Sinn. So ist z.B. der Unterschied in der Bindung von Smac zu monomeren BIR2 bzw. einer dimeren GST-BIR2-Fusion erheblich. Die Dissoziationskonstanten betragen 2 μ M für BIR2 versus 35 nM für das dimere GST-BIR2 Konstrukt (Huang et al., 2001; Liu et al., 2000).

Casp2	DGKNHAG...SPGCEESDAGKEKLPKM
Casp3	DSGVD.....DMACHKIPV
Casp6	DVVDNQTTEKLDNITEVDAASVYTLPA
Casp7	DSGPI.....NDTANPRYKIPV
Casp8	DSEEQ.....PYLEMELSSPQTRYI
Casp9	DATPF...QEGLRTFDQLDAISSLPTPS
Smac	AVPI

Abbildung 4.3-3 *Sequenzen der N-Termini der kleinen Caspase-Untereinheiten*. Grün hinterlegt sind die Aspartatreste, nach denen die Aktivierungsspaltung der Caspasen erfolgt. Die neu entstehenden N-Termini zeigen nur für die Caspasen-3,-7 und -9 ähnliche Aminosäuren zum N-Terminus von Smac. Die N-Termini von Casp-7 und -9 erscheinen am besten geeignet zu sein in die Smac-Bindungstasche zu binden. Die Caspasen-2,-6 und -8 hingegen weisen für die Bindung ungünstige geladene Reste in den Positionen 1-3 nach der Spaltstelle auf.

Zusammenfassend sei vermerkt, daß die Caspase-3(-7)/BIR2 Strukturen einerseits durch biochemische Ergebnisse bestätigt werden und andererseits vorher unverstandene Ergebnisse erklären können. Sie erlauben einen Einblick in das komplexe Verhalten der BIR-Domänen und deren umgebende Regionen. Um jedoch die Funktion der globulären BIR-Domänen als inhibitorische/unterstützende Einheiten und regulatorische Domänen, die z.B. den Angriffspunkt für Smac liefern, zu verstehen, sind weitere BIR/Zielprotein-Komplexstrukturen nötig.

4.4 Aktivierung von Caspasen – Kristallstruktur des Caspase-7 Zymogens

4.4.1 Expression, Kristallisation, Strukturlösung des Caspase-7 Zymogens

Expression und Reinigung von Procaspase-7

Zur Lösung der Zymogenstruktur von Caspase-7 wurde eine Caspase-7 Cys-285-Ala Mutante mit C-terminalem His-tag rekombinant überexprimiert und über eine Nickelsepharose-Säule gereinigt. Anschließend wurde eine Gelfiltration durchgeführt, in der die Procaspase ein apparentes Molekulargewicht von ca. 56 kDa zeigte. Dies ist deutlich weniger als für ein Procaspase-7 Homodimer mit einem Molekulargewicht von 70,6 kDa zu erwarten ist. Dieses Ergebnis könnte z.B. in einer Interaktion der Procaspase mit dem Säulenmaterial, was eine verlängerte Retentionszeit bewirken würde, begründet sein. Daher wurden dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt, die ein Molekulargewicht von 70 kDa ergaben. Dies zeigt, daß auch Procaspase-7 in Lösung eine dimere Gestalt zeigt, die dem Heterotetramer gespaltener Caspase-7 entspricht.

Kristallisation und Strukturlösung

Zur Kristallisation wurden 3 µl der Procaspase-7 Lösung (Proteinkonzentration: 8 mg/ml) mit 0,4 µl einer 0,1 molaren Ammoniumsulfatlösung und 1 µl Reservoirlösung (50 mM Mes/NaOH, 100 mM Ammoniumsulfat, 10 mM Magnesiumchlorid, 20 % PEG 8000, pH 5,6) vermischt. Nach 2-5 Tagen konnten Kristalle der Ausmaße 0,4 x 0,2 x 0,2 mm³ mittels *sitting drop* Dampfdiffusion erhalten werden. Zur Prüfung der Integrität der Procaspase in den Kristallen wurden einige Kristalle aufgelöst und in Gelelektrophorese und Edman-Abbau untersucht. Ferner wurde getestet, ob die Procaspase-7 aus den gelösten Kristallen immer noch durch Granzym B aktiviert werden kann. Diese Experimente ergaben, daß während Reinigung und Kristallisation keinerlei Aktivierungsspaltung durch Protease-Verunreinigungen erfolgt war und in den Kristallen intakte Procaspase-7 vorlag, die durch Granzym B aktiviert werden konnte. Wie im Falle des

Caspase-7/BIR2 Komplexes (siehe 4.2.1) wurde auch hier ein geringer Prozentsatz an N-terminal verkürzter Caspase im Edman-Abbau gefunden.

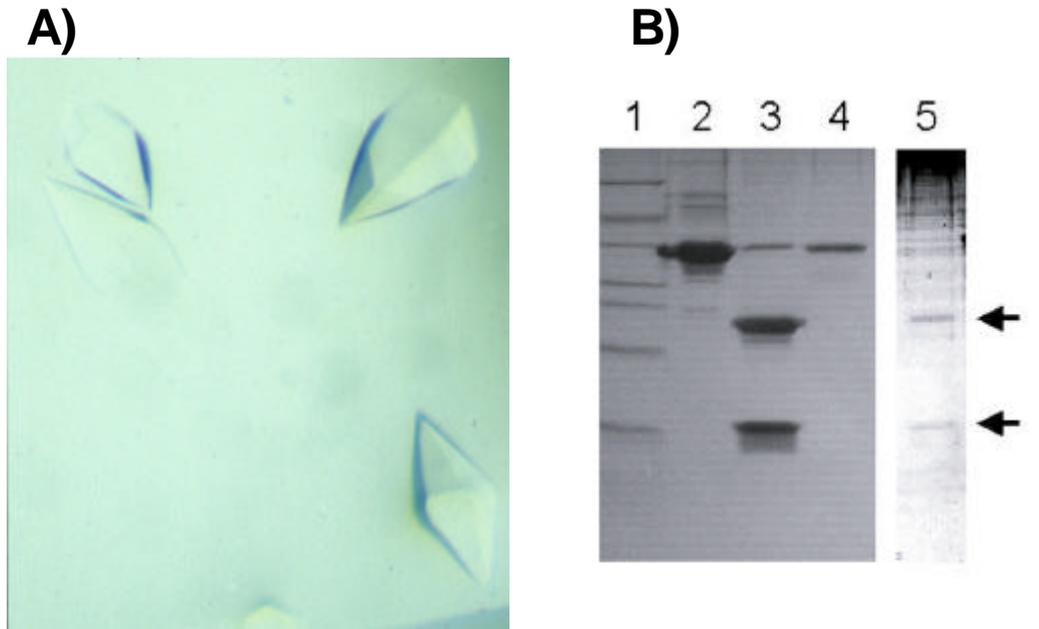


Abbildung 4.4-1 *Kristalle von Procaspase-7 und Integrität der Procaspase*. **A)** Zur Kristallisation wurden 3 μ l Proteinlösung mit 0,4 μ l einer 0,1 molaren Ammoniumsulfatlösung und 1 μ l Reservoirlösung (50 mM Mes/NaOH, 100 mM Ammoniumsulfat, 10 mM Magnesiumchlorid, 20 % PEG 8000, pH 5,6) vermischt. Kristalle wuchsen nach ca. 2-5 Tagen durch *sitting drop* Dampfdiffusion. **B)** SDS-PAGE. Analyse von Procaspase-7 vor der Kristallisation und in gelösten Kristallen. Bahn 1: Marker, Bahn 2: rekombinante Procaspase-7 Lösung vor der Kristallisation, Bahn 3: Lösung wie in Bahn 2, jedoch mit Granzym B behandelt, Bahn 4: gelöstes Procaspase-7 Kristall, Bahn 5: gelöstes Procaspase-7 Kristall mit Granzym B behandelt (verstärkt, um die relativ schwachen Banden sichtbar zu machen). Auf die Position der großen und kleinen Untereinheiten in den mit Granzym B behandelten Ansätzen weisen Pfeile hin.

Von einem mit 20 % Glycerol in Mutterlauge schockgefrorenen Kristall konnte ein nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,9 Å an der BW6 *beamline* des Deutschen Elektronen Synchrotrons (DESY) aufgenommen werden. Der Autoindizierungsalgorithmus nach Kabsch (Kabsch, 1988) in Kombination mit AMoRe (Navaza, 1994) lieferte die trigonale Raumgruppe $P3_221$ mit Zellkonstanten von $a = b = 90,2$ und $c = 183,0$, die wie im Falle der Caspase-7/BIR2 Struktur weniger als 2 % von der Zelle aktiver, Ac-DEVD-CHO inhibierter Caspase-7 abweicht. Aus dieser Elementarzelle ergibt sich ein Matthews Koeffizient (Matthews, 1968) von $2,96 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ für ein Procaspase-7 Homodimer.

Mit Hilfe der Patterson-Suchmethode (*molecular replacement*) durch das Programm AMoRe (Navaza, 1994) konnte eine aktive Caspase-7 (Wei et al., 2000) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.608 und einem R-Faktor von 38,8 % eindeutig positioniert werden. Erste Elektronendichtekarten zeigten deutlich eine zusätzliche Elektronendichte im Bereich des so genannten zentralen Hohlraums, sowie einen anderen Verlauf einiger *Loop*-Regionen (siehe 4.4.2). Nach mehreren Modellbau- und Verfeinerungszyklen konnte ein finales Modell mit R-Faktoren von 26,8 % und 28,5 % (kristallographischer- und freier R-Faktor) erhalten werden. Im finalen Modell waren die Reste Met-96 bis Val-148, Thr-288 bis Arg-318/Tyr-319, Ser-339 bis Gly-346 und Ser-381A bis His-381I für die beiden Procaspase-Monomere ungeordnet (siehe auch 4.4.2). In Tabelle 4.4-1 sind die Datensammlungs und Verfeinerungsstatistiken dargestellt.

Kristallographische Datentabelle	
Raumgruppe	P3 ₂ 21
Zellkonstanten	a = b = 90,21,
Auflösungsbereich, Å	59,76-2,90
gemessene Reflexe	180534
unabhängige Reflexe	19540
Vollständigkeit der Daten, % (gesamt / äußere Schale)	99,1 (99,1)
R_{merge} , % [†] (gesamt / äußere Schale)	6,8 (38,6)
R_{cryst} , % [*] (gesamt / äußere Schale)	26,8 (31,3)
R_{free} , % [#] (gesamt / äußere Schale)	28,5 (38,6)
Reflexe im Arbeits- / Test-Set	18540 / 947
<i>r.m.s.</i> -Abweichung von Idealwert der	
Bindungslängen, Å	0,011
Bindungswinkel, °	1,33
Mittlerer B-Faktor, Å ²	74,8
Anzahl Proteinatome (nicht H-Atome)	4297
Anzahl der Metallionen	2
Anzahl der Lösungsmittelmoleküle	25
[†] $R_{\text{merge}} = \sum S_{\text{hkl}} S_{\text{hkl}}(hkl) - \langle I_{\text{hkl}} \rangle / \sum S_{\text{hkl}} I_{\text{hkl}}(hkl) $, wobei $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ die durchschnittliche Intensität für mehrfache Messung symmetrieverwandter Reflexe darstellt	
[*] $R_{\text{cryst}} = \sum S_{\text{hkl}} F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} / \sum S_{\text{hkl}} F_{\text{obs}} $	
[#] R_{free} berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden	

Tabelle 4.4-1 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik zur Lösung Procaspase-7 Struktur.

4.4.2 Gesamtstruktur von Procaspase-7

Die Gesamtstruktur des Caspase-7 Zymogens (Abbildung 4.4-2) ähnelt stark der von aktiver Caspase-7 im Komplex mit Ac-DEVD-CHO (Wei et al., 2000). Die Überlagerung von 385 topologisch identischen Ca-Atomen ergibt eine r.m.s.-Abweichung von 0.6 Å. Alle Sekundärstrukturelemente, die das Grundgerüst der Caspase Struktur bilden, sind nahezu identisch. Folglich ist die Gesamtfaltung der großen und kleinen Domäne jedes der beiden Procaspasestränge equivalent zur großen und kleinen Untereinheit aktiver Caspasen. In starkem Kontrast zur aktiven Caspase-7 und anderen Caspase Strukturen, ist jedoch ein Bruch der (lokalen) Symmetrie im zentralen Hohlraum des Homo-Dimers. Diese Region, die charakteristisch ist für alle derzeit bekannten Caspase-Strukturen, ist mit einer unterbrochenen Elektronendichte gefüllt. Diese Dichte resultiert aus den C-terminalen Abschnitten der zwei *Linker* (Tyr-319 bis Glu-324) zwischen den großen und kleinen Subdomänen der Procaspase. Sie erlaubt jedoch nicht die Präsenz beider Stränge, wie sie aufgrund der nichtkristallographischen Symmetrie in der Procaspase erwartet werden würde.

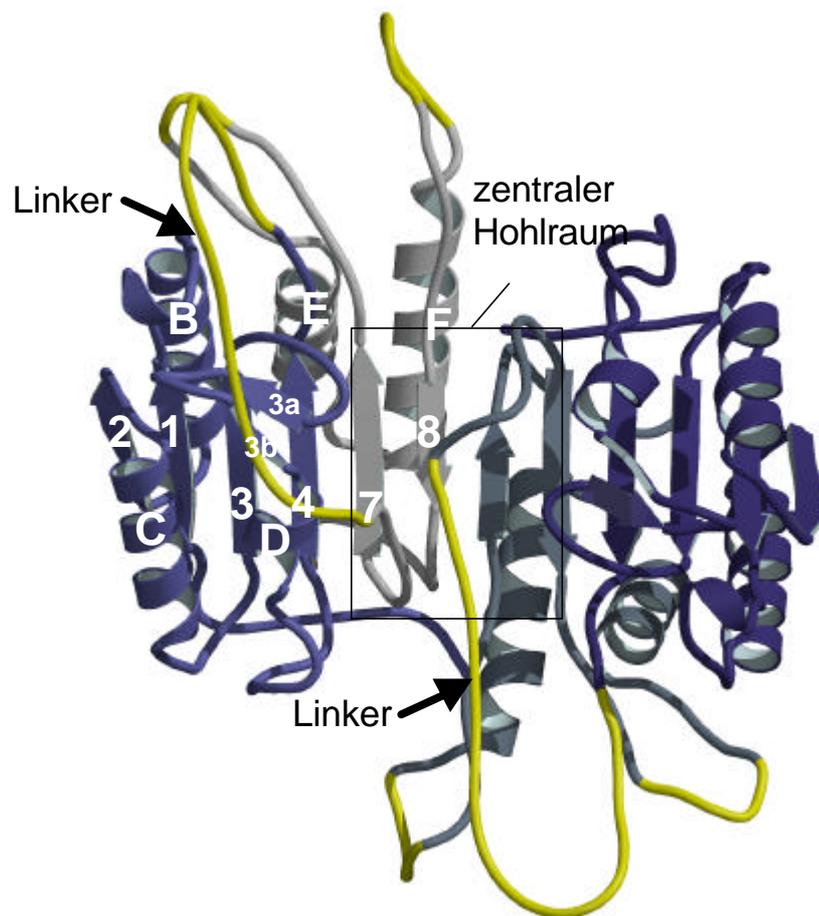


Abbildung 4.4-2 *Kristallstruktur von Procaspase-7*. Bänderdarstellung des Procaspase-7 Modells in Caspase-Standarddarstellung. Die asymmetrische Einheit umfaßt zwei Monomere, die jeweils aus einer großen (hellblau und dunkelblau) und einer kleinen (hellgrau und dunkelgrau) Domäne bestehen. Flexible Elemente, die nicht in der Elektronendichte definiert sind, sind gelb gekennzeichnet. Die Sekundärstrukturelemente sind analog denen von Caspase-1 (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994) zugeordnet.

Der größte Teil der beiden *Linker* (Thr-288 bis Arg-318) ist völlig flexibel, daher nicht in der Elektronendichte definiert und in Abbildung 4.4-2 gelb dargestellt. Aufgrund der fehlenden durchgehenden Dichte sind die kovalenten Verknüpfungen zwischen großer und kleiner Sub-Domäne nicht eindeutig bestimmt. Biochemische Hinweise (Srinivasula et al., 1998) und die Verknüpfung dieser Bereiche in der Struktur des Caspase homologen Gingipain R (Eichinger et al., 1999), weisen jedoch auf die in Abbildung 4.4-2 dargestellte Verknüpfung der beiden proximalen großen und kleinen Sub-Domänen hin.

Ebenfalls in der Elektronendichte nicht definiert und in Abbildung 4.4-2 gelb gefärbt sind die Bereiche Gly-336 bis Arg-345 und Gln-381b bis Pro-381f, die sich in *Loop*-Regionen zwischen Faltblatt sieben und Helix E bzw. Helix F und Faltblatt acht in der kleinen Sub-Domäne befinden.

4.4.3 Unterschiede des Caspase-7 Zymogens zur aktiven Caspase

Die Überlagerung des Caspase-7 Zymogens mit der Struktur der aktiven Caspase-7 aus einem Komplex mit dem substratähnlichen Inhibitor Ac-DEVD-CHO (Wei et al., 2000) zeigt die Unterschiede zwischen beiden Caspaseformen auf. Diese betreffen keine der Caspase Sekundärstrukturelemente, sondern konzentrieren sich auf drei *Loop* Regionen, die in Abbildung 4.4-3 gekennzeichnet sind.

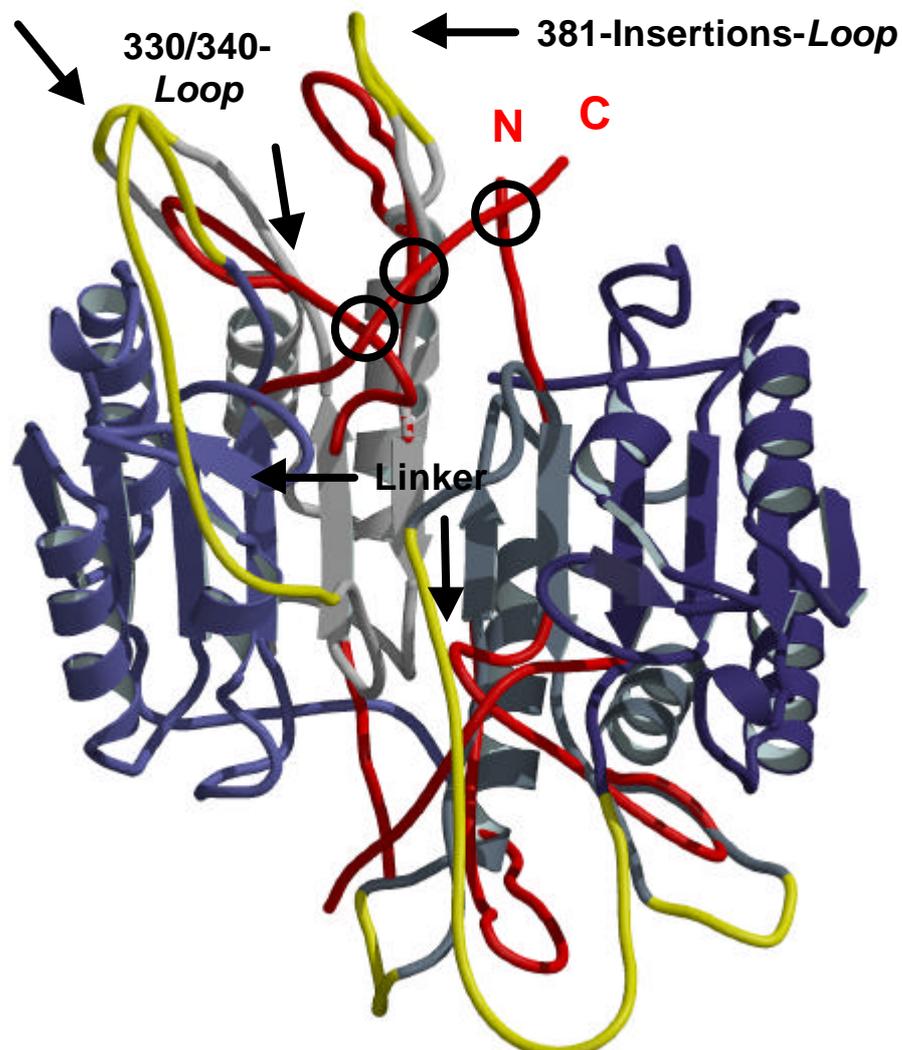


Abbildung 4.4-3 Überlagerung des Caspase-7 Zymogens mit aktiver Caspase-7 aus einem Komplex mit Ac-DEVD-CHO. Das Procaspase-7 Modell ist wie in Abbildung 4.4-2 dargestellt. Bereiche des Caspase-7 Modells (Wei et al., 2000), die von der Procaspase-7 abweichen sind rot dargestellt. Der peptidische Inhibitor ist nicht gezeigt. Die Positionen der *Linker*, sowie des 330/340-Loops und des 381-Insertions-Loops sind gekennzeichnet. Das Vier-Strang-Bündel (siehe Text) ist durch Kreise gekennzeichnet.

Eine dieser Regionen liegt zwischen Ala-284 und Asp-326. Dieser Abschnitt beinhaltet die *Linker*-Sequenz zwischen großer und kleiner Sub-Domäne und daher auch die Sequenz Ile-294-Gln-Ala-Asp-294, nach der die Aktivierungsspaltung erfolgt. In der aktiven, inhibierten Caspase verläuft dieser Strang zum oberen Ende des Caspase Heterotetramers, tangiert dabei zwei *Loops* und kreuzt dann den N-Terminus der anderen katalytischen Einheit. Die Folge ist die Bildung eines strukturierten Bündels aus den vier Strängen (Abbildung 4.4-3). Im Gegensatz zum

Verlauf in der aktiven Inhibitor-gebundenen Caspase-7 knickt der Strang in der Procaspase nach Ala-284 ab und ist nach dem strikt konservierten Gly-287 (Abbildung 4.4-4) vollkommen flexibel.

Der nächste Unterschied zwischen den beiden Caspaseformen ist im *Loop* zwischen Helix F und Faltblatt 8, dem 381-Insertions-*Loop* zu erkennen. Dieser *Loop* enthält bei den *executioner*-Caspasen (verglichen mit Caspase-1) eine zehn Reste lange Insertion nach Phe-381. Der 381-Insertions-*Loop* ist bei der aktiven Caspase-7 mit an der Substratbindung beteiligt und ist daher in der Ac-DEVD-CHO/Caspase-7 Komplexstruktur gut definiert. In der Procaspase ist dieser *Loop* zum Solvens hin verschoben und deutlich flexibler, so daß für die Reste Gln-381b bis Pro-381f keine Elektronendichte gefunden werden konnte.

Der wohl überraschendste und folgenreichste Unterschied liegt jedoch im *Loop* zwischen Faltblatt 7 und Helix E (330/340-*Loop*). Dieser *Loop* stellt in der aktiven Caspase-7 die meisten Reste für die Ausbildung der Substratbindungstaschen (Tyr-338, Ser-339, Trp-340, Arg-341, Pro-343, (Wei et al., 2000)). Anders als in der aktiven Form, in der dieser Abschnitt an mehreren Interaktionen mit der Caspase und dem Inhibitor teilnimmt und in seiner ellbogenartigen Gestalt gut definiert ist, ändert er seinen Verlauf in Procaspase-7 bereits ab dem Rest Ser-332. Der gesamte 330/340-*Loop* ist zum Solvens hin verschoben und deutlich flexibler, so daß die Reste Gly-336 bis Arg-345 völlig in der Elektronendichte fehlen.

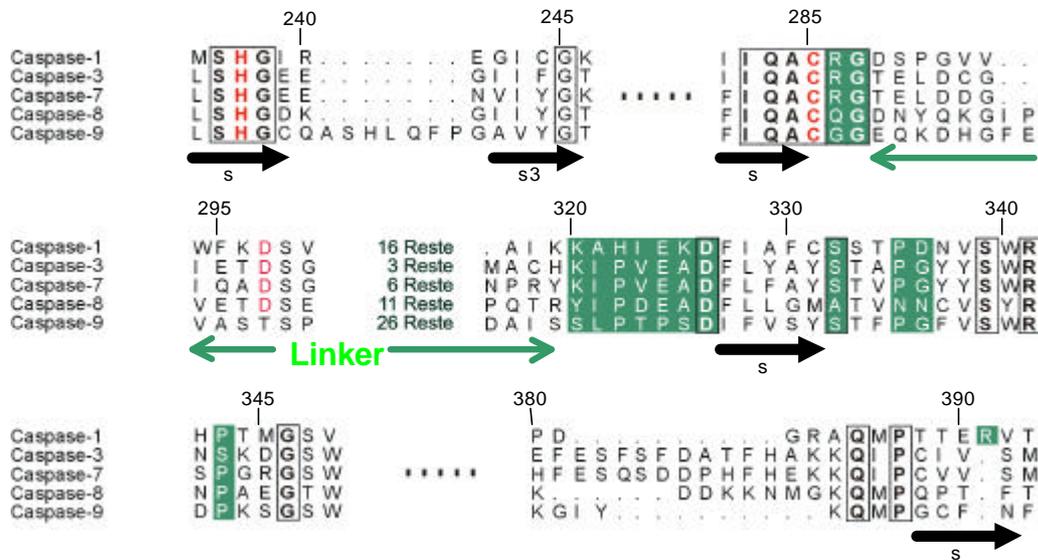


Abbildung 4.4-4 Strukturorientiertes Alignment verschiedener Caspasen. Dargestellt sind ausgewählte Segmente der Caspasen-1,-3,-7,-8,-9. Konservierte Reste sind eingerahmt. Reste, die in Regionen liegen, die an der Aktivierung der Procaspase(-7) beteiligt sind, sind grün hinterlegt. Besonders gekennzeichnet sind Sekundärstrukturelemente und die *Linker*-Region, sowie die katalytischen Reste His-237 und Cys-285 (rot) und Asp-297 (rot), nach dem die Aktivierungsspaltung erfolgt (außer bei Caspase-9 – hier befindet sich die Spaltstelle weiter zur Mitte des *Linkers* hin).

4.4.4 Die Substratbindungstaschen fehlen in Procaspase-7 – Cys/Ala-285 zeigt eine andere Konformation

Die Folgen der veränderten Konformation des 330/340-Loop werden bei der näheren Betrachtung der Substratbindungsregion deutlich. In Abbildung 4.4-5 ist die Lage von Arg-341, das essentiell für die Substratbindung des Aspartatrestes in der Position P1 ist, und die Lage des strukturell wichtigen Trp-340 für beide Caspaseformen dargestellt. Die Positionen der Ca Atome sind für die beiden Reste um ca. 15 Å zwischen den beiden Formen verschoben. Auch die benachbarten Reste Tyr-338, Ser-339 und Pro-343 weichen in der Procaspase erheblich von ihrer „korrekten“ Lage ab. Abbildung 4.4-5 b) zeigt die Auswirkung dieser Veränderung auf die Bindung des substratähnlichen Inhibitors Ac-DEVD-CHO. Es ist leicht zu erkennen, daß im Caspase Zymogen die gesamte Struktur der Substratbindungsfurche zerstört ist und so eine produktive Substratbindung nicht möglich ist.

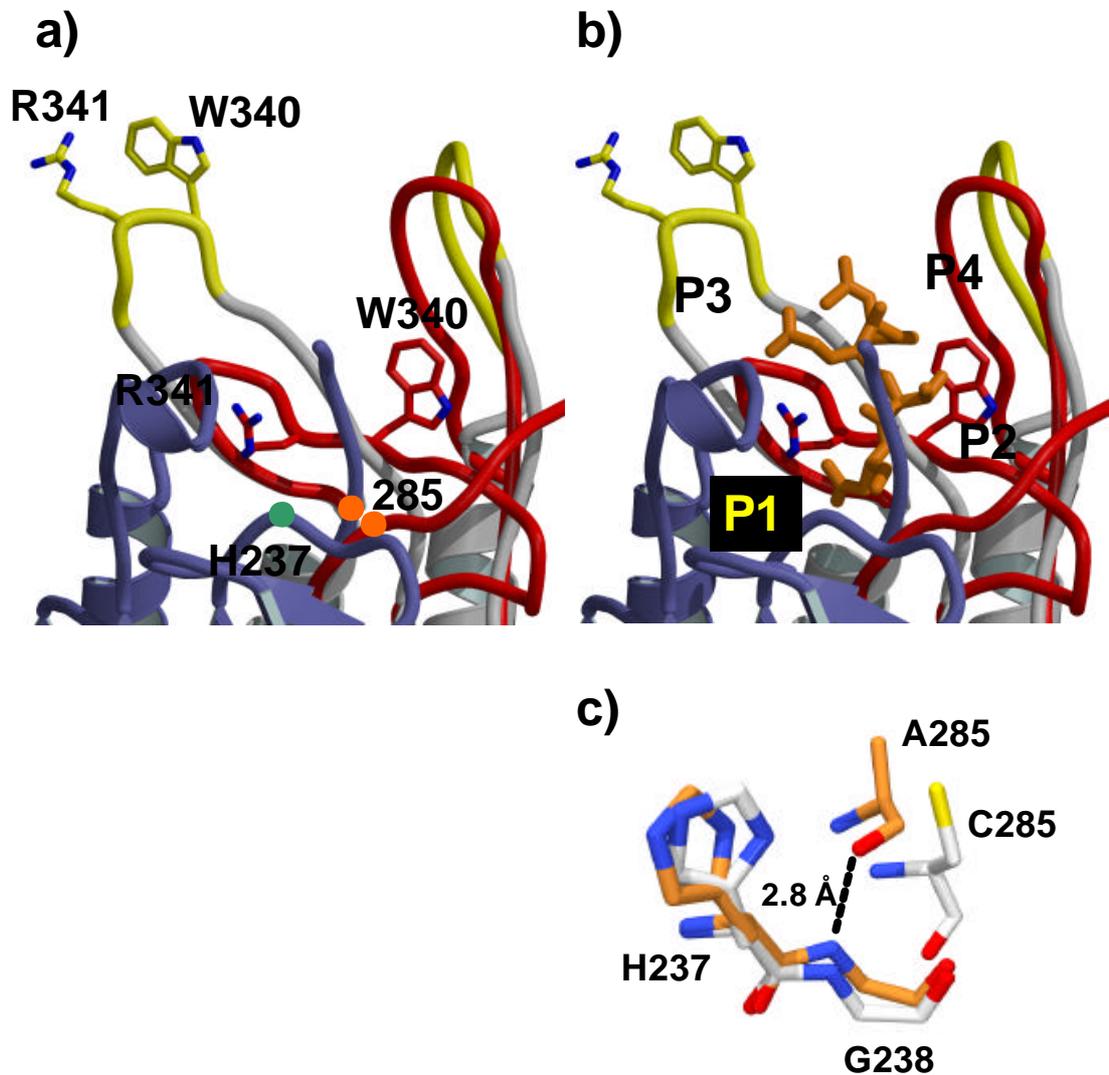


Abbildung 4.4-5 *Zerstörung der Substratbindungstaschen in Procaspase-7 / Lage von Cys/Ala-285*. Vergrößerung der Substratbindungsregion von Caspase-7 mit dem selben Farbschema wie in Abbildung 4.4-3. **a)** Zusätzlich sind die Seitenketten der Reste Asp-341 und Trp-340 für beide Formen dargestellt. Die Lage der katalytischen Reste Cys/Ala-285 und His-237 sind durch orange Punkte bzw. einen grünen Punkt gekennzeichnet. **b)** Bindung des substratähnlichen Inhibitors Ac-DEVD-CHO (orange). Die Positionen des „Substrates“ sind als P1 bis P4 gekennzeichnet. **c)** Veränderte Konformation des Restes Cys/Ala-285 relativ zu His-237-Gly-238. Kohlenstoffatome der zur Procaspase gehörenden Reste sind orange eingefärbt. Der Carbonylsauerstoff von Ala-285 geht in der Procaspase mit der Amidfunktion von Gly-238 eine Wasserstoffbrückenbindung ein.

In Abbildung 4.4-5 sind ebenfalls die Positionen der katalytischen Reste His-237 und Cys-285 gekennzeichnet. Während His-237 keine Veränderung in beiden Caspaseformen unterläuft, ist die Lage des Ca-Atoms des Restes 285 (des katalytischen Cys-285; hier Ala-285) um 2 Å verschoben. Auch die Konformation von Ala-285 weicht von der des Cys-285 in der aktiven Caspase ab, so daß der Carbonylsauerstoff von Ala-285 eine neue Wasserstoffbrückenbindung mit der Amidfunktion von Gly-238 bildet und die Oxyaniontasche nicht korrekt geformt ist.

4.4.5 Inaktivität der Procaspase

Das Caspase-7 Zymogen zeigt gegenüber der Struktur aktiver Caspase-7 im Komplex mit Ac-DEVD-CHO drastische Änderungen in der Substratbindungsregion. Diese sind hauptsächlich durch die Konformationsänderung im „330/340-Loop“ bedingt. Dieses Segment ist vorrangig für die Bindung des Substrats verantwortlich. Zusätzlich ist jedoch auch die Konformation des Cys/Ala-285 verändert, das am Beginn des *Linker-Loops* liegt, der in der Procaspase zum Solvent verläuft und flexibel wird. In der aktiven, Inhibitor-gebundenen Form verläuft dieser Strang nach dem katalytischen Cystein in geordneter Weise weiter und ist in ein „Vier-Strang Bündel“ einbezogen (Abbildung 4.4-3).

Daher drängt sich die Frage auf, welches der entscheidende Schritt bei der Aktivierung des Zymogens ist – Die richtige Positionierung des Substratbindungs-*Loops* oder die Ausbildung des „Vier-Strang Bündels“ und die richtige Positionierung des katalytischen Cys-285?

Diese Frage kann aus dem oben geführten Vergleich nicht beantwortet werden. Die kürzlich veröffentlichte Struktur einer aktiven Caspase-7 ohne Inhibitor (Chai et al., 2001b) zeigt jedoch ein überraschendes Ergebnis: Selbst in der aktiven „freien“ Caspase-7 ist die Konformation des Cys-285 näher an der der Procaspase, als an der von aktiver Caspase-7 im Komplex mit Ac-DEVD-CHO. Auch das beschriebene „Vier-Strang Bündel“ ist noch nicht ausgebildet. Die aktive „freie“ Caspase-7 hat jedoch den 381-Insertions-*Loop* und vor allem den 330/340-*Loop* in der substratbindungskompetenten Form vorliegen. Für die Positionen der 17 Ca-Atome von Ser-332 bis Trp-348 in der freien bzw. Inhibitor-gebundenen aktiven Caspase-7

ergibt sich eine *r.m.s.*-Abweichung von 1.0 Å. Die unmittelbare Folge der Aktivierungsspaltung ist also die richtige Positionierung des 330/340-*Loops*. Aber dennoch trägt auch die Fähigkeit der dann freien Termini, das „vier Strang Bündel“ auszubilden, trägt zur Aktivität der gespaltenen Caspase bei (Chai et al., 2001b; Riedl et al., 2001a).

4.4.6 Die *Linker* bewirken die inaktive Konformation des 330/340-*Loops*

Aus den oben in Abbildung 4.4-5 diskutierten Erkenntnissen, stellt sich sofort die nächste Frage: Was bewirkt die dramatische Konformationsänderung des 330/340-*Loops*?

Ein genauer Blick in den für Caspasen charakteristischen zentralen Hohlraum an der Verbindungsfläche des Dimers gibt eine Erklärung (Abbildung 4.4-6). In der aktiven Caspase verlaufen die Reste am Anfang des 330/340-*Loops* in den zentralen Hohlraum hinein. Das Gelenk bildet hierbei der Rest in Position 332, der in allen menschlichen Caspasen entweder ein Serin oder Alanin ist (vgl. Alignment, Abbildung 4.3-3). Val-334 und Pro-335 kommen in der Mitte des Hohlraums zu liegen. Pro-335 kommuniziert mit dem räumlich benachbarten Arg-286 (dem sequentiellen Nachbarn des katalytischen Cys-285) und Tyr-331. In der Procaspase ist jedoch dieser Raum von den ungespaltenen *Linkern* besetzt (Abbildung 4.4-6). Die N-terminale Region der kleinen Sub-Domäne kommt nicht, wie in der aktiven inhibierten Caspase-7 vom äußeren Ende des Heterotetramers, sondern vom zentralen Hohlraum. Die dadurch bedingte Biegung von Pro-322 bis zum strikt konservierten Asp-326 ist gut in der Elektronendichte definiert.

Dies schließt die aktive Konformation des „330/340-*Loops*“ aus, da es zu Zusammenstößen mit dem *Linker* der anderen katalytischen Einheit kommen würde. Ein offensichtlicher Konflikt wäre zum Beispiel die in Abbildung 4.4-6 illustrierte Überschneidung der Reste Val-334 des 330/340-*Loops* mit Val-323 am Ende des *Linkers* der anderen katalytischen Einheit in der Procaspase. Eine solche Betrachtung der sterischen Konflikte in der Procaspase resultiert von dem statischen Bild der Interaktionen, das mit der räumlichen und zeitlichen Mittelung bei der Kristallanalyse

zusammenhängt. Vielmehr sollte man eine dynamische Konkurrenz der beiden *Linker* untereinander und mit den beiden *330/340-Loops* in Lösung erwarten. Dieses Gleichgewicht ist in der Procaspase, also bei nicht gespaltenen *Linkern* zum Ausschluß des „*330/340-Loops*“ hin verschoben. Die Konkurrenz der beiden *Linker* untereinander wird durch die unterbrochene asymmetrische Dichte und die hohen Temperaturfaktoren des Modells in dieser Region deutlich. Eine weitere Procaspase-7 Struktur bestätigt die beobachtete Asymmetrie im zentralen Hohlraum (Chai et al., 2001b). In dieser Struktur ist die Asymmetrie sogar noch stärker ausgeprägt und setzt sich auf die *330/340-Loops* fort. Einer der beiden *330/340-Loops* ist näher an der substratkompetenten Form, obwohl auch hier die Substratbindungstaschen zerstört sind. Dieser Unterschied zur hier vorgestellten Zymogenstruktur beruht wahrscheinlich auf unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen. Die Strukturen machen aber deutlich, daß die beobachtete Asymmetrie eine intrinsische Eigenschaft der Procaspase darstellt und aus der Konkurrenz um den zentralen Hohlraum resultiert. Diese Asymmetrie wurde auch in biochemischen Experimenten beobachtet, wie z.B. frühe Untersuchungen von Caspase-1 zeigen (Yamin et al., 1996). Hier wurde eine 50 %ige Effizienz bei der Markierung von Procaspase-1 mit einem biotinylierten Inhibitor gefunden, was einerseits auf eine katalytische Restaktivität des Zymogens von Caspase-1 (siehe auch 4.4.7), andererseits auf die Markierung nur einer katalytischen Einheit und damit einem asymmetrischen Verhalten der Einheiten hinweist.

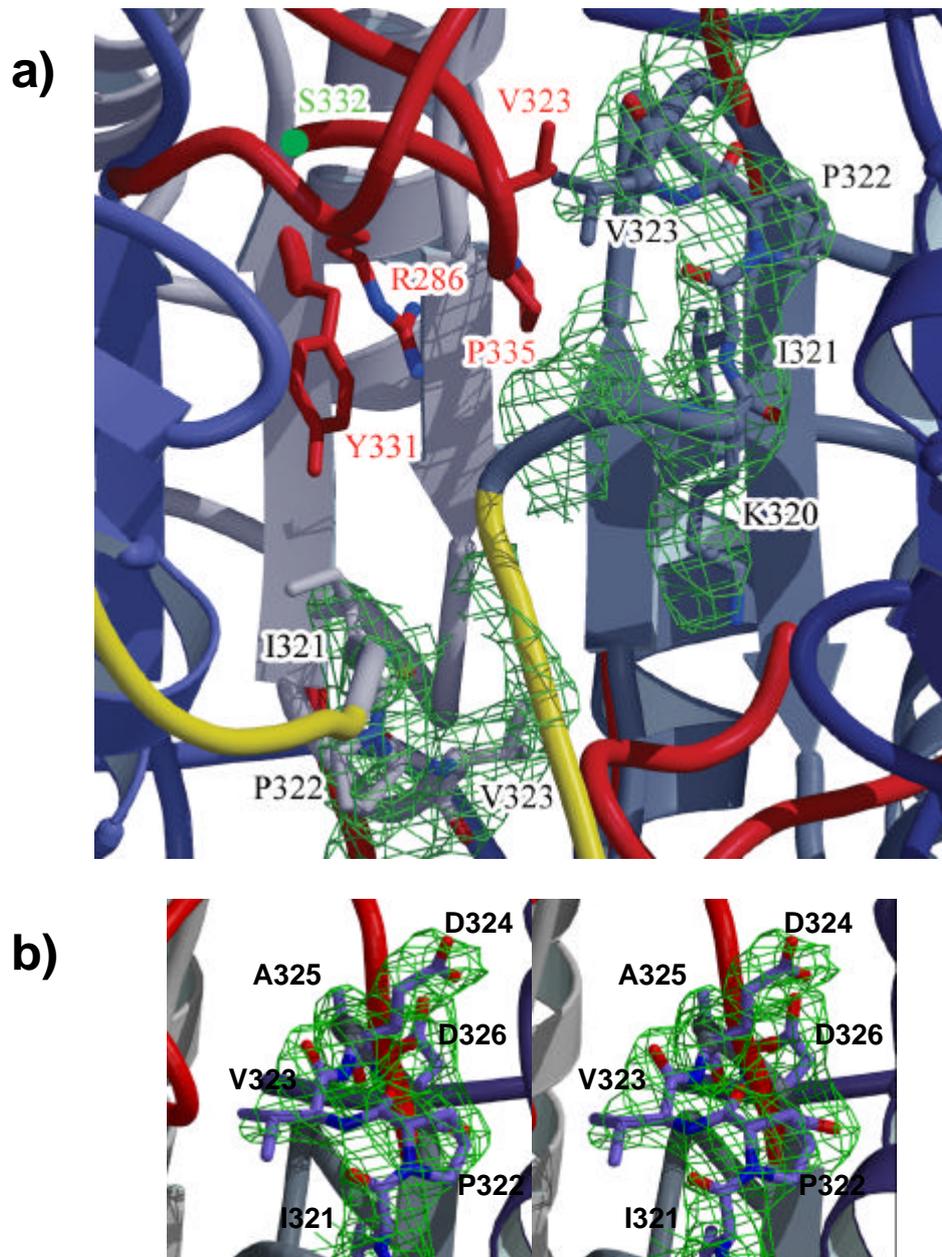


Abbildung 4.4-6 Die Linker besetzen den zentralen Hohlraum in Procaspase-7. **a)** Die Vergrößerung des zentralen Hohlraums zeigt die Überlagerung der Procaspase mit der Inhibitor-gebundenen aktiven Caspase und die finale $2F_o-F_c$ Elektronendichte der Linker (grün). Die Farbwahl ist analog Abbildung 4.4-5. **b)** Stereodarstellung des N-terminalen Abschnitts der kleinen Subdomäne/Untereinheit. Anstatt vom äußeren Ende des Heterotetramers (rot / aktive AcDEVD-CHO inhibierte Caspase) verläuft die N-terminale Region der kleinen Subdomäne aus dem zentralen Hohlraum heraus und ist gut in der Elektronendichte definiert. Die $2F_o-F_c$ Elektronendichte ist für die Reste Ile-321 bis Asp-326 in grün dargestellt (Konturierung bei 1,0 σ).

4.4.7 Allgemeiner Mechanismus der Caspase Aktivierung – Erklärung der verschiedenen Caspase-Zymogenitäten

Die in 4.4.6 aufgeführten Beobachtungen lassen einen allgemeinen Mechanismus der Caspaseaktivierung vermuten. Demnach ist das Zymogen durch die Präsenz der *Linker* im zentralen Hohlraum und den Ausschluß des für die Substratbindung essentiellen 330/340-*Loops* gekennzeichnet. Die Aktivierungsspaltung destabilisiert die dominante Präsenz der *Linker* und die 330/340-*Loops* können dadurch ihre aktive Konformation einnehmen. Zusätzlich sind die nun freien Termini zwischen großer und kleiner Untereinheit in der Lage, das in 4.4.3 erwähnte „Vier-Strang-Bündel“ zu formen und unterstützen die aktive Form der Caspase.

Strukturelle und biochemische Daten weisen darauf hin, daß dieser Mechanismus auch für Caspasen anderer Klassen, wie z.B. den *initiator-Caspasen* gilt und darüber hinaus deren Besonderheiten bezüglich ihrer Aktivierung erklären läßt.

Wie in der Einleitung erwähnt, müssen die *initiator-Caspasen* sensitiv auf extra- oder intrazelluläre Signale reagieren, während die *executioner-Caspasen* den irreversiblen Ablauf des apoptotischen Programms sicherstellen müssen. Daher werden die *executioner-Caspasen-3* und *-7* nach einem Alles-oder-Nichts Mechanismus aktiviert. Das Zymogen besitzt somit fast keine meßbare Aktivität, während die gespaltenen Formen sehr aktive Proteasen darstellen. Diese Caspasen weisen eine sehr hohe Zymogenität auf. Im Gegensatz dazu steht die Aktivierung der *initiator-Caspasen*. Procaspase-9 z.B. besitzt bereits eine Aktivität, die vergleichbar ist mit der von gespaltenen Caspase-9 (Rodriguez and Lazebnik, 1999; Stennicke et al., 1999). Obwohl das Verhalten von Caspase-9 hinsichtlich ihres Multimerisierungstatus und Fähigkeit an einem Multiproteinkomplex, dem Apoptosom, teilzunehmen noch unverstanden ist (Acehan et al., 2002; Renatus et al., 2000; Shiozaki et al., 2002), zeigt gespaltene Caspase-9 ohne seine Adaptordomäne (CARD) in der kürzlich gelösten Kristallstruktur das klassische Caspase-Heterotetramer (Renatus et al., 2001). Diese Struktur birgt die Erklärung für die niedrige Zymogenität von Caspase-9 in sich. Der zentrale Hohlraum ist in dieser Caspase bereits durch den 240-Insertions-*Loop* (zwischen Falblatt drei und 3a) besetzt, der nur in Caspase-9 eine Insertion von sieben Resten hat (Abbildung 4.4-7).

Zusätzlich füllen aromatische Substitutionen der Reste 390 und 393 den Hohlraum (vgl. auch Alignment, Abbildung 4.4-4). Der zentrale Hohlraum ist also bereits besetzt und verhindert dadurch die Konkurrenz der *Linker* mit den 330/340-*Loops*. Des Weiteren zeigt die Caspase-9 Struktur, daß die beiden 240-Insertions-*Loops* (Abbildung 4.4-7) miteinander interagieren. Interessanterweise ist die Folge dieser Interaktion ein leichter Bruch der lokalen Symmetrie im zentralen Hohlraum. Dies könnte in Analogie zur ProCaspase-7 Struktur eine Erklärung dafür sein, daß in der Caspase-9 Struktur einer der beiden 330/340-*Loops* in der inaktiven Form vorliegt. Diese sterische Blockade des zentralen Hohlraums besitzt jedoch nicht die Dynamik der *Linker* in der Procaspase-7, was auch die vergleichsweise niedrigen Temperaturfaktoren für die 240-Insertions-*Loops* in der Caspase-9 Struktur zeigen. Als Folge könnte so die konstitutive Aktivität einer der beiden katalytischen Einheiten von Caspase-9 erlaubt werden.

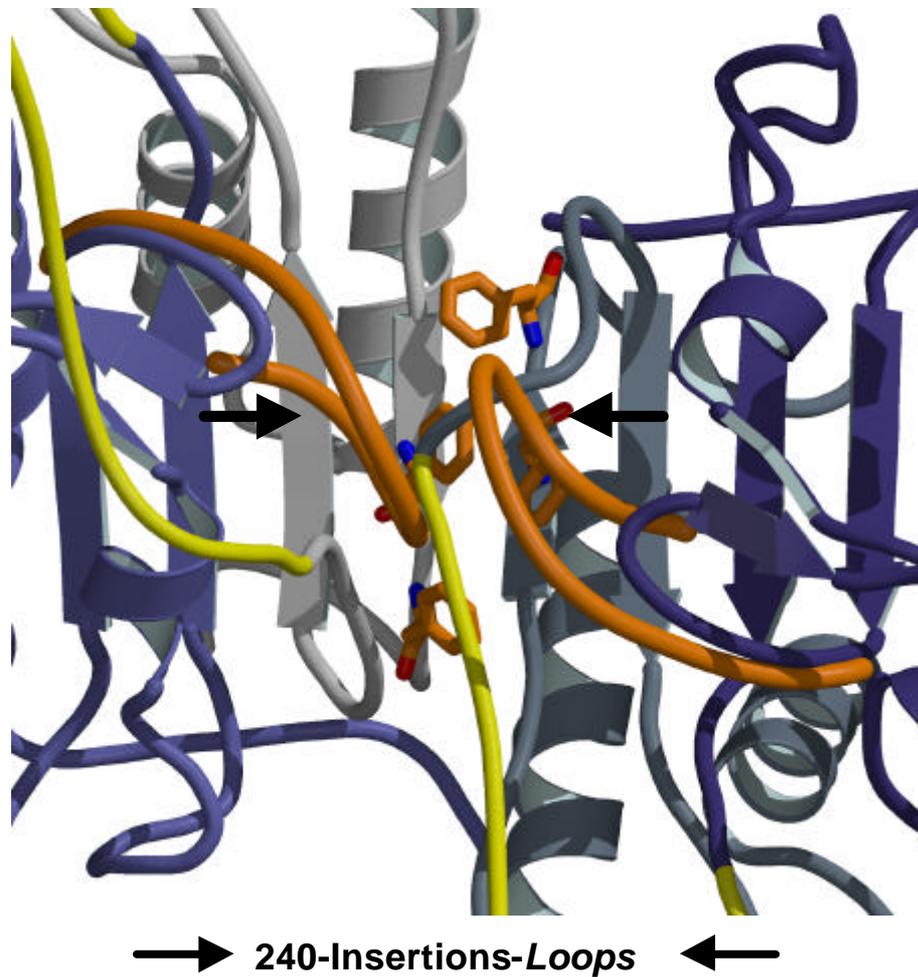


Abbildung 4.4-7 Der zentrale Hohlraum ist in Caspase-9 durch die „240-Insertions-Loops“ besetzt. Gezeigt ist Procaspase-7 mit den „240-Insertions-Loops“ sowie den Resten Phe-390 und Phe-393 der Caspase-9 Struktur (in orange) (Renatus et al., 2001). Die Überlagerung zeigt, daß die dargestellten Caspase-9 Reste den zentralen Hohlraum besetzen, in dem die *Linker* von Procaspase-7 zu liegen kommen.

Ein zusätzliches Kriterium, das die Aktivität der Zymogene beeinflusst, ist die Länge der *Linker* zwischen großer und kleiner Subdomäne der Procaspasen. Die *initiator-Caspasen*-8 und -9 besitzen um sieben bzw. 22 Reste längere *Linker* als die *executioner* Caspase-7 (vergleiche Alignment, Abbildung 4.4-4). Es ist daher vorstellbar, daß die *Linker* bereits Konformationen einnehmen können, wie sie in der gespaltenen Caspase zu finden sind und dadurch die aktive Konformation der „330/340-Loops“ und die Bildung des „vier Strang Bündel“ erlauben oder zumindest weniger stark behindern würden.

Die Struktur des entfernten Caspase Verwandten Gingipain R (Eichinger et al., 1999) zeigt, wie die Aktivierungsspaltung völlig umgangen werden kann. Gingipain R besteht nur aus einer aktiven katalytischen Einheit, während die andere Untereinheit nur rudimentär vorhanden ist, zusätzlich enthält der *Linker* zwischen großer und kleiner Subdomäne eine α -Helix. Die Folge ist, daß die katalytischen Reste und die Substratbindungsregion in eine stabile Struktur eingebunden sind und keinerlei sterische Zwänge von der anderen katalytischen Einheit ausgeübt werden.

Diese Vergleiche weiten den für Procaspase-7 vorgeschlagenen Mechanismus aus. Des weiteren bestätigen Sequenz-Alignments und der Vergleich von Strukturelementen, wie z.B. die Länge der *Linker* in verschiedenen Caspasen, oder wie im Falle der Caspase-9 die Gestalt des zentralen Hohlraums, den von der Procaspase-7 Struktur abgeleiteten Aktivierungsmechanismus.

5 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
(k)Da	(kilo) Dalton
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Ac-	Acetyl-
-AFC	7-Amino-4-trifluoromethylcumarin
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
Apaf-1	<i>apoptosis protease activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	<i>baculoviral IAP repeat</i>
BIR2	hier: Region um 124-242 von XIAP
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	<i>Caspase activator recruitment domain</i>
-CHO	-aldehyd
CrmA	<i>cytokine response modifier A</i>
ddH ₂ O	<i>aqua bidestillata</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
-FMK	-fluoromethylketon
GST	Glutathion-S-Transferasen
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure
His-tag	(His) ₆ – C-terminal an das jeweilige Protein fusioniert
HtrA2	<i>high temperature requirement A2</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid

K _i	Inhibitionskonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
M	molar, mol/l
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
Mes	Morpholinoethansulfonsäure
mm	millimeter
MR	<i>Molecular Replacement</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	nichtkristallographische Symmetrie (<i>noncrystallographic symmetry</i>)
NMR	Magnetische Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD	Optische Dichte
P1,P2, usw.	bezeichnet den ersten, zweiten, usw. Protein-Substratrest vor der Spaltstelle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	<i>Protein Database</i>
PEG	Polyethylenglykol
-pNA	-paranitroanilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r.m.s.-Abweichung	mittlere Standardabweichung (<i>root mean square deviation</i>)
S1, S2, usw.	bezeichnet Reste, die an der Bindung des P1, P2, usw. Restes des Protein-Substrats beteiligt sind
SA	<i>simulated annealing</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smac	<i>second mitochondrial activator of caspases</i>
SSRL	<i>Stanford Synchrotron Radiation Laboratory</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UBC	<i>ubiquitin-conjugating enzymes</i>
usw.	und so weiter
V	Volt
vgl.	vergleiche
XIAP	<i>X-linked IAP</i>
Z-	Benzyloxycarbonyl-
Zymogenität	Verhältnis der Aktivität der prozessierten Protease zur Aktivität der unprozessierten Proform

6 Literatur

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome. Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation, *Mol Cell* 9, 423-32.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell* 87, 171.

Aviles, F. X., Vendrell, J., Guasch, A., Coll, M., and Huber, R. (1993). Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process, *Eur J Biochem* 211, 381-9.

Bangs, P., Franc, N., and White, K. (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*, *Cell Death Differ* 7, 1027-34.

Barrett, A. J., and Rawlings, N. D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases, *Biol Chem* 382, 727-33.

Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments, *Protein Eng* 6, 37-40.

Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P. R., Marco, S. D., Krebs, J. F., Wu, J. C., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis, *Structure Fold Des* 7, 1125-33.

Blundell, T. L., and Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography* (London, Academic Press).

Bode, W., and Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases, *Eur J Biochem* 204, 433-51.

Bode, W., and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction, *Biochim Biophys Acta* 1477, 241-52.

Brünger, A. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355, 472-475.

- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *54*, 905-21.
- Carter, C. W., Jr., and Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments, *J Biol Chem* *254*, 12219-23.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO, *Nature* *406*, 855-62.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., Shi, Y., and Datta, P. (2001a). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP, *Cell* *104*, 769-80.
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., and Shi, Y. (2001b). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding, *Cell* *107*, 399-407.
- Chang, H. Y., and Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol Mol Biol Rev* *64*, 821-46.
- Chimini, G., and Chavrier, P. (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment, *Nat Cell Biol* *2*, E191-6.
- Clem, R. J., Fechheimer, M., and Miller, L. K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells, *Science* *254*, 1388-90.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography, *Acta Crystallographica D* *50*, 760-763.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases, *Embo J* *18*, 5242-51.
- Drenth, J. (1994). Principles of protein X-ray crystallography (New York, Springer Verlag).

- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell* *102*, 33-42.
- Edman, P., and Henschen, A. (1975). Sequence determination. Protein Sequence determination., Vol 2 (Heidelberg, Springer Verlag).
- Eichinger, A., Beisel, H. G., Jacob, U., Huber, R., Medrano, F. J., Banbula, A., Potempa, J., Travis, J., and Bode, W. (1999). Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold, *Embo J* *18*, 5453-62.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* *391*, 43-50.
- Engh, R. A., and Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement, *Acta Cryst A* *47*, 392-400.
- Ewald, P. P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie, *Z Kristallogr* *56*, 491-500.
- Fadeel, B., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2000). The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases, *Leukemia* *14*, 1514-25.
- Fadok, V. A., and Chimini, G. (2001). The phagocytosis of apoptotic cells, *Semin Immunol* *13*, 365-72.
- Fesik, S. W., and Shi, Y. (2001). Structural biology. Controlling the caspases, *Science* *294*, 1477-8.
- Frishman, D., and Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment, *Proteins* *23*, 566-79.
- Gill, C., Mestril, R., and Samali, A. (2002). Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?, *Faseb J* *16*, 135-46.
- Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal Biochem* *182*, 319-26.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformations of *Escherichia Coli* with plasmids., *JMolBiol* 166, 557-580.
- Hanna, W. L., Zhang, X., Turbov, J., Winkler, U., Hudig, D., and Froelich, C. J. (1993). Rapid purification of cationic granule proteases: application to human granzymes, *Protein Expr Purif* 4, 398-404.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement, *Acta Cryst* 9, 1-9.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction, *J Biol Chem* 277, 432-8.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407, 770-6.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen, *Acta Cryst* 10, 750-751.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., and Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain, *Cell* 104, 781-90.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode, *Acta Cryst* 19.
- Huber, R., and Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin, *Accounts of Chemical Research* 11, 114-122.
- Jancarik, J., and Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *J Appl Cryst* 24, 409-411.
- Kabsch, W. (1988). Automatic indexing of rotation diffraction pattern., *J Appl Cryst* 21, 67-71.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26, 239-57.

- Khan, A. R., and James, M. N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes, *Protein Sci* 7, 815-36.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system, *Nature* 407, 789-95.
- Kraulis, P. J. (1993). MOLSCRIPT - A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *Scientist* 7, 16-16.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* 227, 680-685.
- Laskowski, R. A., McArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK - A Programm to che check the stereochemical Quality of Protein Structures, *J Appl Cryst* 26, 283-291.
- Lee, D., Long, S. A., Adams, J. L., Chan, G., Vaidya, K. S., Francis, T. A., Kikly, K., Winkler, J. D., Sung, C. M., Debouck, C., *et al.* (2000). Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality, *J Biol Chem* 275, 16007-14.
- Lee, D., Long, S. A., Murray, J. H., Adams, J. L., Nuttall, M. E., Nadeau, D. P., Kikly, K., Winkler, J. D., Sung, C. M., Ryan, M. D., *et al.* (2001). Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7, *J Med Chem* 44, 2015-26.
- Leslie, A. G. W. (1998). MOSFLM (Cambridge, U.K).
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., and Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain, *Nature* 408, 1004-8.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N. F., Lemoine, N. R., Savopoulos, J., Gray, C. W., Creasy, C. L., Dingwall, C., and Downward, J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif, *J Biol Chem* 277, 439-44.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals, *J Mol Biol* 33, 491-497.

- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization, *Eur J Biochem* *189*, 1-23.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development, *Nature* *407*, 796-801.
- Merritt, E. A., and Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics, *Acta Cryst D* *50*, 869-873.
- Messmer, U. K., and Pfeilschifter, J. (2000). New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells, *Bioessays* *22*, 878-81.
- Mittl, P. R., Di Marco, S., Krebs, J. F., Bai, X., Karanewsky, D. S., Priestle, J. P., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone, *J Biol Chem* *272*, 6539-47.
- Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H., and Nagata, S. (1998). Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9123-8.
- Navaza, J. (1994). An automated package for molecular replacement, *Acta Cryst A* *50*, 157-163.
- Nerheim, P., Krishnan, S. C., Olshansky, B., and Shivkumar, K. (2001). Apoptosis in the genesis of cardiac rhythm disorders, *Cardiol Clin* *19*, 155-63.
- Nicholson, D. W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents, *Nature* *407*, 810-6.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillations mode, *Methods Enzymol* *276*, 307-326.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S., and Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme, *Cell* *69*, 597-604.
- Razvi, E. S., and Welsh, R. M. (1995). Apoptosis in viral infections, *Adv Virus Res* *45*, 1-60.

- Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer, *J Clin Oncol* *17*, 2941-53.
- Reed, J. C. (2001). Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery, *Trends Mol Med* *7*, 314-9.
- Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schaffer, J., Gallay, O., and Huber, R. (1991). The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution, *Embo J* *10*, 1997-2005.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., and Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14250-5.
- Renatus, M., Zhou, Q., Stennicke, H. R., Snipas, S. J., Turk, D., Bankston, L. A., Liddington, R. C., and Salvesen, G. S. (2000). Crystal structure of the apoptotic suppressor CrmA in its cleaved form, *Structure Fold Des* *8*, 789-97.
- Rich, T., Allen, R. L., and Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage, *Nature* *407*, 777-83.
- Riedl, S. J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G. S., and Bode, W. (2001a). Structural basis for the activation of human procaspase-7, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14790-5.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., and Salvesen, G. S. (2001b). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP, *Cell* *104*, 791-800.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Snipas, S. J., and Salvesen, G. S. (2001c). Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35, *Biochemistry* *40*, 13274-80.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme, *Genes Dev* *13*, 3179-84.
- Rossmann, M. G., and Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit, *Actas Cryst* *15*, 24-31.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., *et al.* (1996). The three-

- dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis, *Nat Struct Biol* 3, 619-25.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391, 96-9.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell* 91, 443-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis, *Mol Cell* 9, 459-70.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., and Shi, Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4197-202.
- Silke, J., and Vaux, D. L. (2001). Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis, *J Cell Sci* 114, 1821-7.
- Simonovic, M., Gettins, P. G. W., and Volz, K. (2000). Crystal structure of viral serpin crmA provides insights into its mechanism of cysteine proteinase inhibition, *Protein Sci* 9, 1423-7.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, *Mol Cell* 1, 949-57.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis, *Nature* 410, 112-6.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing, *J Biol Chem* 274, 8359-62.

- Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., *et al.* (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8, *J Biol Chem* 273, 27084-90.
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A., and Salvesen, G. S. (2002). Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition, *Trends Biochem Sci* 27, 94-101.
- Stennicke, H. R., and Salvesen, G. S. (1997). Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8, *J Biol Chem* 272, 25719-23.
- Stennicke, H. R., and Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases, *Biochim Biophys Acta* 1387, 17-31.
- Stout, G. H., and Jensen, L. H. (1989). X-ray structure determination (New York, John Wiley).
- Stubbs, M. T., and Bode, W. (1994). Coagulation factors and their inhibitors, *Curr Opin Struct Biol* 4, 823-32.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *J Mol Biol* 219, 37-44.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Duben hoff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol* 185, 60-89.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A. H., Meadows, R. P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S. C., and Fesik, S. W. (1999). NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP, *Nature* 401, 818-22.
- Sun, C., Cai, M., Meadows, R. P., Xu, N., Gunasekera, A. H., Herrmann, J., Wu, J. C., and Fesik, S. W. (2000). NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP, *J Biol Chem* 275, 33777-81.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001a). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death, *Mol Cell* 8, 613-21.

- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C., and Takahashi, R. (2001b). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes, *J Biol Chem* 276, 27058-63.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001c). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-7.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases, *J Biol Chem* 273, 7787-90.
- Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 849-61.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within, *Science* 281, 1312-6.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Turk, D. (1996). MAIN 96: An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis. Paper presented at: Proceedings from the 1996 meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Macromolecular Computing School.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity, *Cell Death Differ* 9, 20-6.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a

- mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins, *Cell* 102, 43-53.
- Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins, *J Biol Chem* 277, 445-54.
- Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., and *et al.* (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer, *Cell* 78, 343-52.
- Warner, T. F. (1972). Apoptosis, *Lancet* 2, 1252.
- Watt, W., Koeplinger, K. A., Mildner, A. M., Henrikson, R. L., Tomasselli, A. G., and Watenpaugh, K. D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis, *Structure Fold Des* 7, 1135-43.
- Weedon, D., Searle, J., and Kerr, J. F. (1979). Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology, *Am J Dermatopathol* 1, 133-44.
- Wei, Y., Fox, T., Chambers, S. P., Sintchak, J., Coll, J. T., Golec, J. M., Swenson, L., Wilson, K. P., and Charifson, P. S. (2000). The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity, *Chem Biol* 7, 423-32.
- Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., and *et al.* (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme, *Nature* 370, 270-5.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO, *Nature* 408, 1008-12.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G., and Wu, H. (2001). Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex, *Nature* 410, 494-7.

- Yamin, T. T., Ayala, J. M., and Miller, D. K. (1996). Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme, *J Biol Chem* *271*, 13273-82.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli, *Science* *288*, 874-7.
- Yaoita, Y. (2002). Inhibition of nuclear transport of caspase-7 by its prodomain, *Biochem Biophys Res Commun* *291*, 79-84.
- Yuan, J., and Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system, *Nature* *407*, 802-9.
- Zhou, Q., Krebs, J. F., Snipas, S. J., Price, A., Alnemri, E. S., Tomaselli, K. J., and Salvesen, G. S. (1998). Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex, *Biochemistry* *37*, 10757-65.
- Zhou, Q., and Salvesen, G. S. (1997). Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity, *Biochem J* *324*, 361-4.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases, *J Biol Chem* *272*, 7797-800.
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C., and Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death, *Pharmacol Ther* *92*, 57-70.