

Charakterisierung und Stabilisierung von 14-3-3-Protein-Protein- Wechselwirkungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat)

vorgelegt von

Manuela Molzan

Mai 2012

Betreuender Hochschullehrer: Prof. Dr. A. Wittinghofer
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund

eingereicht an der Technischen Universität Dortmund
im Fachbereich Chemie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2008 bis April 2012 am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Ottmann durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten in den folgenden Veröffentlichungen publiziert werden:

M. Molzan*, B. Schumacher*, C. Ottmann*, A. Baljuls, L. Polzien, M. Weyand, P. Thiel, R. Rose, M. Rose, P. Kuhenne, M. Kaiser, U.R. Rapp, J. Kuhlmann, C. Ottmann. Impaired binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(19):4698-4711, October 2010.

*geteilte Erstautorenschaft

M. Molzan, M. Weyand, R. Rose, C. Ottmann. Structural insights of the MLF1/14-3-3 interaction. *The FEBS Journal*, 279(4):563-571, February 2012.

1. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Wittinghofer
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Und so kommt zum guten Ende alles unter einen Hut.

(aus „Die Dreigroschenoper“ von Bertolt Brecht)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Protein-Protein-Wechselwirkungen	3
1.1.1. Klassifizierung und Charakterisierung	3
1.1.2. Transiente Protein-Protein-Wechselwirkungen	5
1.2. Modulation von transienten Protein-Protein-Wechselwirkungen	6
1.2.1. Inhibition	6
1.2.2. Stabilisation	6
1.3. 14-3-3-Proteine	9
1.3.1. Entdeckung und Namensgebung	9
1.3.2. Vorkommen und Sequenzhomologie	9
1.3.3. Struktur und Funktion	11
1.3.4. Physiologische Bedeutung	16
1.4. Die 14-3-3/MLF1-Wechselwirkung	17
1.4.1. Der myeloide Leukämiefaktor 1 (MLF1)	17
1.4.2. Aminosäuresequenz von MLF1	18
1.4.3. Wechselwirkung von MLF1 mit 14-3-3-Proteinen	20
1.5. Die 14-3-3/C-RAF-Wechselwirkung	22
1.5.1. Vorkommen und Isoformen der Serin-/Threoninproteinkinase RAF	22
1.5.2. Struktur von RAF-Kinasen	23
1.5.3. Physiologische Bedeutung von RAF und die MAPK-Signalkaskaden	24
1.5.4. Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen	26
2. Zielsetzung	32
3. Material und Methoden	33
3.1. Material	33
3.1.1. Geräte	33
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	34
3.1.3. Chemikalien	35
3.1.4. Proteine, Enzyme und Proteasen	35
3.1.5. Antibiotika	36
3.1.6. Größenstandards	36

3.1.7.	FPLC-Säulen und Säulenmaterial	36
3.1.8.	Molekularbiologische Kits	36
3.1.9.	Transfektions Kits	36
3.1.10.	Antikörper	37
3.1.11.	Peptide	37
3.1.12.	Medien für die Kultivierung von <i>E.coli</i>	38
3.1.13.	Puffer und Lösungen	39
3.1.14.	Bakterienstämme	43
3.1.15.	Säugerzelllinien	43
3.1.16.	Plasmide	44
3.1.17.	Oligonukleotide	44
3.2.	Molekularbiologische Methoden	44
3.2.1.	PCR	44
3.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.2.3.	Aufreinigung von DNS aus einem Agarosegel	46
3.2.4.	Restriktionsverdau	46
3.2.5.	Ligation	47
3.2.6.	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	47
3.2.7.	Isolierung von Plasmid-DNS	47
3.2.8.	Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNS	48
3.2.9.	Sequenzierung von Plasmid-DNS	48
3.2.10.	Zielgerichtete Mutagenese	49
3.3.	Mikrobiologische Methoden	50
3.3.1.	Kultivierung von <i>E.coli</i>	50
3.3.2.	Bestimmung der Zelldichte von <i>E.coli</i>	51
3.3.3.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	51
3.3.4.	Lagerung transformierter <i>E.coli</i>	51
3.4.	Zellbiologische Methoden	51
3.4.1.	Kultivierung von Säugerzellen	51
3.4.2.	Bestimmung der Zellzahl	52
3.4.3.	Lagerung von Säugerzellen	52
3.4.4.	Transfektion von Säugerzellen	53
3.4.5.	Herstellung von Zelllysate	56
3.4.6.	Immunblot	57
3.4.7.	Immunfärbung	58

3.4.8. Konfokale Lasermikroskopie	59
3.5. Proteinaufreinigung	60
3.5.1. Proteinexpression in <i>E.coli</i>	60
3.5.2. Zellaufschluss	61
3.5.3. Affinitätschromatographie	61
3.5.4. Ultrafiltration	62
3.5.5. Dialyse	62
3.5.6. Abspaltung des His- <i>Tags</i>	63
3.5.7. Präparative Gelfiltration	63
3.5.8. Lagerung von Protein	64
3.6. Proteinanalytische Methoden	65
3.6.1. SDS-Gel Elektrophorese	65
3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	66
3.7. Biochemische und biophysikalische Methoden	67
3.7.1. Isothermale Titrationskalorimetrie	67
3.7.2. Fluoreszenzpolarisation	69
3.7.3. Oberflächenplasmonenresonanz	73
3.8. Strukturbiologische Methoden	75
3.8.1. Proteinkristallisation	75
3.8.2. Reproduktion und Optimierung von Proteinkristallen	77
3.8.3. Kryokonservierung von Proteinkristallen	77
3.8.4. Röntgenbeugungsmessung von Proteinkristallen	78
3.8.5. Computergestützte Strukturbestimmung	79
4. Ergebnisse	82
4.1. Biochemische Charakterisierung der Wechselwirkung von MLF1 und 14-3-3	82
4.2. Zellbiologische Untersuchungen zur 14-3-3-abhängigen MLF1-Lokalisation	85
4.2.1. Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen . .	85
4.2.2. Lokalisation des verkürzten humanen MLF1-Proteins in HEK293T- Zellen	87
4.2.3. Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in anderen Säugerzellen	91
4.3. Untersuchung der S259-vermittelten Bindung von C-RAF an 14-3-3-Proteine	94
4.3.1. Lokalisation von endogenem C-RAF in Gegenwart von C-terminal verkürzten 14-3-3-Bindemutanten des C-RAF	94

4.3.2.	Physiologischer Effekt der mutierten 14-3-3-Bindestelle um S259 in C-RAF	96
4.4.	Untersuchung der S233-vermittelten 14-3-3-Bindung von C-RAF	98
4.4.1.	Biochemische Charakterisierung der S233-vermittelten Wechselwirkung von C-RAF und 14-3-3	98
4.4.2.	Strukturbiologische Untersuchung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung	104
4.4.3.	Zellbiologische Untersuchung	109
4.5.	Stabilisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung durch Cotylenin A	114
4.5.1.	Mögliche Stabilisierung der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung	114
4.5.2.	Stabilisierung des C-RAF/14-3-3-Komplexes durch Cotylenin A	117
4.5.3.	Einfluss von Cotylenin A auf die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung	123
5.	Diskussion und Ausblick	130
5.1.	Untersuchung der Wechselwirkung von MLF1 mit 14-3-3-Proteinen	130
5.1.1.	MLF1 kann über pS34 direkt mit 14-3-3-Proteinen interagieren	130
5.1.2.	Die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 ist in Zellen humanen Ursprungs nicht direkt 14-3-3-abhängig	131
5.2.	Stabilisierung der Wechselwirkung von MLF1 und 14-3-3-Proteinen	134
5.3.	Untersuchung der Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen	135
5.3.1.	Physiologischer Effekt von S259	135
5.3.2.	S233- und S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung	137
5.4.	Stabilisierung der Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen durch Cotylenin A	143
Literatur		149
A. Anhang		177
A.1.	Abkürzungsverzeichnis	177
A.2.	Zusätzliches Material	185
A.2.1.	Chemikalienliste	185
A.2.2.	Vektorkarten	187
A.2.3.	Verwendete Konstrukte	190
A.2.4.	Verwendete Oligonukleotide	191

A.3. Bestimmung des K_D -Werts über biophysikalische Messungen im thermischen Gleichgewicht	193
A.4. Abbildungen und Tabellen	195
Danksagung	202
Eigenständigkeitserklärung	203

Abbildungsverzeichnis

1.1. Klassifizierung von PPIs nach ihrer Lebensdauer	4
1.2. Regulationsmechanismen von transienten PPIs	5
1.3. Strukturmodell des ternären Komplexes aus 14-3-3-Protein, dem C-Terminus der PMA2 und FCA	8
1.4. Sequenzvergleich von 14-3-3-Proteinen	10
1.5. Strukturmodell der humanen 14-3-3-Isoform ζ	11
1.6. Strukturelle Homologie von 14-3-3-Proteinen	12
1.7. Vergleich der 14-3-3-Bindemotive <i>mode</i> I-III	14
1.8. Komplex aus 14-3-3 ζ und ExoS-Peptid	15
1.9. Einfluss der 14-3-3-Wechselwirkung auf den Interaktionspartner	16
1.10. Sequenzvergleich der bisher gefundenen MLF1-Proteine	19
1.11. 14-3-3-abhängige Lokalisation von murinem MLF1 in Cos-7-Zellen	20
1.12. Vorgeschlagene Regulation der subzellulären Lokalisation von MLF1	21
1.13. Strukturmodell des Komplexes aus 14-3-3 ϵ und MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34	22
1.14. Strukturvergleich der drei RAF-Isoformen	23
1.15. MAPK-Signalkaskade	25
1.16. Zusammenhang zwischen B-RAF- und C-RAF-Heterodimerisierung und dem <i>cross talk</i> des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs	26
1.17. Regulation von C-RAF durch 14-3-3-Proteine	29
1.18. C-RAF-Mutationen in Noonan- und LEOPARD-Syndromen	30
1.19. Strukturmodell des Komplexes aus 14-3-3 ζ und C-RAF ₍₂₅₅₋₂₆₄₎ pS259	30
1.20. Lokalisation von C-RAF in HEK293-Zellen	31
3.1. Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer	53
3.2. Vertikale Versuchsanordnung für einen Immunblot im SemidryBlot-Gerät	58
3.3. Verschiedene Formen der Fluoreszenzmikroskopie	60
3.4. Isothermale Titrationskalorimetrie	68
3.5. Schematische Abbildung eines Fluoreszenzpolarisationsversuchs	70
3.6. Oberflächenplasmonenresonanz	74
3.7. Phasendiagramm eines Proteins	75
3.8. Die Methode des hängenden und sitzenden Tropfens	76
3.9. Bragg'sches Gesetz bei der Röntgenkristallographie	78
4.1. Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten His6-14-3-3 ϵ (VL)	82
4.2. Ergebnis einer ITC-Messung von 14-3-3 ϵ mit MLF1-Phosphopeptid	83

4.3. Ausschnitt des Strukturmodells des 14-3-3 ϵ /MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34-Komplexes	84
4.4. Lokalisation von GFP-Fusionen des humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen	85
4.5. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des humanen MLF1-Proteins	86
4.6. Lokalisation der angegebenen NES-Mutanten des GFP-MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen	87
4.7. Schematische Darstellung der verkürzten MLF1-Proteine	87
4.8. Lokalisation von C-terminal verkürztem MLF1-GFP in HEK293T-Zellen	88
4.9. Co-Transfektion von HEK293T-Zellen mit C-terminal verkürztem MLF1-GFP und 14-3-3 ϵ -mCherry	89
4.10. Lokalisation von N-terminal verkürztem MLF1 in HEK293T-Zellen	91
4.11. Lokalisation von GFP-Fusionen des humanen MLF1-Proteins in Cos-7-Zellen	92
4.12. Immunfärbung von endogenem C-RAF in transfizierten HEK293-Zellen .	95
4.13. Immunblot von Zelllysate aus transfizierten HEK293T-Zellen	97
4.14. Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten His6-14-3-3 ζ (VL)-Proteins	98
4.15. Affinitätsmessung von unterschiedlichen FAM-markierten C-RAF-Phosphopeptiden und His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mittels FP	99
4.16. Bindung des C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259-Diphosphopeptids an ein 14-3-3-Dimer	101
4.17. ITC-Messung von C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259 und His6-14-3-3 ζ (VL) . . .	102
4.18. Bestimmung der Bindungsstöchiometrie mittels FP	103
4.19. Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten 14-3-3 ζ Δ C-Proteins	104
4.20. Initiale Kristalle des 14-3-3 ζ Δ C/C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259-Komplexes .	105
4.21. Strukturmodell des C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259/14-3-3 ζ -Komplexes . . .	106
4.22. Symmetrieverwandte C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS255/14-3-3 ζ -Komplexe im Proteinkristall	108
4.23. Lokalisation von GFP-C-RAF ₃₃₀ Δ C in HEK293T-Zellen	110
4.24. Co-Expression von GFP-C-RAF ₃₃₀ Δ C und mCherry-H-RAS in HEK293T-Zellen	113
4.25. Immunblot von Zelllysate aus transfizierten HEK293T-Zellen	114
4.26. ITC-Messung von His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF-Peptiden ohne und mit FCA	115
4.27. Vergleich der Bindegruben für einen möglichen Stabilisator	116

4.28. Die Naturstoffe Fusicoccin A und Cotylenin A	117
4.30. Untersuchung des Einflusses von CNA auf die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung mittels SPR	119
4.29. Strukturmodell des ternären 14-3-3 ζ /C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259/CNA- Komplexes	120
4.31. EC ₅₀ -Bestimmung von CNA mittels FP	122
4.32. K _D der His6-14-3-3 ζ (VL)/FAM-C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259-Wechselwir- kung in Anwesenheit von 500 μ M CNA	123
4.33. Vergleich der Affinitäten der C-RAF-S259- und C-RAF-S621-Bindestellen an His6-14-3-3 ζ (VL) mittels FP	123
4.34. Vergleich des Einflusses von CNA auf die S259- und S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung mittels FP	124
4.35. Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten His6-14-3-3 $\sigma\Delta$ C-Proteins	125
4.36. Strukturmodell der S621-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung . .	127
4.37. Überlagerung der Strukturmodelle	128
5.1. Fragment im 14-3-3 ϵ /MLF1 ₂₉₋₄₂ pS34-Komplex	135
5.2. Unterschiedliche MAPK-Aktivierungszustände	146
5.3. FRET-basierter zellulärer Sensor	147
5.4. C-RAF-Aktivierung über B-RAF	148
A.1. Der pProEXHTb-Vektor von Invitrogen	188
A.2. Der pEGFP-C1-Vektor von Clontech	189
A.3. Reaktionsmechanismus der Substratumwandlung der alkalischen Phos- phatase	195
A.4. Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 $\zeta\Delta$ C und C-RAF ₍₂₂₉₋₂₉₆₎ pS233,pS259	196
A.5. Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 $\zeta\Delta$ C, C-RAF ₍₂₂₉₋₂₉₆₎ pS233,pS259 und CNA	198
A.6. Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 $\sigma\Delta$ C und C-RAF ₍₆₁₈₋₆₂₆₎ pS621	200

Tabellenverzeichnis

1.	Übersicht der phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Bindemotive <i>mode</i> I-III.	13
2.	In dieser Arbeit verwendete Antikörper.	37
3.	In dieser Arbeit verwendete Peptide.	37
4.	Antibiotikakonzentrationen.	39
5.	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.	43
6.	In dieser Arbeit verwendete Säugerzelllinien.	43
7.	In dieser Arbeit verwendete Leervektoren.	44
8.	Tris-Tricin-Gel.	65
9.	Zusammenfassung der Ergebnisse der ITC-Messungen von 14-3-3 ϵ mit verschiedenen MLF1-Phosphopeptiden.	84
10.	Ergebnisse der FP-Messung von verschiedenen C-RAF-Phosphopeptiden mit His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein	100
11.	Ergebnisse der ITC-Messungen des C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259-Peptids mit His6-14-3-3 ζ (VL)	102
12.	Initiale und optimierte Kristallisationsbedingungen des Komplexes aus C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259-Peptid und 14-3-3 ζ Δ C.	105
13.	Ergebnisse der ITC-Messungen von His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF-Phosphopeptid beziehungsweise des His6-14-3-3 ζ (VL)/C-RAF-Komplexes mit FCA.	115
14.	Ergebnisse der EC ₅₀ -Messungen von CNA mit FAM-C-RAF-Peptiden und His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mittels FP.	122
15.	Ergebnisse der K _D -Messungen verschiedener FAM-C-RAF-Peptide und His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mittels FP.	124
16.	Direkte Abstände von P235 zu R256 des C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259-Diphosphopeptids in verschiedenen Konformationen (<i>cis</i> und <i>trans</i>).	139
17.	In dieser Arbeit verwendete Konstrukte.	191
18.	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.	192
19.	Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C und C-RAF ₍₂₂₉₋₂₉₆₎ pS233,pS259.	197
20.	Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C, C-RAF ₍₂₂₉₋₂₉₆₎ pS233,pS259 und CNA.	199
21.	Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 σ Δ C und C-RAF ₍₆₁₈₋₆₂₆₎ pS621.	201

Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen PPI-Stabilisatoren müssen PPIs von Interesse zunächst umfassend charakterisiert werden. Es gilt außerdem zu überprüfen, ob eine Stabilisierung der untersuchten PPI pharmakologisch sinnvoll ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen von 14-3-3-Proteinen mit MLF1 und C-RAF mit biochemischen und strukturellen Methoden charakterisiert. Um zu überprüfen, ob eine Stabilisierung dieser Wechselwirkungen pharmakologisch sinnvoll ist, wurde überdies mit zellbiologischen Methoden der physiologische Effekt dieser Wechselwirkungen untersucht.

Basierend auf der im Vorfeld dieser Arbeit gelösten Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus 14-3-3 ϵ und MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34 wurde die MLF1/14-3-3-Wechselwirkung mittels ITC untersucht. Der erhaltene K_D -Wert für das WT-MLF1-Peptid lag erwartungsgemäß im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Untersuchung verschiedener MLF1-Mutanten zeigte, dass neben dem pS34 nur das F33 einen signifikanten Beitrag zur Bindung an 14-3-3-Proteine leistet. Weiterhin wurde durch den Einsatz von GFP-MLF1-Fusionsproteinen die subzelluläre Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen auf eine direkte 14-3-3-Abhängigkeit untersucht, wie sie von Winteringham *et al.* (2006) für murines MLF1 in Cos-7-Zellen beobachtet wurde. Es zeigte sich jedoch, dass die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 in HEK293T-Zellen nicht direkt 14-3-3-abhängig ist und der von Winteringham *et al.* (2006) vorgeschlagene Mechanismus zur Regulation von murinem MLF1 durch 14-3-3-Proteine nicht direkt auf das humane Homolog übertragbar ist.

Die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung wurde im Vorfeld dieser Arbeit bereits intensiv mit strukturellen, biochemischen und zellbiologischen Methoden charakterisiert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der physiologische Effekt von Mutationen der 14-3-3-Bindestelle um S259, wie sie in Noonan- und LEOPARD-Syndromen gefunden wurden, untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutationen aktivierend auf den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg wirken. Diese Auswirkung konnte bereits für die anderen, in Noonan- und LEOPARD mutierten Gene, PTPN11, SOS1 und KRAS, gezeigt werden (Tartaglia *et al.*, 2001; Carta *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2007; Tartaglia *et al.*, 2007). Es zeigte sich weiterhin, dass die eingesetzten, C-terminal verkürzten C-RAF-Mutanten keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der endogenen C-RAF-Proteine hatten. Dieses Ergebnis bekräftigt die These, dass C-RAF-Proteine über ihren C-terminalen Bereich dimerisieren (Weber *et al.*, 2001; Rushworth *et al.*, 2006).

Die biochemische Untersuchung der S233-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung zeigte, dass 14-3-3-Proteine sowohl über S233 als auch gleichzeitig über S233 und S259 an C-RAF binden können. Die S233-vermittelte Bindung ist dabei deutlich schwächer als die S259-vermittelte Bindung. Eine gleichzeitige Bindung über S233 und S259 wirkt synergistisch und erhöht die Affinität deutlich. Die Messung der Bindungsstöchiometrie (N) von 14-3-3 ζ an das C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Diphosphopeptid über ITC und FP ergab einen Wert von $N \approx 1$ bezogen auf ein 14-3-3-Dimer. Die strukturelle Untersuchung legte eine Bindung des C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Diphosphopeptids an ein 14-3-3 ζ -Dimer in einer *cis*-Konformation nahe, wobei eine Bindung an zwei Dimere in *trans* nicht ausgeschlossen werden kann. Zellbiologische Untersuchungen zeigten, dass GFP-C-RAF₃₀₀ Δ C sowohl über die S259- als auch die S233-vermittelte 14-3-3-Wechselwirkung in unstimulierten Zellen im CP gehalten wird. Eine Störung dieser Wechselwirkung hat eine Translokation des GFP-C-RAF₃₀₀ Δ C-Proteins zur Folge und führt zu einer Co-Lokalisation mit H-RAS an der PM.

Aufgrund der durch die Charakterisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung gewonnenen Erkenntnisse erscheint eine Stabilisierung der gleichzeitig über S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung pharmakologisch sinnvoll. Es wurde daher nach einem möglichen Stabilisator gesucht. Der bisher einzige bekannte Stabilisator von 14-3-3-Protein-Wechselwirkungen, FCA (Ottmann *et al.*, 2007a), hatte jedoch keinen stabilisierenden Effekt auf die S233- und S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung. Da das strukturell verwandte Molekül CNA an einen Komplex aus einem C-RAF₍₂₅₅₋₂₆₅₎pS259,M265A-Peptid und dem pflanzlichen 14-3-3c binden kann (Ottmann *et al.*, 2009), wurde es auf seine stabilisierende Wirkung hin untersucht. CNA stabilisiert demnach sowohl die S233- und die S259-vermittelte als auch die über beide 14-3-3-Bindestellen gleichzeitig vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung. Auf die aktivierende S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung hat es keinen Einfluss, was durch FP und strukturelle Methoden belegt werden konnte.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stabilisierung der MLF1/14-3-3-Wechselwirkung pharmakologisch nicht sinnvoll ist. Die Stabilisierung der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung dagegen kann als pharmakologisch sinnvoll eingestuft werden und ein erster Stabilisator, CNA, wurde identifiziert und sowohl biochemisch als auch strukturell charakterisiert. Die Untersuchungen zeigten, dass CNA die S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkungen sowohl einzeln als auch gleichzeitig stabilisieren kann, aber auf die aktivierende, S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung keinen Einfluss hat.

1. Einleitung

Das Proteom ist das Produkt der Genomexpression und besteht aus allen Proteinen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorhanden sind. Eine „typische“ Säugerzelle, zum Beispiel eine Leber-Hepatozyte, enthält $\sim 10.000-20.000$ verschiedene Proteine. Insgesamt entspricht dies etwa 8×10^9 einzelnen Molekülen, die 18-20% (etwa 0,5 ng) des Gesamtgewichts einer Zelle ausmachen (Alberts *et al.*, 1994; Lodish *et al.*, 2000). Die Anzahl einzelner Proteine ist unterschiedlich und reicht von seltenen Proteinen mit weniger als 20.000 Molekülen pro Zelle bis zu 100 Millionen Molekülen pro Zelle für häufige Proteine (Brown, 2002).

Das Proteom stellt die Verbindung vom Genom zu den biochemischen Prozessen dar, die in einer Zelle stattfinden. Zu diesen biochemischen Prozessen zählen neben Stoffwechselfvorgängen zum Beispiel Zellteilung, Apoptose oder regulatorische Aktivitäten wie Signalweiterleitung. Bei all diesen Vorgängen interagieren die unterschiedlichen Proteine miteinander. Die Gesamtheit der in der Zelle stattfindenden Protein-Protein-Wechselwirkungen wird als Protein-Interaktom bezeichnet (Cusick *et al.*, 2005).

1.1. Protein-Protein-Wechselwirkungen

Als Protein-Protein-Wechselwirkung (englisch: *protein-protein interaction*, PPI) wird ein direkter, physikalischer, nicht kovalenter Kontakt zwischen zwei oder mehreren Proteinen bezeichnet, der sich durch seine Spezifität von einem Zufallsereignis abgrenzt. Allerdings zählen die Kontakte, die ein Protein natürlicherweise während seiner Biosynthese oder seines Abbaus macht, zum Beispiel mit Chaperonen oder dem Proteasom, nicht zu den PPIs (De Las Rivas und Fontanillo, 2010). Die meisten exprimierten Proteine sind Teil eines Komplexes, wobei ein Protein an mehreren unterschiedlichen Komplexen beteiligt sein kann.

1.1.1. Klassifizierung und Charakterisierung

Zunächst können PPIs aufgrund der Komplexzusammensetzung unterschieden werden. Komplexe, die aus nur einer Art von Untereinheit (auch Protomer genannt) bestehen, werden als Homooligomere bezeichnet. Komplexe, die aus mehr als einer Art von Protomeren bestehen, werden Heterooligomere genannt. Eine weitere Unterscheidung, die aber meist mit der zuvor genannten zusammenhängt, ist die Unterscheidung nach der Verbindlichkeit des Komplexes. Homooligomere sind meist obligatorisch. Das heißt, dass die einzelnen Protomere nur im Komplex stabil sind. Heterooligomere dagegen sind nicht

obligatorisch; ihre Protomere sind auch einzeln stabil. Aus dieser Unterscheidung leitet sich eine weitere Klassifizierungsmöglichkeit von PPIs ab, nämlich ihre Lebensdauer (siehe Abbildung 1.1). Homooligomere, obligatorische Komplexe sind meist permanent. Ein Beispiel hierfür sind Homodimer-Wechselwirkungen. Hingegen liegen heterooligomere, nicht obligatorische Komplexe meist nur transient vor (Jones und Thornton, 1996; Nooren und Thornton, 2003a; Perkins *et al.*, 2010).

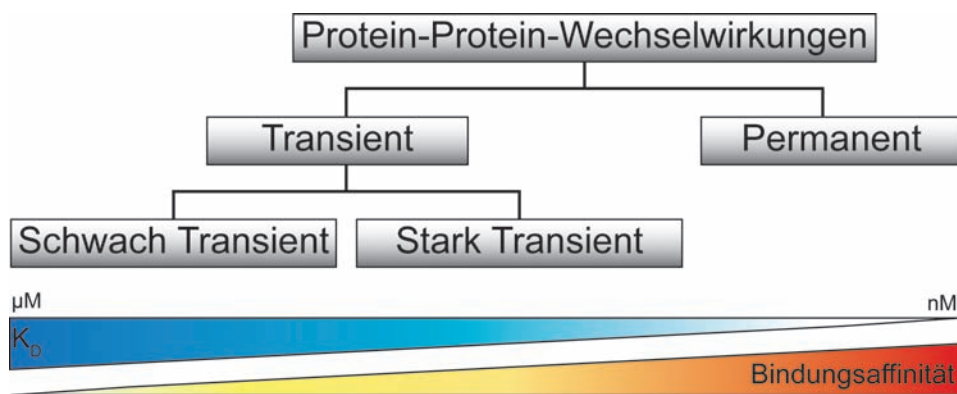


Abbildung 1.1: Klassifizierung von PPIs nach ihrer Lebensdauer. Abbildung modifiziert nach Perkins *et al.* (2010).

Die Charakterisierung von PPIs anhand von strukturellen Daten zeigte, dass die durchschnittliche Größe der Kontaktflächen von ~ 800 bis zu über 10.000 \AA^2 variiert und mit dem Molekulargewicht der Protomere korreliert (Jones und Thornton, 1996; Bahadur und Zacharias, 2008). Die Form der Kontaktflächen ist eher planar und zirkulär (Jones und Thornton, 1996) und sie bestehen zu etwa 65 % aus hydrophoben und 35 % aus polaren Aminosäuren (AS) (Miller *et al.*, 1987; Jones und Thornton, 1995; Bahadur *et al.*, 2003). Im Schnitt gibt es ein Wassermolekül pro 100 \AA^2 und eine Wasserstoffbrücke zwischen den Protomeren pro 200 \AA^2 Kontaktfläche (Bahadur und Zacharias, 2008). Das Ausmaß von Konformationsänderungen variiert für unterschiedliche PPIs und reicht von minimalen Änderungen bis hin zu der Umlagerung ganzer Domänen. Insgesamt zeigten Untersuchungen, dass transient interagierende Proteine kleinere Kontaktflächen aufweisen als permanente PPIs. Zudem sind diese Kontaktflächen weniger hydrophob als die permanenter PPIs und unterscheiden sich daher kaum vom Rest des Proteins. Außerdem weisen sie häufig viele Wassermoleküle auf (Jones und Thornton, 1996; Lo Conte *et al.*, 1999; Chakrabarti und Janin, 2002; Nooren und Thornton, 2003a,b; Mintseris und Weng, 2003; Ansari und Helms, 2005). Durch ein sogenanntes *Alanin-Scanning* (Clackson und Wells, 1995) konnte gezeigt werden, dass nur etwa 9,5 % aller AS der Kontaktflächen sogenannte *Hot Spots* darstellen (Thorn und Bogan, 2001; Moreira *et al.*, 2007). Die

se *Hot Spots* leisten einen signifikanten Beitrag zur Affinität der PPI. Sie bestehen oft aus den AS Tryptophan (21%), Arginin (13,3%) und Tyrosin (12,3%). Die Mutation einer dieser AS zu einem Alanin erhöht ΔG um mindestens $2,0 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$ (Thorn und Bogan, 2001; Moreira *et al.*, 2007).

1.1.2. Transiente Protein-Protein-Wechselwirkungen

Wie in Abbildung 1.1 ersichtlich, können PPIs weiterhin in stark und schwach transient unterteilt werden. Schwach transiente PPIs weisen eine Dissoziationskonstante (K_D) im mikromolaren Bereich auf und haben eine Lebensdauer in der Größenordnung von Sekunden. Starke transiente PPIs hingegen grenzen sich durch eine längere Lebenszeit und einen K_D -Wert im nanomolaren Bereich von den schwach transienten ab (Perkins *et al.*, 2010).

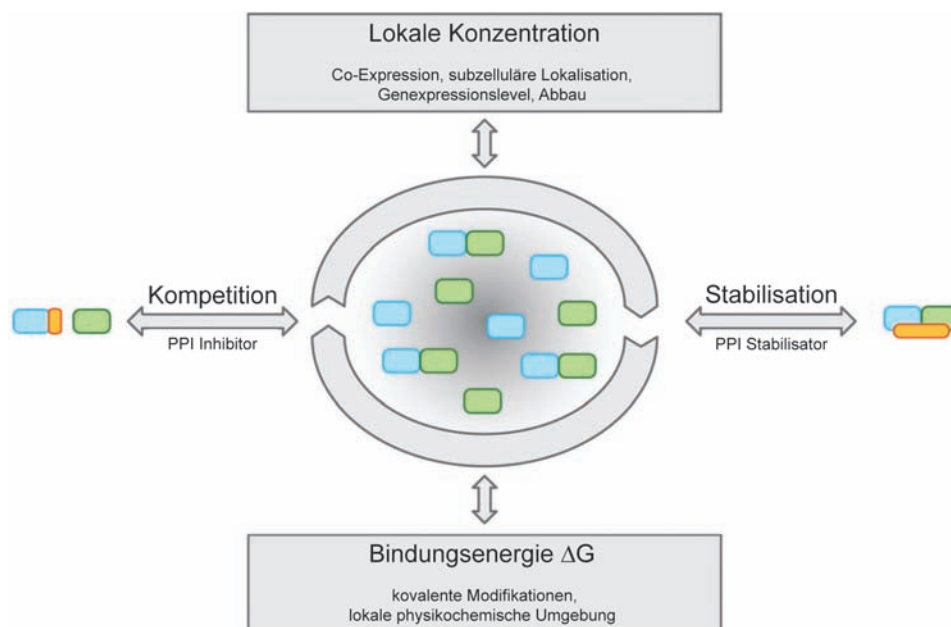


Abbildung 1.2: Regulationsmechanismen von transienten PPIs. Abbildung modifiziert nach Thiel *et al.* (2012).

Transiente PPIs werden entweder durch Veränderung der lokalen Konzentration oder durch Veränderung der physikochemischen und geometrischen Eigenschaften der Kontaktflächen reguliert (siehe Abbildung 1.2 und Nooren und Thornton (2003a)). Die lokale Konzentration von zwei Proteinen hängt zum Beispiel von einer Co-Expression beziehungsweise von dem Genexpressionslevel ab. Zudem ist die subzelluläre Lokalisation der Proteine für die lokale Konzentration von Bedeutung. Auch Diffusion und Transportmechanismen in der Zelle spielen hierfür eine wichtige Rolle. Außerdem hängt die lokale

Proteinkonzentration von der Lebensdauer eines Proteins, von der Synthese bis zum Abbau, ab. Weiterhin kann die Anwesenheit von Effektormolekülen die Affinität zweier Proteine zueinander beeinflussen. Zu den weiteren physikochemischen Faktoren, die transiente PPIs beeinflussen, zählen neben den Konzentrationen von Ionen, Chemikalien oder Proteinen auch Änderungen des pH-Werts und der Temperatur sowie posttranslationale, kovalente Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierungen (Nooren und Thornton, 2003a).

Generell zeichnen sich PPIs, die durch lokale Konzentration reguliert werden, wie zum Beispiel Rezeptor-Ligand- oder Antikörper-Antigen-Komplexe durch eine hohe Affinität aus. Physikochemisch regulierte PPIs hingegen, wie zum Beispiel die Anordnung der $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ Untereinheiten zu einem heterotrimeren G-Protein in Abhängigkeit des GTP/GDP-Austauschs, weisen je nach Zustand bis zu 1000-fach unterschiedliche Protomer-Affinitäten zueinander auf.

1.2. Modulation von transienten Protein-Protein-Wechselwirkungen

Wie Abbildung 1.2 zeigt, lässt sich das Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation von PPIs auch durch Konkurrenz oder Stabilisation beeinflussen. Auf dieser Tatsache beruht die Idee, PPIs mit Kleinmolekülen pharmakologisch zu modulieren.

1.2.1. Inhibition

Inhibitoren von transienten PPIs nutzen meist das Prinzip der kompetitiven Verdrängung, wobei in Einzelfällen auch allosterische Inhibitoren identifiziert wurden (Arkin und Wells, 2004). Diese beeinflussen die Konformation eines Protomers und stören dadurch bekannte PPIs. Die meisten in der Literatur beschriebenen Inhibitoren wurden durch systematische Ansätze wie zum Beispiel fragmentbasierte Wirkstoffsuche (englisch: *fragment based drug discovery*, FBDD), hochdurchsatzbasierte Wirkstoffsuche (englisch: *high-throughput screening*, HTS) oder virtuelle Wirkstoffsuche (englisch: *virtual screening*, VS) gefunden. Sie weisen meist einen K_D oder eine effektive inhibitorische Konzentration (IC_{50}) im niedrigen nanomolaren bis submikromolaren Bereich auf (Arkin und Wells, 2004; Wells und McClendon, 2007). Viele dieser Inhibitoren binden an *Hot Spots*, die durch *Alanin-Scanning* identifiziert wurden (siehe 1.1.2 und Thanos *et al.* (2003)). Die pharmakologische Wirkung dieser Inhibitoren ist divers und reicht von Immunsuppressiva und Entzündungshemmern über Krebsmedikamente bis hin zu antiviralen und antibakteriellen Wirkstoffen (Braisted *et al.*, 2003; White *et al.*, 2003;

Vassilev *et al.*, 2004; Grasberger *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Oltersdorf *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2006; Christ *et al.*, 2010).

1.2.2. Stabilisation

Im Gegensatz zu den Inhibitoren transienter PPIs sind die wenigen identifizierten Stabilisatoren hauptsächlich Naturstoffe. Ein systematischer Ansatz der Wirkstoffsuche wie für die Inhibitoren konnte erst in einem Fall erfolgreich durchgeführt werden (Rose *et al.*, 2010). Zu den bekanntesten Stabilisatoren zählen Forskolin und Brefeldin A, die sich als biologische *Tool Compounds* (englisch: *tool* = Werkzeug, *compound* = Substanz) bewährt haben (Seamon *et al.*, 1981; Peyroche *et al.*, 1999). Einige PPI-Stabilisatoren werden als Immunsuppressiva oder Krebsmedikamente in der Medizin eingesetzt: Rapamycin, Cyclosporin, FK-506 und Paclitaxelderivate (Vézina *et al.*, 1975; Dreyfuss *et al.*, 1976; Kino *et al.*, 1987; Wani *et al.*, 1971). Vor kurzem wurde zudem ein Gibberellin-abhängiges System zur chemisch induzierten Dimerisierung vorgestellt (Miyamoto *et al.*, 2012). Die beiden Phytohormone Auxin und Jasmonsäure wirken als Stabilisatoren transienter PPIs in der pflanzlichen Signaltransduktion (Tan *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010). Kürzlich konnte D-myo-Inositol-1,3,4,5-tetrakis-Phosphat eine PPI-stabilisierende Wirkung in der Chromatinregulation in humanen Zellen nachgewiesen werden (Watson *et al.*, 2012). Zusammen mit Auxin und Jasmonsäure stellt es das einzige Beispiel für ein Stoffwechselprodukt dar, das in demselben Organismus als Stabilisator wirkt, in dem es auch produziert wird. Außerdem konnte anhand von zwei Beispielen die Stabilisation von Proteinmooligomeren durch Kleinmoleküle gezeigt werden (Miroy *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 2005).

Die 14-3-3-PPI-Stabilisatoren Fusicoccin A, Epibestatin und Pyrrolidon 1 haben herbizide Wirkungen (Ballio *et al.*, 1964; Rose *et al.*, 2010). Bei dem Pflanzentoxin Fusicoccin A (FCA) handelt es sich um ein Diterpenglykosid, das ein Stoffwechselprodukt aus *P. amygdali* ist (siehe Abbildung 1.3D und Ballio *et al.* (1964)). Die physiologische Wirkung wird durch die Stabilisierung des Komplexes aus einem 14-3-3-Protein und dem phosphorylierten C-Terminus der Plasmamembran-H⁺-ATPase 2 (PMA2) vermittelt. Die Stabilisierung des Komplexes führt zu einer dauerhaften Aktivierung der PMA2, was ein Öffnen der Stomata und somit das Austrocknen der Pflanze bewirkt (Oecking *et al.*, 1994; Würtele *et al.*, 2003). FCA ist in der Lage, *in vitro* die Affinität eines kurzen Phosphopeptids, das die C-terminale Sequenz der PMA2 darstellt, an das 14-3-3-Protein um das 90-fache von 2,5 μM auf 27 nM zu erhöhen. Die Affinität von FCA an den Komplex beträgt 700 nM, an das 14-3-3-Protein selbst hingegen nur 66 μM und in Bezug auf

das Peptid ist sie nicht messbar. FCA ist außerdem in der Lage *in vitro* einen Komplex aus 14-3-3-Protein und PMA2 zu stabilisieren, der nicht phosphoryliert ist, sondern eine Phosphomimikry-Mutation (in diesem Fall Aspartat) trägt. Abbildung 1.3A-C zeigt den ternären Komplex aus 14-3-3-Protein, dem C-Terminus der PMA2 und FCA. Das FCA-Molekül besetzt in diesem Komplex eine Bindegroove, die durch die PMA2 und das 14-3-3-Protein gebildet wird. Es kontaktiert mit seinem 5-8-5-Ringsystem (in Abbildung 1.3D mit „A, B, C“ bezeichnet) sowohl das 14-3-3-Protein als auch die PMA2, während die Zuckergruppe lösungsmittel exponiert ist.

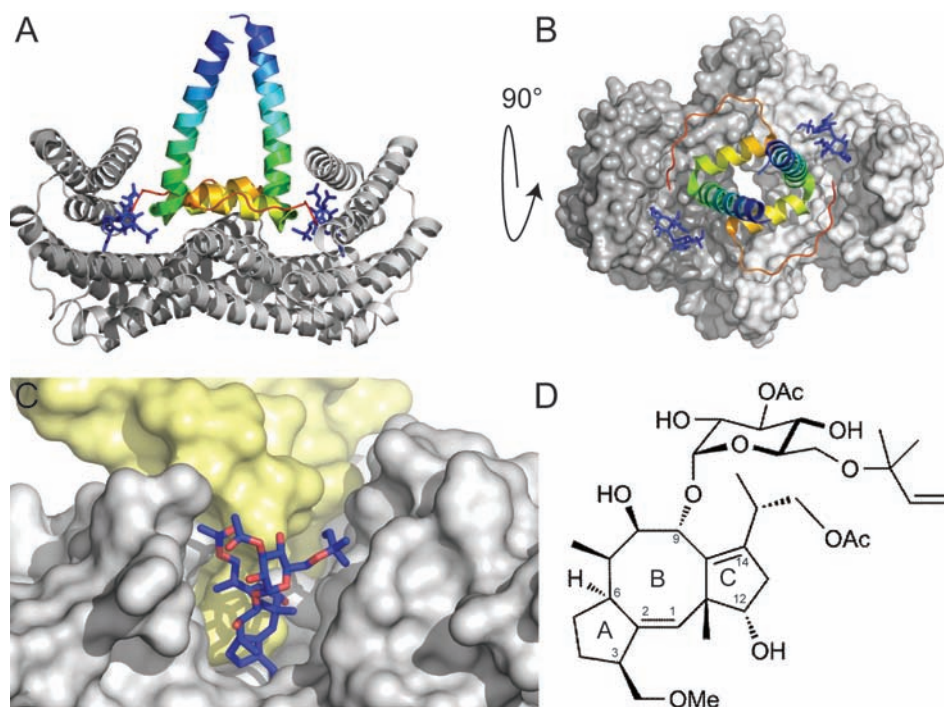


Abbildung 1.3: Strukturmodell des ternären Komplexes aus 14-3-3-Protein, dem C-Terminus der PMA2 und FCA (PDB ID: 2098). (A) Das 14-3-3-Protein ist als Bändermodell mit einem Monomer in hellgrau und einem in dunkelgrau gezeigt. Der C-Terminus der PMA2 ist mit einem Spektrum von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) als Bändermodell eingefärbt. FCA ist als Stäbchenmodell in blau dargestellt. (B) Der Komplex aus (A) ist um 90° gedreht und mit der gleichen Farbgebung wie in (A) dargestellt. Das 14-3-3-Protein ist als Oberflächendarstellung gezeigt. (C) Detaillierter Blick auf die Bindegroove zeigt FCA in der gleichen Darstellung wie in (B); die PMA2 ist hier gelb gefärbt. (D) Die chemische Strukturformel von FCA zeigt das 5-8-5-Ringsystem, das mit „A, B, C“ bezeichnet ist, mit seinen Substituenten.

Die Motivation systematisch nach chemisch einfach zugänglichen Substanzen zu suchen, die eine ähnliche Wirkung wie FCA aufweisen, lag in der Tatsache begründet, dass FCA als komplexer Naturstoff in größeren Mengen nur schwer verfügbar ist und eine

industrielle Anwendung als Herbizid somit zu kostenintensiv wäre. Mittels HTS konnten aus einer Substanzbibliothek mit etwa 37.000 Molekülen zwei Substanzen identifiziert werden (Epibestatin und Pyrrolidon 1), die wie FCA den 14-3-3/PMA2-Komplex stabilisieren, strukturell aber nicht mit diesem verwandt sind (Rose *et al.*, 2010).

1.3. 14-3-3-Proteine

1.3.1. Entdeckung und Namensgebung

Ursprünglich wurden 14-3-3-Proteine in einer systematischen Untersuchung von sauren, löslichen Rinderhirn-Proteinen identifiziert und benannt (Moore und Perez, 1967). Ihr Name setzt sich aus der Fraktionsnummer (14) nach der Diethylaminoethyl-(DEAE)-Cellulose-Affinitätschromatographie und den Koordinaten ihrer Migration in einer 2D-Stärke-Gelelektrophorese (3-3) zusammen.

1.3.2. Vorkommen und Sequenzhomologie

14-3-3-Proteine werden in eukaryotischen Organismen ubiquitär exprimiert (Aitken *et al.*, 1992). Jedoch kommen in verschiedenen Organismen unterschiedlich viele Isoformen vor. So konnten zum Beispiel in *A.thaliana* 12, in *S.cerevisiae* 2 und in *X.laevis* ebenfalls 2 unterschiedliche Isoformen identifiziert werden (Rosenquist *et al.*, 2001). In *H.sapiens* wurden 7 unterschiedliche Isoformen identifiziert, die mit griechischen Buchstaben bezeichnet werden: beta (β) beziehungsweise alpha (α), epsilon (ϵ), gamma (γ), eta (η), sigma (σ), tau (τ) beziehungsweise theta (θ) und zeta (ζ) beziehungsweise delta (δ). Dabei ist θ eine alternative Bezeichnung für τ . Dagegen stellen α und δ die phosphorylierten Varianten von β und ζ dar. Die 14-3-3-Isoformen weisen eine hohe Sequenzhomologie sowohl untereinander als auch artübergreifend auf (siehe Abbildung 1.4).

Die humanen 14-3-3-Isoformen werden in allen Geweben und Zelltypen exprimiert, wobei für einzelne Isoformen unterschiedliche Expressionsmuster gefunden wurden. So werden die Isoformen β , ϵ , γ , η und ζ hauptsächlich im Gehirn exprimiert, während die Isoformen τ und σ jeweils auch in T-Zellen und Epithelzellen exprimiert werden. Die τ -Isoform wurde zudem auch in vielen anderen Geweben, unter anderem im Gehirn, gefunden (Aitken, 2006). Die Bedeutung der 14-3-3-Proteine konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, in denen einzelne oder alle 14-3-3-Isoformen deletiert wurden (Dhar *et al.*, 2000; Gelperin *et al.*, 2002). So führt zum Beispiel die Deletion der humanen 14-3-3-Isoform σ zu einem Verlust der Telomerfunktion in der kolorektalen Krebszelllinie

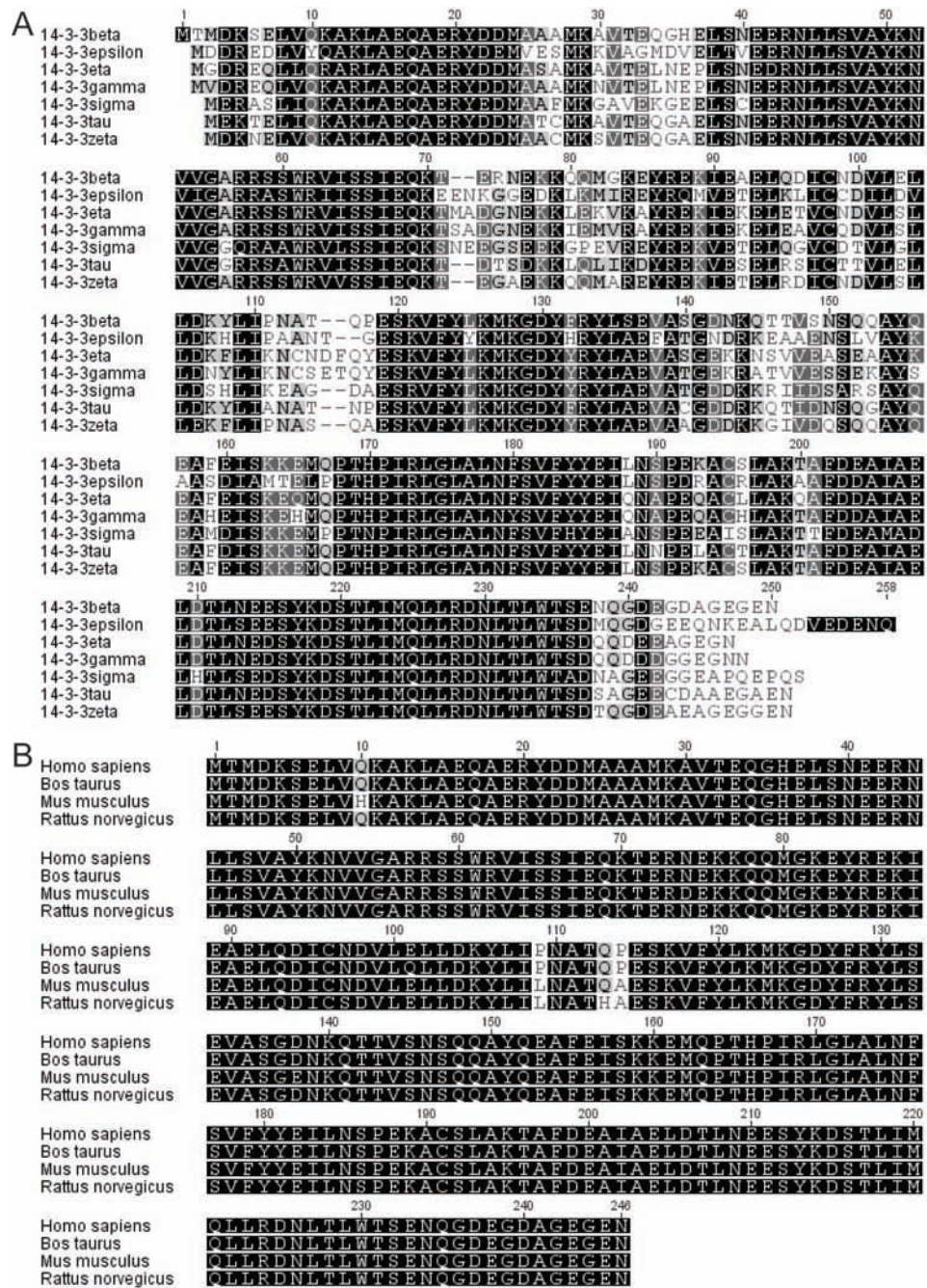


Abbildung 1.4: Sequenzvergleich von 14-3-3-Proteinen. (A) Sequenzvergleich der humanen Isoformen β , ϵ , γ , η , σ , τ und ζ . Die Homologie beträgt 70,4%. (B) Sequenzvergleich von Säuger-14-3-3-Proteinen. Verglichen wurde die 14-3-3 β -Isoform aus dem Menschen (*H.sapiens*), dem Rind (*B.taurus*), der Maus (*M.musculus*) und der Ratte (*R.norvegicus*). Die Sequenzhomologie beträgt 98,2%. Schwarz = 100% Homologie; dunkelgrau = 80-100% Homologie; hellgrau = 60-80% Homologie; weiß = weniger als 60% Homologie. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software *Geneious Pro 4.8.3* (Biomatters, Neuseeland) unter Verwendung der Matrix *Blosum62* erstellt.

HCT116 (Dhar *et al.*, 2000), während die Deletion aller 14-3-3-Isoformen in *S. cerevisiae* lethal ist (Gelperin *et al.*, 1995; van Heusden *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1997).

1.3.3. Struktur und Funktion

Als erstes konnten die dreidimensionalen (3D) Strukturen der 14-3-3-Isoformen ζ (aus *B. taurus*) und τ (aus *H. sapiens*) von zwei verschiedenen Gruppen mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden (Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995). Inzwischen sind die Strukturen aller humanen 14-3-3-Isoformen bekannt. Bis heute wurden zudem die 3D-Strukturen verschiedener 14-3-3-Isoformen aus anderen eukaryotischen Organismen wie zum Beispiel *B. taurus*, *N. tabacum* oder *N. plumbaginifolia* bestimmt. Sie alle weisen eine ähnliche Struktur auf, wie sie in Abbildung 1.5 am Beispiel der humanen Isoform ζ gezeigt ist.

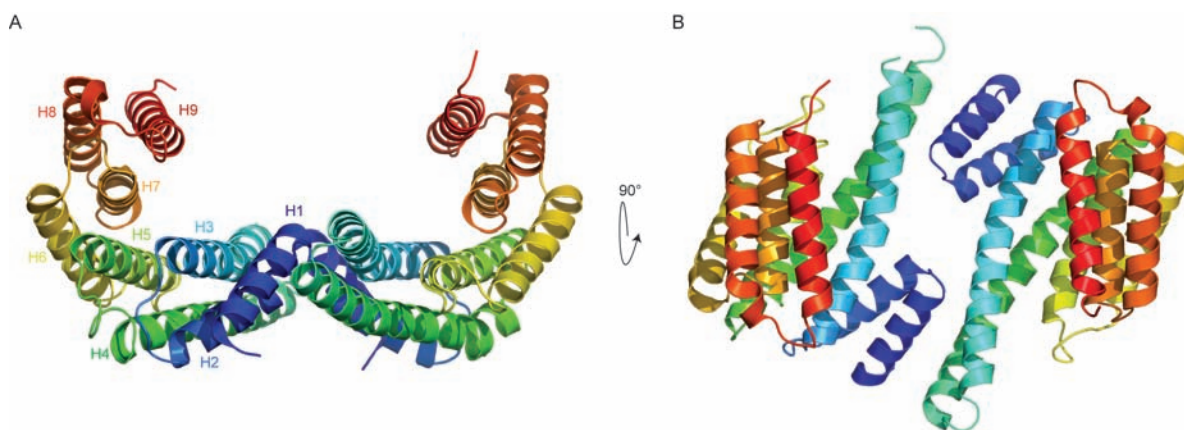
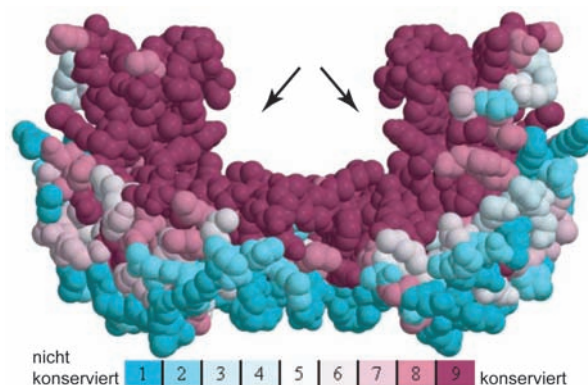


Abbildung 1.5: Strukturmodell der humanen 14-3-3-Isoform ζ (PDB ID: 1QJB). (A) Das 14-3-3-Protein ist als Bändermodell dargestellt. Die neun antiparallelen α -Helices (H1-H9) eines Monomers sind mit einem Spektrum von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) gefärbt. (B) Dreht man das Modell um 90° nach vorne, so sieht man, dass die beiden Monomere über die N-terminalen α -Helices H1 bis H4 dimerisieren.

Die etwa 30 kDa großen 14-3-3-Proteine liegen physiologisch als Dimer vor (Jones *et al.*, 1995). Das Dimer weist eine W-förmige Struktur auf und jedes Monomer besteht aus 9 antiparallelen α -Helices. Die Dimerisierung wird durch Phosphorylierung negativ beeinflusst (Woodcock *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2006). Des Weiteren können 14-3-3-Proteine Homo- und Heterodimere bilden (Jones *et al.*, 1995; Chaudhri *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006). Dabei gibt es jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen. Während 14-3-3 σ keine Heterodimere bildet (Jones *et al.*, 1995; Chaudhri *et al.*, 2003; Wilker *et al.*, 2005), können die Isoformen β , ϵ , γ , η und τ Heterodimere bilden, wobei ϵ hauptsächlich Hetero- und kaum Homodimere bildet (Chaudhri *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006).

Abbildung 1.6: Strukturelle Homologie von 14-3-3-Proteinen. Verschiedene 14-3-3-Isoformen wurden über einen Sequenzvergleich auf ihre Homologie hin untersucht und die Ergebnisse auf die 3D-Struktur der humanen 14-3-3 ζ -Isoform übertragen (PDB ID: 1QJB). Das 14-3-3-Dimer ist in einer Kugeldarstellung für die einzelnen AS abgebildet. Die Pfeile zeigen auf die amphipathische Grube, die den am höchsten konservierten Bereich darstellt. Abbildung modifiziert nach Bridges und Moorhead (2005).



Ein Sequenzvergleich der 14-3-3-Proteine aus *H.sapiens* (7 Isoformen), *A.thaliana* (12 Isoformen), *S.cerevisiae* (2 Isoformen), *D.melanogaster* (2 Isoformen) und *C.elegans* (2 Isoformen) mit der Software *ClustalX* (Jeanmougin *et al.*, 1998) und eine Übertragung der erhaltenen Homologie-Werte auf die 3D-Struktur des humanen 14-3-3 ζ -Proteins (PDB ID: 1QJB) mit der Software *ConSurf* (Glaser *et al.*, 2003) konnte zeigen, dass die konservierten AS nicht zufällig auf der Oberfläche des Proteins verteilt sind (siehe Abbildung 1.6 und Bridges und Moorhead (2005)). Stattdessen weist die Struktur sowohl sehr hoch konservierte Bereiche als auch fast gar nicht konservierte Bereiche auf. Die nicht konservierten Bereiche befinden sich hauptsächlich auf der Außenseite der W-förmigen Proteinstruktur. Im Gegensatz dazu ist der Bereich auf der Innenseite hoch konserviert. Dieser Bereich ist für die Bindung von Interaktionspartnern verantwortlich und wird pro Monomer aus den α -Helices 3, 5, 7 und 9 zusammengesetzt (siehe Abbildung 1.5). Diese Helices bilden eine amphipathische Bindegrobe.

Die Bindung eines Interaktionspartners erfolgt in der Regel über ein phosphoryliertes Serin oder Threonin, das sich in einem ungeordneten Bereich des interagierenden Proteins befindet (Muslin *et al.*, 1996). Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter können aufgrund ihrer Größe nicht in der amphipathischen Bindegrobe koordiniert werden. Die zu K49, R56, R127 und Y128 des humanen 14-3-3 ζ -Proteins äquivalenten AS koordinieren die Phosphatgruppe des phosphorylierten Interaktionspartners. Sie sind in allen 14-3-3-Proteinen zu 100 % konserviert. Die Koordination des Phosphatrests erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Kontakte im Peptidrückgrat vermitteln die weitere Orientierung der Aminosäurekette des Interaktionspartners.

Bisher konnten drei verschiedene phosphorylierungsabhängige 14-3-3-Bindemotive in 14-3-3-Interaktionspartnern identifiziert werden. Diese werden als *mode* I-III bezeichnet (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; Ganguly *et al.*, 2005) und sind in Tabelle 1

Bezeichnung	Sequenz
<i>mode I</i>	R - S - [+ / Ar] - pS/pT - [L/E/A/M] - P
<i>mode II</i>	R - X - [Ar] - [+] - pS/pT - [L/E/A/M] - P
<i>mode III</i>	- pS/pT - X ₁₋₂ - CO ₂ H

Tabelle 1: Übersicht der phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Bindemotive *mode I-III*. Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt, wobei X jede AS sein kann und pS/pT ein phosphoryliertes Serin beziehungsweise Threonin bezeichnet. Basische AS sind mit [+] und Aromatische mit [Ar] abgekürzt. Im Fall der *mode III*-Sequenz darf X kein Prolin sein und CO₂H bezeichnet den C-Terminus.

zusammengefasst. Zudem konnten die aus einer Peptidbibliothek gefundenen „optimalen“ *mode I-* und *II*-Bindesequenzen (Yaffe *et al.*, 1997) strukturell auf ihre Bindung an 14-3-3-Proteine untersucht werden (Rittinger *et al.*, 1999). Auch zur Bindung von *mode III*-Bindesequenzen sind strukturelle Untersuchungen veröffentlicht (Würtele *et al.*, 2003).

Abbildung 1.7 zeigt den strukturellen Vergleich der Bindung der drei Bindemotive an 14-3-3-Proteine. Bei den *mode I-* und *II*-Bindesequenzen sorgt ein Prolin an der +2-Position bezogen auf die phosphorylierte AS für ein Abknicken des Peptidrückgrats. Dadurch werden die folgenden C-terminalen AS so orientiert, dass sie die 14-3-3-Bindegrube wieder verlassen. Bei dem *mode I*-Bindemotiv liegt das Prolin dabei in einer *cis*-Konformation vor (siehe Abbildung 1.7A). Das führt dazu, dass die C-terminalen AS in Richtung der phosphorylierten AS orientiert sind. Bei dem *mode II*-Bindemotiv ist das Prolin hingegen in *trans* orientiert (siehe Abbildung 1.7B). Dabei sorgt der dadurch entstehende Knick im Peptidrückgrat für eine Orientierung der C-terminalen AS zum Dimerisierungsbereich des 14-3-3-Dimers hin. Bei dem *mode III*-Bindemotiv endet die Aminosäurekette 1-2 AS nach der phosphorylierten AS (siehe Abbildung 1.7C). Dadurch entsteht eine Bindegrube, die zum Beispiel wie im Fall des pflanzlichen 14-3-3-Proteins und der PMA2 von einem stabilisierenden Molekül wie FCA eingenommen werden kann (siehe Abbildung 1.3).

Wie die weiteren C-terminalen AS verlaufen, konnte bis heute nicht geklärt werden. Strukturelle Daten über Komplexe aus 14-3-3-Proteinen und Domänen oder nahezu Voll-längenproteinen sind lediglich über die bereits erwähnte Wechselwirkung von 14-3-3 mit der PMA2 (siehe Abbildung 1.3) und die Wechselwirkung von 14-3-3 mit der Serotonin-N-Acetyltransferase (AANAT) (Ottmann *et al.*, 2007a; Obsil *et al.*, 2001) verfügbar. Des Weiteren konnte in vielen Proteinen mehr als ein 14-3-3-Bindemotiv identifiziert werden. Diese Bindestellen wirken oft synergistisch und erhöhen die Affinität der In-

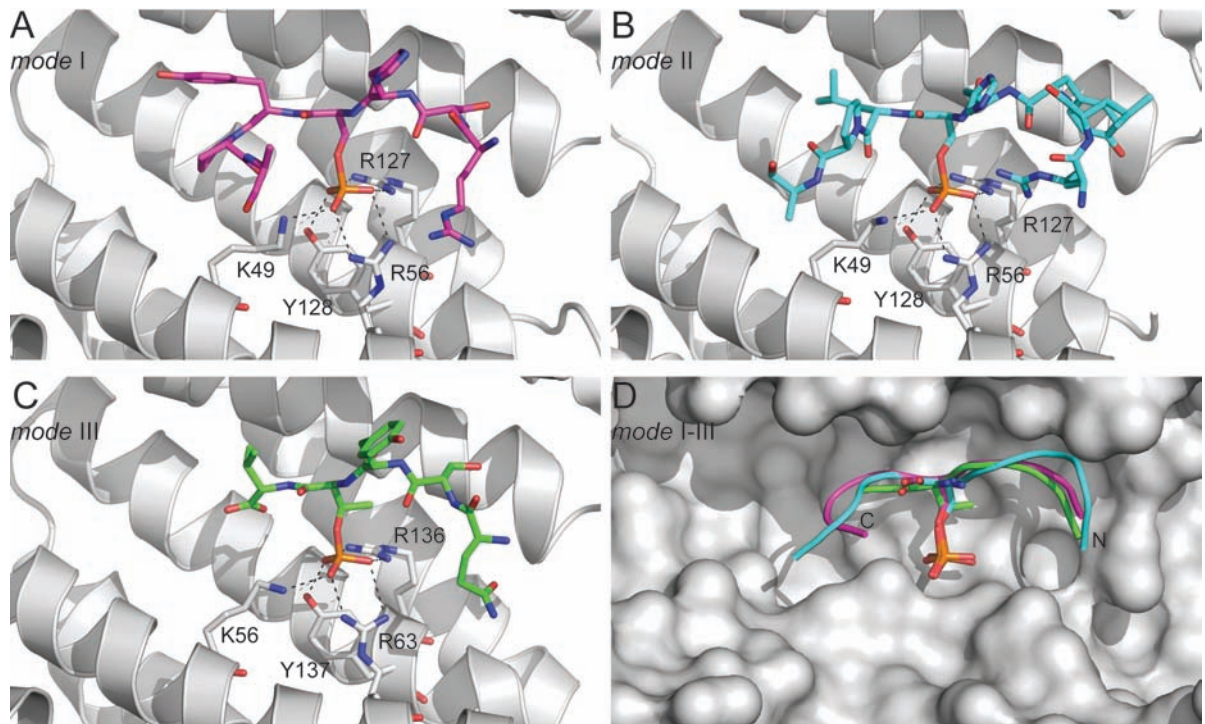


Abbildung 1.7: Vergleich der 14-3-3-Bindemotive *mode* I-III. (A) Das Konsensus-*mode* I-Bindemotiv an humanes 14-3-3 ζ gebunden. Das 14-3-3-Protein ist als Bändermodell in hellgrau und das *mode* I-Peptid als Stäbchenmodell in magenta gezeigt. Die für die Koordination des Phosphatrests (orange) wichtigen AS sind im Einbuchstabencode hervorgehoben und die Wasserstoffbrückenbindungen als schwarz gestrichelte Linie angedeutet (PDB ID: 1QJB). (B) Das Konsensus-*mode* II-Bindemotiv an humanes 14-3-3 ζ gebunden. Die Darstellung entspricht der in (A), nur das *mode* II-Peptid ist türkis gefärbt. (PDB ID: 1QJA). (C) *mode* III-Bindemotiv der PMA2 an 14-3-3C aus *N.tabacum* gebunden. Die Darstellung ist wie in (A), aber das *mode* III-Peptid ist grün gefärbt. (PDB ID: 1O9D). (D) Überlagerung der *mode* I-III 14-3-3-Bindemotive aus (A)-(C) auf die humane 14-3-3 ζ -Isoform (Oberflächendarstellung). Die Phosphopeptide sind als Linie dargestellt, der Phosphatrest ist hervorgehoben und die N- und C-Termini sind markiert.

teraktionspartner zum 14-3-3-Protein im Vergleich zu den einzelnen Bindestellen (Yaffe *et al.*, 1997; Obsil *et al.*, 2003; Kostelecky *et al.*, 2009). Die Kristallstruktur des zweifach phosphorylierten Peptids aus der Proteinkinase C Isoform ϵ (PKC ϵ), das mit seinen zwei unterschiedlichen Bindestellen an das 14-3-3-Protein bindet, konnte zudem gelöst werden (Kostelecky *et al.*, 2009). Jedoch sind die AS, die die beiden Bindestellen miteinander verbinden und Aufschluss über den C-terminalen Verlauf der AS nach der N-terminalen Bindestelle geben könnten, vermutlich aufgrund von hoher Flexibilität in diesem Bereich der Struktur nicht sichtbar.

Die Tatsache, dass ein Interaktionspartner über zwei 14-3-3-Bindestellen an ein 14-3-3-Dimer binden kann, führte zu der Hypothese der *gatekeeper* (englisch: Schrankenwärter)-Phosphorylierung (Yaffe, 2002). Diese Hypothese besagt, dass zwei unterschiedlich star-

ke 14-3-3-Bindestellen eines Interaktionspartners die Wechselwirkung mit dem 14-3-3-Dimer regulieren. Durch die Phosphorylierung der starken Bindestelle (*gatekeeper*-Phosphorylierung) findet eine Wechselwirkung statt, die durch eine schwache Bindestelle verstärkt wird. Ist die starke Bindestelle jedoch nicht phosphoryliert, reicht die schwache Bindestelle nicht aus, um eine Wechselwirkung mit dem 14-3-3-Protein zu vermitteln.

Auf der Suche nach phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Bindemotiven in den Aminosäuresequenzen von Interaktionspartnern ist weiterhin zu beachten, dass in einer Zelle auch eine entsprechende Kinase vorhanden sein muss, die das Protein an dem 14-3-3-Bindemotiv phosphoryliert. Es ist nicht für jeden einzelnen Interaktionspartner bekannt, welche Kinase für die Phosphorylierung sorgt, aber es konnten die folgenden allgemeinen Regeln aufgestellt werden (Johnson *et al.*, 2010): (i) Prolinabhängige Kinasen können 14-3-3-Bindemotive nicht phosphorylieren, wohl aber die 14-3-3-Proteine an sich (Han *et al.*, 2008). (ii) Eine Phosphorylierung der 14-3-3-Bindemotive durch Proteinkinasen der Casein Kinase II-Familie kann ausgeschlossen werden (Salvi *et al.*, 2009). (iii) Am wahrscheinlichsten erscheint es, dass für die Phosphorylierung von 14-3-3-Bindemotiven basophile Kinasen der AGC (Proteinkinase A, G oder C)-Familie und Kinasen der CaMK (Ca^{2+} -calmodulinabhängige Proteinkinase)-Familie zuständig sind (Linding *et al.*, 2008; Manning *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010).

Zwar ist die Mehrzahl der beschriebenen 14-3-3-Wechselwirkungen phosphorylierungsabhängig (Pozuelo Rubio *et al.*, 2004), dennoch sind auch einige phosphorylierungsunabhängige 14-3-3-Wechselwirkungen bekannt. Dazu zählt zum Beispiel das durch *phage display* identifizierte R18-Peptid, das an der gleichen Stelle an 14-3-3-Proteine bindet wie phosphorylierte Bindemotive und mit diesen konkurrieren kann (Petosa *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Auch die Wechselwirkung von humanem 14-3-3 γ mit der intrazellulären Domäne (AICD) des *amyloid precursor protein* (APP) ist phosphorylierungsunabhängig (Sumioka *et al.*, 2005). In Pflanzen interagiert das rolB-Protein aus *A. rhizogenes* vermutlich phosphorylierungsunabhängig mit 14-3-3-Proteinen (Moriuchi *et al.*, 2004). Am umfassendsten ist die phosphorylierungsunabhängige Wechselwirkung des Exoenzyme S (ExoS) aus *P. aeruginosa* (Fu *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1999; Ottmann *et al.*, 2007b) mit humanem 14-3-3 ζ charakterisiert. Die strukturelle Untersuchung konnte die Vermutung bestätigen, dass die 14-3-3/ExoS-Wechselwirkung ebenfalls über die amphipathische Bindegroove vermittelt wird (siehe Abbildung 1.8 und Masters *et al.* (1999); Ottmann *et al.* (2007b)).

Obwohl die Bindung über die amphipathische Bindegroove stattfindet, die aus den Helices 3, 5, 7 und 9 des 14-3-3-Proteins gebildet wird, sind doch gänzlich andere AS an der

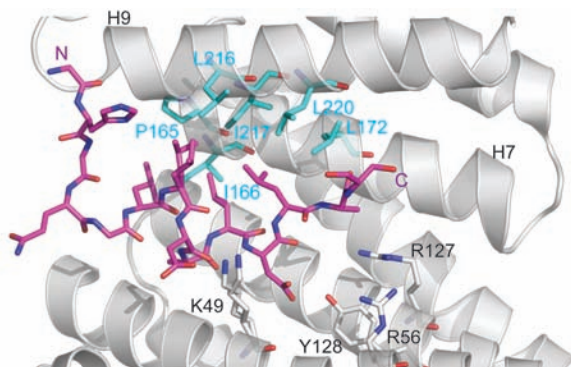


Abbildung 1.8: Komplex aus 14-3-3 ζ und ExoS-Peptid. Blick auf die amphipathische Bindegroove des 14-3-3 ζ (graues Bändermodell, Helices 7 (H7) und 9 (H9) markiert). Das ExoS-Peptid ist in magenta als Stäbchenmodell abgebildet (N- und C-Terminus markiert). Die an der Wechselwirkung beteiligten hydrophoben AS des 14-3-3 ζ (H7,H9) sind als türkise Stäbchenmodelle dargestellt. Die konservierten Reste sind als graues Stäbchenmodell mit schwarzer Schrift gezeigt (PDB ID: 2O02).

Wechselwirkung beteiligt als bei den phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Bindemotiven. Statt der konservierten Reste K49, R56, R127 und Y128 der Helices 3 und 5 (siehe Abbildung 1.7) sind hier hauptsächlich hydrophobe AS der Helices 7 und 9 des 14-3-3-Proteins beteiligt. Zudem verläuft das ExoS-Peptid in der Bindegroove entgegengesetzt zu den phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Bindemotiven.

1.3.4. Physiologische Bedeutung

Da den 14-3-3-Proteinen keine endogene enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass sie ihre physiologische Funktion über die Bindung der Interaktionspartner ausüben (siehe Abbildung 1.9 und Fu *et al.* (2000); Bridges und Moorhead (2005); Mrowiec und Schwappach (2006); Shikano *et al.* (2006)). Die Bindung eines Interaktionspartners an ein 14-3-3-Protein kann zum Beispiel eine Konformationsänderung in diesem bewirken (siehe Abbildung 1.9A). So führt beispielsweise die Bindung von AANAT an 14-3-3-Proteine zu einer Konformationsänderung und einer um 60 % erhöhten Enzymaktivität (Obsil *et al.*, 2001). Diese Tatsache führte zu der *molecular anvil* (englisch: molekularer Amboss)-Hypothese (Yaffe, 2002). Sie besagt, dass das 14-3-3-Protein sich wie ein Amboss verhält und seine Interaktionspartner bei einer Wechselwirkung in eine andere Konformation zwingt, während es selbst fast unverändert bleibt. Außerdem kann die Bindung eines Interaktionspartners an ein 14-3-3-Protein weitere Bindungspartner oder bestimmte Sequenzen abschirmen (siehe Abbildung 1.9B). Dabei kann es sich zum Beispiel um das aktive Zentrum oder die Ligandenbindestelle eines Enzyms oder Lokalisationssequenzen wie zum Beispiel eine nukleare Export- oder Importsequenz (NES, NLS) handeln. Diese Abschirmung hat Einfluss auf die Regulation oder Lokalisation des Interaktionspartners. Auch das 14-3-3-Protein besitzt am C-Terminus eine NES. Die Bindung von Interaktionspart-

nen über die amphipathische Grube hat daher auch Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des 14-3-3-Proteins beziehungsweise des Komplexes (Rittinger *et al.*, 1999). Außerdem ist es möglich, dass aufgrund der dimeren Struktur des 14-3-3-Proteins zwei unterschiedliche Proteine an das 14-3-3-Protein binden und so eine Wechselwirkung der gebundenen Proteine miteinander induziert wird (siehe Abbildung 1.9C).

14-3-3-Proteine sind an fast allen entscheidenden physiologischen Prozessen in der Zelle direkt oder indirekt beteiligt. So haben sie zum Beispiel Einfluss auf die Transkription, die Proteinbiosynthese, den Primärstoffwechsel, den Zellzyklus, die Signaltransduktion, die Organisation des Cytoskeletts und den gerichteten Transport in der Zelle (Dougherty und Morrison, 2004; Jin *et al.*, 2004; Kjarland *et al.*, 2006; Shikano *et al.*, 2006).

Bisher konnten über 200 Interaktionspartner von 14-3-3-Proteinen nachgewiesen werden (Sun *et al.*, 2009). Dazu gehören zusätzlich zu den bereits genannten Proteinen beispielsweise die Proteinkinasen C-RAF und PKC, die Zellzyklus-Phosphatase Cdc25C, das Apoptose-regulierende Protein BAD, die Histonacetylasen H 4, 5 und 7 sowie das Tumorsuppressorprotein p53 (Einzelnachweise in van Hemert *et al.* (2001); Aitken *et al.* (2002)). Die Wechselwirkungen von 14-3-3-Proteinen mit MLF1 und C-RAF werden im Folgenden näher beschrieben.

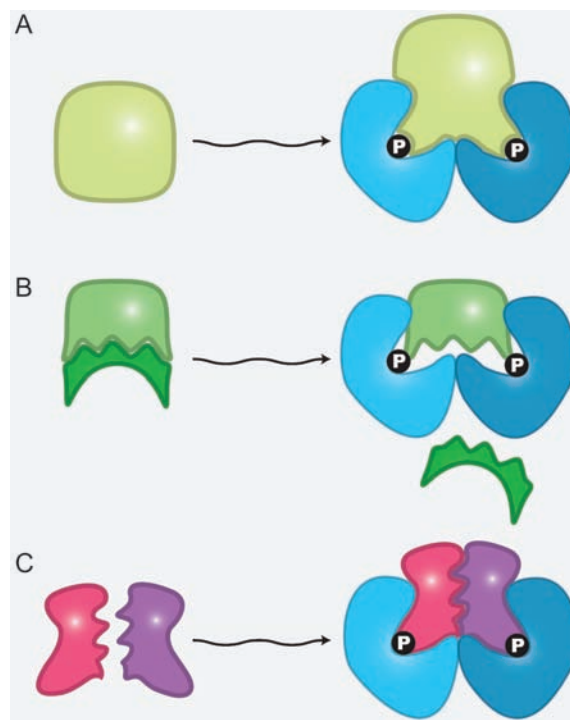


Abbildung 1.9: Einfluss der 14-3-3-Wechselwirkung auf den Interaktionspartner. Das 14-3-3-Protein ist als Dimer in blau dargestellt und die Interaktionspartner in hellgrün, grün, rot und lila. Die Phosphorylierung der Interaktionspartner ist durch ein „P“ gekennzeichnet. Abbildung aus Bridges und Moorhead (2005).

1.4. Die 14-3-3/MLF1-Wechselwirkung

1.4.1. Der myeloide Leukämiefaktor 1 (MLF1)

Der myeloide Leukämiefaktor 1 (MLF1) ist ein etwa 30 kDa großes, basisches Protein (pI ~ 9,5), das ursprünglich in leukämischen Erkrankungen wie Akuter Myeloischer Leukämie

(AML) und dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) als Translokation des MLF1-Gens auf Chromosom 3 und des Nucleophosmin-Gens (NPM) auf Chromosom 5 identifiziert wurde. Diese Translokation führt zur Synthese des Onkogens NPM-MLF1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1996), welches aus den 175 N-terminalen AS von insgesamt 294 AS des NPM-Proteins und dem fast vollständigen MLF1-Protein (AS 17-268) besteht.

Bereits diese erste Untersuchung zeigte, dass das NPM-MLF1 Onkogen eine andere subzelluläre Lokalisation aufweist als das Wildtyp (WT) MLF1-Protein. Während das heterolog exprimierte WT-MLF1 in Cos-7-Zellen überwiegend im Cytoplasma (CP) lokalisiert ist, weist das NPM-MLF1-Fusionsprotein in dem gleichen Experiment eine überwiegende Lokalisation im Zellkern (ZK) auf. Das WT-NPM-Protein wiederum ist ein nucleolares Phosphoprotein, das natürlicherweise im ZK und den Nucleoli lokalisiert ist (Olson *et al.*, 1986). Das legt die Vermutung nahe, dass das NPM-MLF1-Protein die natürliche Lokalisation des NPM-Proteins einnimmt und die onkogene Wirkung durch den „falsch“ lokalisierten MLF1-Anteil im ZK zustande kommt (Falini *et al.*, 2006).

Das MLF1-Protein selbst wurde mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht. Eine Überexpression des nicht fusionierten MLF1-Proteins führt beispielsweise zu einer verstärkt bösartigen Ausprägung von AML und MDS, was mit einer schlechteren Prognose der erkrankten Patienten einhergeht (Matsumoto *et al.*, 2000). Außerdem zeigten andere Studien, dass die MLF1-Expression auch eine Rolle bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge und Speiseröhrenkrebs spielt (Sun *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008). Dies lässt sich zum Teil durch zellbiologische Studien erklären. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass MLF1 die Erythropoetin-induzierte Differenzierung, die p27^{Kip1}-Akkumulation und den damit verbundenen Abbruch des Zellzyklus inhibiert (Winteringham *et al.*, 2004). Eine weitere zellbiologische Untersuchung belegte, dass MLF1 oberhalb des Tumorsuppressorproteins p53 wirkt (Yoneda-Kato *et al.*, 2005; Yoneda-Kato und Kato, 2008). In normalen Zellen wirkt MLF1 über den CSN3-COP1-p53-Signalweg stabilisierend auf das p53-Protein. Dies führt zur Akkumulation dieses Tumorsuppressors und damit einhergehend zum Abbruch des Zellzyklus. Eine Störung der natürlichen MLF1-Bewegung zwischen dem ZK und dem CP, wie zum Beispiel durch die NPM-MLF1-Fusion, führt hingegen zu einer Destabilisierung des p53-Proteins und damit zur Aktivierung des Zellzyklus. So können Zellen unkontrolliert proliferieren, wie es für transformierte Zellen kennzeichnend ist.

Abgesehen von diesen Studien ist die biologische Aktivität des MLF1-Proteins unbekannt. Hinweise auf seine physiologische Wirkung stammen weitestgehend aus dem Proteinsequenzvergleich mit bekannten Sequenzmotiven (siehe unten) und der Identi-

fizierung möglicher Interaktionspartner. Zu diesen gehören neben der oben genannten C-terminalen Untereinheit des COP9-Signalosoms (CSN3) (Yoneda-Kato *et al.*, 2005) das MLF1-Adaptermolekül (MADM) (Lim *et al.*, 2002) und das MLF1-interagierende Protein (MLF1IP) (Hanissian *et al.*, 2004, 2005). In weiteren Untersuchungen konnten das MLF1-assoziierte nukleare Protein (Manp) und 14-3-3 ζ als Interaktionspartner identifiziert werden (Lim *et al.*, 2002; Winteringham *et al.*, 2006).

1.4.2. Aminosäuresequenz von MLF1

Die Sequenz des MLF1-Proteins weist keine signifikante Homologie zu bereits charakterisierten Proteinen auf (Yoneda-Kato *et al.*, 2005). Dennoch konnten durch den Vergleich der bekannten MLF1-Proteinsequenzen untereinander und mit anderen Proteinen konservierte Bereiche und bekannte Motive identifiziert werden. Abbildung 1.10 zeigt einen Sequenzvergleich von MLF1-Proteinen aus verschiedenen eukaryotischen Organismen. Dafür wurden folgende Sequenzen verwendet: MLF1 Isoform 1 aus *H.sapiens* (NP_071-888.1), MLF1 aus *P.abelii* (NP_001127516.1), MLF1 aus *B.taurus* (NP_001033247.1), MLF1 aus *R.norvegicus* (NP_001101150.1), HLS7 aus *M.musculus* (AAC17946.1) und MLF1 Isoform A aus *D.melanogaster* (NP_523753.1). HLS7 (*hemopoietic lineage switch gene 7*) ist die ursprüngliche Bezeichnung nach der Funktion des in *M.musculus* identifizierten MLF1-Proteins (Williams *et al.*, 1999; Hitzler *et al.*, 1999).

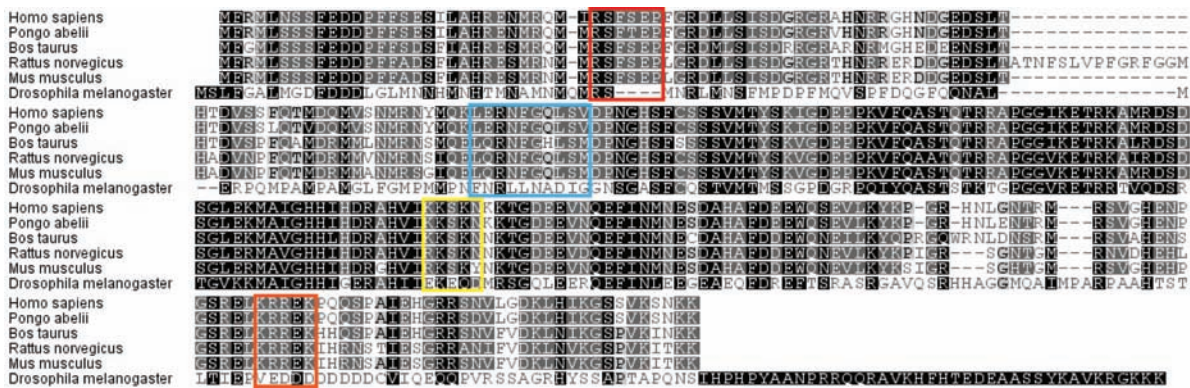


Abbildung 1.10: Sequenzvergleich der bisher gefundenen MLF1-Proteine. Bekannte Sequenzmotive sind in farbiger Umrandung hervorgehoben; rot: 14-3-3-Bindestelle, blau: NES, gelb und orange: NLS. Schwarz = 100 % Homologie; dunkelgrau = 80-100 % Homologie; hellgrau = 60-80 % Homologie; weiß = weniger als 60 % Homologie. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software *Geneious Pro 4.8.3* (Biomatters, Neuseeland) unter Verwendung der Matrix Blosum62 erstellt.

In einigen Organismen wurden mehrere Isoformen des MLF1-Proteins identifiziert. Allerdings handelt es sich dabei in den meisten Fällen um C-terminal verkürzte Proteine der MLF1-Isoform 1. Daher wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen. Zudem

wurde auch ein MLF2-Protein beschrieben (Kuefer *et al.*, 1996). In diesem Protein fehlen sämtliche konservierte oder bekannte und unten näher beschriebene Sequenzmotive, so dass auch auf dieses Protein nicht weiter eingegangen wird. Insgesamt zeigt der Sequenzvergleich, dass die MLF1-Proteinsequenz aus *D.melanogaster* allgemein und bezogen auf die unten beschriebenen Sequenzmotive am wenigsten konserviert ist und daher dieses Protein wahrscheinlich anders reguliert wird. Bezogen auf das humane MLF1-Protein weist das MLF1-Protein aus *R.norvegicus* einen 15 AS umfassenden Einschub nach AS 65 auf, der in keinem der anderen bekannten MLF1-Proteine vorhanden ist.

Zu den konservierten Sequenzmotiven gehören zwei Kernimportsequenzen (*nuclear localization sequence*, NLS) in den Bereichen der AS 168-174 (gelbe Umrandung) und AS 232-236 (orange Umrandung) bezogen auf das humane MLF1-Protein. Außerdem konnte in dem murinen MLF1-Protein eine Kernexportsequenz (*nuclear export sequence*, NES) identifiziert werden (Winteringham *et al.*, 2006). Die Funktionalität dieser NES konnte auch in dem humanen Protein (AS 89-98, blaue Umrandung) nachgewiesen werden (Yoneda-Kato und Kato, 2008). Diese NES (LERNFQGLSV) ist charakteristisch für NES-Motive mit der Consensus-Sequenz $\Phi X_{2-3} \Phi X_{2-3} \Phi X \Phi$, wobei X jede AS sein kann und Φ eine hydrophobe AS sein muss (Engelsma *et al.*, 2004; Kutay und Güttinger, 2005; Yoneda-Kato und Kato, 2008).

In eukaryotischen Zellen wird der Kernimport und -export über die Erkennungssequenzen NLS und NES durch die Ran-GTPase reguliert (Görlich und Kutay, 1999). Kurze basische Kernimportsequenzen werden durch Importin α erkannt und über dessen Bindung an Importin β in den ZK transportiert (Dingwall und Laskey, 1991). Dort sorgt die Bindung von Ran-GTP an Importin β für die Freisetzung des transportierten Proteins (Görlich *et al.*, 1996). Der Kernexport wird ebenfalls durch die Ran-GTPase reguliert. Ein Komplex aus Ran-GTP und CRM1/Exportin 1 bindet über eine hydrophobe Tasche die NES eines zu transportierenden Proteins (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Im CP wird das transportierte Protein durch Umwandlung von Ran-GTP in Ran-GDP freigesetzt. Die Umwandlung von Ran-GTP in Ran-GDP wird durch ein ausschließlich im CP lokalisiertes Ran-spezifisches G-Protein aktivierendes Protein, ein sogenanntes Ran-GAP, katalysiert (Stewart, 2007).

Das Vorhandensein der NLS und NES deutet also daraufhin, dass sich das MLF1-Protein in der Zelle zwischen dem ZK und CP hin- und herbewegt. Dieses Erkenntnis passt gut zu den zuvor beschriebenen zellbiologischen Untersuchungen. Zudem konnte ein *mode I* 14-3-3-Bindemotiv identifiziert werden (Hitzler *et al.*, 1999; Williams *et al.*,

1999). Bezogen auf das humane MLF1-Protein lautet es R-S-F-pS-E-P und umfasst die AS 31-36.

1.4.3. Wechselwirkung von MLF1 mit 14-3-3-Proteinen

Da 14-3-3-Proteine die subzelluläre Lokalisation ihrer Interaktionspartner beeinflussen können (siehe Abschnitt 1.3.4 und Abbildung 1.9) und die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins von großer Relevanz zu sein scheint (siehe Abschnitt 1.4.1), ist die Untersuchung der MLF1/14-3-3-Wechselwirkung von besonderer Bedeutung. Die ersten Hinweise auf eine MLF1/14-3-3-Wechselwirkung konnten über ein Hefe-Zwei-Hybrid-System gewonnen und mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert werden (Lim *et al.*, 2002). Diese Untersuchungen belegten ebenfalls, dass die MLF1/14-3-3-Wechselwirkung phosphorylierungsabhängig ist und das S34 des MLF1-Proteins phosphoryliert sein muss, wobei die verantwortliche Kinase nicht identifiziert werden konnte. Die naheliegenden Kinasen wie Proteinkinase A (PKA), PKC, Akt und CaMK konnten hingegen ausgeschlossen werden (Lim *et al.*, 2002).

Eine weiterführende zellbiologische Studie zeigte, dass die Lokalisation von murinem MLF1 in Cos-7-Zellen 14-3-3-abhängig ist (siehe Abbildung 1.11). Dafür wurde murines MLF1 als WT oder 14-3-3-Bindemutante (S34A) heterolog in Cos-7-Zellen exprimiert.

Anschließend wurde das MLF1-Protein über Immunfärbung mit MLF1-Antiserum und einem sekundären, fluoreszenzmarkierten anti-IgG-AlexaFluor488/546 Antikörper sichtbar gemacht. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins untersucht. Erwartungsgemäß war dabei das WT-MLF1 im CP lokalisiert. Die 14-3-3-Bindemutante MLF1-S34A hingegen war etwa zu gleichen Teilen sowohl im CP als auch im ZK der Cos-7-Zellen sichtbar.

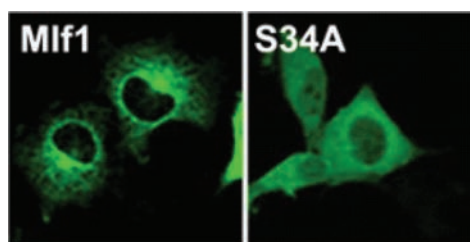


Abbildung 1.11: 14-3-3-abhängige Lokalisation von murinem MLF1 in Cos-7-Zellen. Abbildung aus Winteringham *et al.* (2006).

Obwohl dieser Versuch zusammen mit den Hefe-Zwei-Hybrid- und den Co-Immunopräzipitationsversuchen keinen Beweis für eine direkte MLF1/14-3-3-Wechselwirkung lieferte, wurde ein Regulationsmechanismus für das MLF1-Protein wie in Abbildung 1.12 vorgeschlagen. Demnach bewegt sich das MLF1-Protein zwischen CP und ZK hin und her. Im CP ist das MADM-Protein dafür zuständig, eine noch nicht identifizierte Proteinkinase X zu rekrutieren und die Phosphorylierung des MLF1-Proteins zu initi-

ieren. Das phosphorylierte MLF1 bindet im CP an 14-3-3-Proteine und wird dadurch im CP gehalten (Winteringham *et al.*, 2006). Wird MLF1 jedoch dephosphoryliert, so kann es wieder in den ZK translozieren und dort mit Manp interagieren. Möglicherweise nimmt es dort entweder direkt oder indirekt Einfluss auf die Transkription. MLF1 ist in der Lage DNS zu binden und hat Einfluss auf Gene, die für die Transkriptionsregulation verantwortlich sind (Winteringham *et al.*, 2006). Eine bestimmte Erkennungssequenz oder Promotorregion konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden.

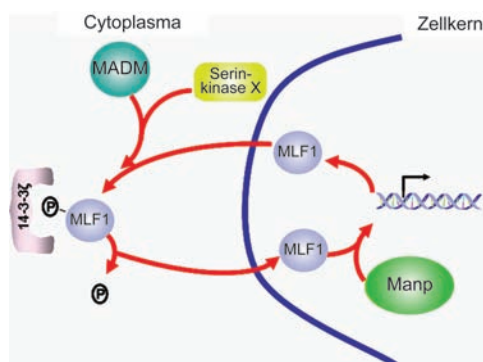


Abbildung 1.12: Vorgeschlagene Regulation der subzellulären Lokalisation von MLF1. Dabei liegt ein Gleichgewicht zwischen der Bindung von MLF1 an 14-3-3-Proteine im CP und Manp im ZK vor. Die Proteinkinase, die für die Phosphorylierung von MLF1 zuständig ist, konnte bisher nicht identifiziert werden und wird daher mit „X“ bezeichnet. Abbildung modifiziert nach Winteringham *et al.* (2006).

Den ersten Beweis für eine direkte Wechselwirkung zwischen MLF1 und einem 14-3-3-Protein konnte die, im Vorfeld dieser Arbeit durch Michael Weyand gelöste, Kristallstruktur des 14-3-3 ϵ /MLF1-Komplexes liefern (siehe Molzan *et al.* (2012) und Abbildung 1.13). Dafür wurde ein synthetisches MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Phosphopeptid mit 14-3-3 ϵ

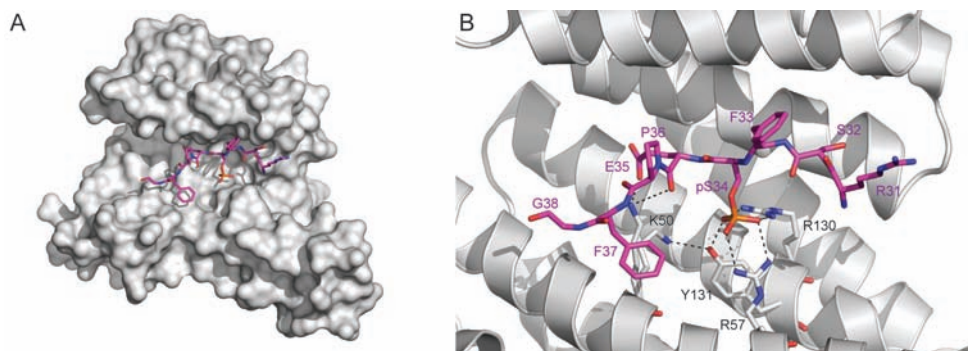


Abbildung 1.13: Strukturmodell des Komplexes aus 14-3-3 ϵ und MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34. (A) Graue Oberflächendarstellung eines 14-3-3 ϵ -Monomers mit gebundenem MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Peptid in magenta als Stäbchenmodell gezeigt. (B) Detaillierte Sicht auf die 14-3-3 ϵ -Bindegrube, die als graues Bändermodell gezeigt ist. Die konservierten 14-3-3-AS, die das pS34 koordinieren, sind beschriftet und die Wasserstoffbrückenbindungen als schwarz gestrichelte Linie angedeutet. Das MLF1-Peptid ist wie in (A) dargestellt und die AS in magenta beschriftet. PDB ID: 3UAL.

co-kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse die 3D-Struktur bestimmt. Die Auflösung betrug 1,8 Å und von dem MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Peptid waren 8 von 14 AS so in der

Struktur koordiniert, dass diese in der Elektronendichte sichtbar waren. Das 14-3-3 ϵ weist auch in diesem Komplex seine typische W-förmige Struktur auf und pro Monomer ist ein MLF1-Peptid gebunden. Dieses liegt in einer elongierten Form vor und wird über die Koordination des pS34 in der Bindegrube orientiert.

1.5. Die 14-3-3/C-RAF-Wechselwirkung

1.5.1. Vorkommen und Isoformen der Serin-/Threoninproteinkinase RAF

C-RAF wurde ursprünglich als V-RAF-Onkogen (*rapidly growing fibrosarcomas*, RAF) des murinen Retrovirus 3611-MSV identifiziert und kloniert (Rapp *et al.*, 1983). Homologe von C-RAF konnten in *D.melanogaster* (D-RAF) und *C.elegans* (lin-45) identifiziert werden (Marais und Marshall, 1996). In Vertebraten konnten außerdem die A- und B-RAF-Isoformen identifiziert werden (Marais und Marshall, 1996). A-RAF ist mit 68 kDa die kleinste Isoform. B-RAF kann alternativ gespleißt werden und liegt daher als 75-100 kDa großes Protein vor (Barnier *et al.*, 1995; Storm *et al.*, 1990), während C-RAF eine Größe von 72-74 kDa aufweist. Die drei Isoformen werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert, wobei A-RAF vermehrt in urogenitalen Geweben auftritt und B-RAF in neuronalem Gewebe stärker exprimiert wird als in anderen Geweben. Deletionsstudien in Mäusen konnten zeigen, dass die RAF-Isoformen nicht-redundante Funktionen in der Entwicklung übernehmen. Während *a-raf*^{-/-}-Mäuse 7-21 Tage nach der Geburt an neurologischen und gastrointestinalen Defekten sterben (Pritchard *et al.*, 1996), sterben *b-raf*^{-/-}- oder *c-raf*^{-/-}-Embryos bereits *in utero* (Wojnowski *et al.*, 1997, 1998; Hüser *et al.*, 2001; Mikula *et al.*, 2001). Dabei zeigen die *b-raf*^{-/-}-Mäuse ein verlangsamtes Wachstum sowie vaskuläre und neuronale Defekte, während die *c-raf*^{-/-}-Embryos eine starke Leberapoptose aufweisen.

Der Proteinsequenzvergleich zeigt, dass die A-, B- und C-RAF-Isoformen konservierte Regionen aufweisen (siehe Abbildung 1.14). Zwei der konservierten Regionen befinden sich im N-terminalen Bereich des Proteins (*conserved region*, CR1 und CR2). CR1 kodiert für die RAS-bindende Domäne (RBD, AS 51-131 bezogen auf C-RAF) und eine cysteinreiche Domäne (CRD, AS 138-184 bezogen auf C-RAF), die beide für die Plasmamembranrekrutierung der RAF-Kinase notwendig sind. Die CR2 (AS 251-266 bezogen auf C-RAF) beinhaltet eine von drei 14-3-3-Bindestellen. Der dritte konservierte Bereich befindet sich in der C-terminalen Hälfte des Proteins und kodiert die Kinasedomäne (CR3, AS 349-605 bezogen auf C-RAF). Zusätzlich konnten zahlreiche Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die teilweise konserviert sind. Diese konservierten

Phosphorylierungstellen sprechen für eine ähnliche Regulation der Isoformen, während nicht konservierte auf isoformspezifische Regulation hindeuten (Wellbrock *et al.*, 2004).

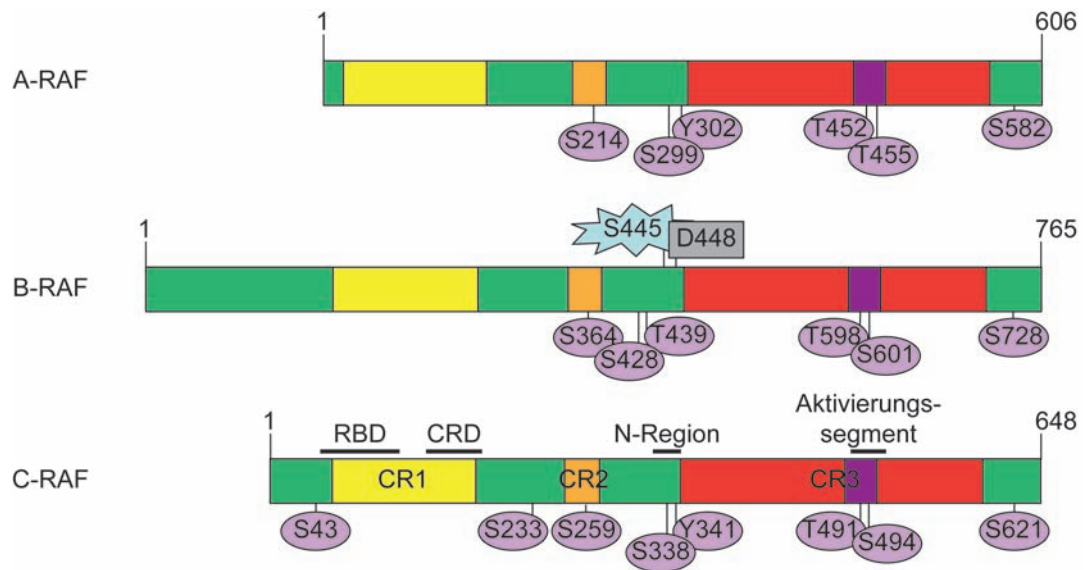


Abbildung 1.14: Strukturvergleich der drei RAF-Isoformen. Die konservierten Regionen sind farblich hervorgehoben (CR1 gelb, CR2 orange und CR3 rot). CR1 enthält die RBD und die CRD. Vor der CR3 liegt die *negative-charge regulatory* (N)-Region. In der CR3 befindet sich das Aktivierungssegment. Bekannte Phosphorylierungsstellen sind unter den einzelnen Isoformen hervorgehoben. D448 in B-RAF stellt eine Phosphomimikry-Mutation des Y341 in C-RAF und Y302 in A-RAF dar. S445 in B-RAF ist im Gegensatz zu S338 in C-RAF und S299 in A-RAF konstitutiv phosphoryliert. Abbildung modifiziert nach Wellbrock *et al.* (2004).

1.5.2. Struktur von RAF-Kinasen

Die 3D-Struktur der RAF-Kinasen konnte bisher nur in Teilen bestimmt werden. Für die C-RAF-Kinase sind mit strukturellen Informationen über die RBD (Nassar *et al.*, 1995; Filchtinski *et al.*, 2010), die CRD (Mott *et al.*, 1996) und die Kinasedomäne (Hatzivassiliou *et al.*, 2010) die meisten Informationen verfügbar. Über die B-RAF-Isoform gibt es hauptsächlich Informationen über die Kinasedomäne mit verschiedenen gebundenen Inhibitoren (Wan *et al.*, 2004) und über die RBD (PDB IDs: 2L05 und 3NY5). Am wenigsten ist über die Struktur der A-RAF-Kinase bekannt, von der eine NMR-Struktur der RBD in der PDB hinterlegt ist (PDB ID: 1WXM).

1.5.3. Physiologische Bedeutung von RAF und die MAPK-Signalkaskaden

Die MAPK-Signalkaskaden (englisch: *mitogen-activated protein kinase*) regulieren zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Entwicklung, Zellanhaftung,

Stoffwechsel und Genexpression. Eine klassische MAPK-Signalkaskade besteht aus drei aufeinander folgenden Phosphorylierungsreaktionen durch eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), eine MAPK-Kinase (MAPKK) und eine MAPK (siehe Abbildung 1.15A). MAPK phosphoryliert dann entweder ein nicht-Proteinkinase Substrat oder eine andere MAPK-aktivierte Proteinkinase (MAPKAPK). Die drei bedeutendsten MAPK-Signalkaskaden in Säugerzellen sind die JNK-, p38- und RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwege (Cuevas *et al.*, 2007; Johnson und Lapadat, 2002; Roux und Blenis, 2004; Imajo *et al.*, 2006; Cuenda und Rousseau, 2007; Raman *et al.*, 2007; Weston und Davis, 2007; Zhang und Dong, 2007). Im allgemeinen sind MAPK-Signalkaskaden nicht direkt an einen Rezeptor gekoppelt. Stattdessen werden sogenannte Effektormoleküle benötigt, die das Signal eines aktivierten Rezeptors auf den jeweiligen Signalweg übertragen. Diese Effektoren vermitteln auch den sogenannten *cross-talk*, also den Wechsel von einem Signalweg zu einem anderen (Goldsmith und Dhanasekaran, 2007).

Im Fall der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade (siehe Abbildung 1.15B) handelt es sich bei dem auslösenden Stimulus um Cytokine oder Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel den *epidermal growth factor* (EGF). Dieser bindet an eine in der Plasmamembran lokalisierte Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) wie zum Beispiel den EGF-Rezeptor (EGFR), wodurch eine Dimerisierung des Rezeptors und damit einhergehend eine Autophosphorylierung auf der cytoplasmatischen Seite ausgelöst wird. An den phosphorylierten Rezeptor kann nun *growth-factor-receptor bound-2* (GRB2) über seine phosphatbindende *Src-homology 2* (SH2)-Domäne binden. GRB2 wiederum rekrutiert *Son-of-sevenless* (SOS), das über eine *Src-homology 3* (SH3)-Domäne an Prolin-reiche Sequenzen des GRB2-Proteins bindet. SOS ist ein Guaninnukleotidaustauschfaktor (englisch: *guanine-nucleotide exchange factor*, GEF) der kleinen GTPase *Rat sarcoma* (RAS). Durch den Austausch von GTP für GDP wird RAS aktiviert, ändert seine Konformation und kann sein Effektormolekül, die RAF-Kinase, an die Plasmamembran rekrutieren und binden. Die RAF-Kinase wiederum phosphoryliert die MAPK/ERK Kinase (MEK) und diese dann die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Phosphoryliertes ERK kann in den ZK translozieren, wo es Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Elk-1 phosphoryliert. Dadurch wird die Transkription bestimmter Gene initiiert und so die finale zelluläre Antwort hervorgerufen.

Die Komplexität des MAPK-Signalwegs wird durch den zuvor erwähnten *cross-talk* erhöht. So kann beispielsweise C-RAF Signale nicht nur über den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg weiterleiten, sondern hat zum Beispiel über die Wechselwirkung mit BCL-2 auch eine anti-apoptotische Wirkung (siehe Abbildung 1.16 und Wang *et al.* (1996)).

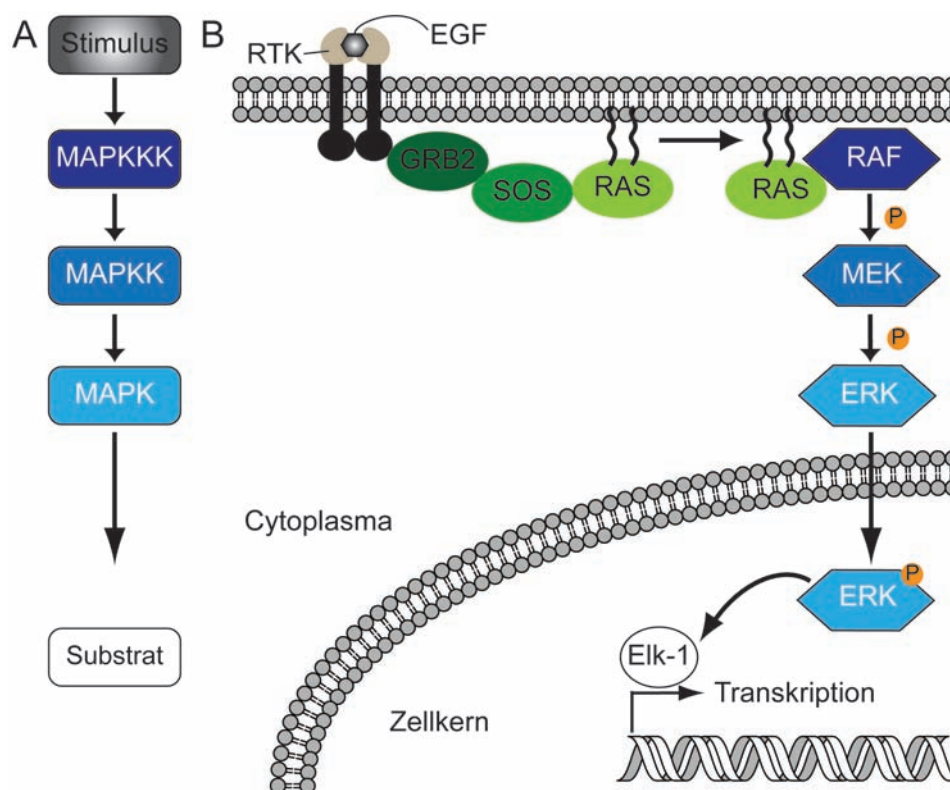


Abbildung 1.15: MAPK-Signalkaskade. (A) Schematischer Aufbau einer MAPK-Signalkaskade. (B) Schematischer Aufbau der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade in der Zelle. Abbildung modifiziert nach Wellbrock *et al.* (2004) und Gerits *et al.* (2008).

Auch Wechselwirkungen mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Li und Sedivy, 1993; Janosch *et al.*, 1996; Baumann *et al.*, 2000) und den Proteinkinasen ASK1 (Chen *et al.*, 2001) und MST2 (O'Neill *et al.*, 2004) sind bekannt. Zudem liegen die beteiligten Proteine in mehreren Isoformen vor (Raabe und Rapp, 2002; Wellbrock *et al.*, 2004). So gibt es neben den zuvor beschriebenen drei RAF-Isoformen, auch drei RAS-Isoformen (H-RAS, K-RAS und N-RAS), je zwei Isoformen von MEK (MEK1 und MEK2) und ERK (ERK1 und ERK2) sowie alternative Spleißprodukte (Gerits *et al.*, 2008). Diese Isoformen und ihre Interaktionen sind nicht redundant. So weisen zum Beispiel unterschiedliche RAS-Proteine unterschiedliche Affinitäten zu den RBDs der einzelnen RAF-Proteine auf (Weber *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2007). Genetische Studien an Mäusen konnten außerdem zeigen, dass die Deletion der unterschiedlichen beteiligten Proteine zu unterschiedlichen Phänotypen führt, wie es bei den RAF-Isoformen beobachtet wurde (Aouadi *et al.*, 2006; Gerits *et al.*, 2007).

Die Aktivierung der RAF-Kinase ist nicht vollständig aufgeklärt (Hekman *et al.*, 2004). Als wichtiger Schritt in der RAF-Aktivierung wird die Assoziation der RAF-Kinase mit Lipiden der Plasmamembran betrachtet (Stokoe *et al.*, 1994; Hekman *et al.*, 2002), wo die Wechselwirkung mit aktiviertem RAS stattfindet. Auch die Dimerisierung der RAF-Kinasen (siehe Abbildung 1.16), verschiedene Phosphorylierungen und die Wechselwirkung mit 14-3-3-Proteinen (siehe unten) spielen eine Rolle (Hekman *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass die Dimerisierung in normalen Zellen RAS-abhängig ist und es zur Ausbildung von Homo- und Heterodimeren kommen kann, erhöht die Komplexität des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs zusätzlich (Luo *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2004; Garnett *et al.*, 2005; Rushworth *et al.*, 2006; Rajakulendran *et al.*, 2009; Heidorn *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010; Hatzivassiliou *et al.*, 2010). Durch die Heterodimerisierung von B-RAF und C-RAF kann es zu einem B-RAF-induzierten *cross talk* zwischen dem RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg und anderen C-RAF-abhängigen Signalwegen kommen (siehe Abbildung 1.16).

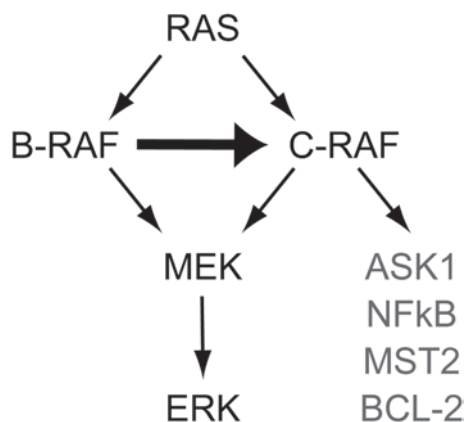


Abbildung 1.16: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen B-RAF und C-RAF-Heterodimerisierung und dem *cross talk* zwischen dem RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg und anderen C-RAF-abhängigen Signalwegen. Abbildung aus Garnett *et al.* (2005).

Die Effizienz des Aktivierungsprozesses und Aufrechterhaltung der Signalisierungsgenauigkeit wird durch *scaffold* (englisch: Gerüst) Proteine wie *kinase suppressor of RAS* (KSR), *connector-enhancer of KSR* (CNK) und *suppressor of RAS mutations-8* (SUR8) gewährleistet (Morrison, 2001; Morrison und Davis, 2003; Pouysségur *et al.*, 2002; Denouel-Galy *et al.*, 1998; Lanigan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000; Anselmo *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2003; Dhillon und Kolch, 2002; Raabe und Rapp, 2002, 2003). Diese Proteine stabilisieren und koordinieren den Signalkomplex (Wellbrock *et al.*, 2004). Die Regulation der RAF-Kinase erfolgt zu einem Großteil durch Phosphorylierung mittels Kinasen wie PKA oder Akt (Zimmermann und Moelling, 1999; Dhillon und Kolch, 2002; Ory *et al.*, 2003; Raabe und Rapp, 2003) und durch Dephosphorylierung mittels Phosphatasen wie Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Kubicek *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2007) und damit einhergehend über die Bindung an 14-3-3-Proteine, was im nächsten Abschnitt näher beschrieben wird.

1.5.4. Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen

Wie zuvor erwähnt, können 14-3-3-Proteine mit RAF interagieren und diese Kinase regulieren (Shimizu *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1997; Tzivion *et al.*, 1998). Welchen Einfluss die 14-3-3-Bindung hat, ist abhängig von der Bindestelle der RAF-Kinase. In der C-RAF-Isoform wurden bisher drei 14-3-3-Bindestellen identifiziert.

S233-Bindestelle. Die 14-3-3-Bindestelle um S233 der C-RAF-Kinase umfasst die AS 231-235 und stellt mit der Sequenz R-Y-pS-T-P ein nicht-Konsensus *mode I*-Bindemotiv dar (siehe Tabelle 1 und Abschnitt 1.3.3). Diese Bindestelle konnte bisher nur für die C-RAF-Isoform verifiziert werden (siehe Abbildung 1.14). Die Phosphorylierung des S233 wird durch cAMP induziert. Die durch cAMP aktivierte PKA erkennt die AS 230-233 als Substrat und phosphoryliert sie spezifisch am S233 (Dumaz *et al.*, 2002). Durch die Phosphorylierung an S233 kann C-RAF an 14-3-3-Proteine binden. Diese Bindung ist vermutlich zusammen mit der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung für die Inaktivierung der C-RAF-Kinase verantwortlich (Dumaz *et al.*, 2002; Dumaz und Marais, 2003).

S259-Bindestelle. Die 14-3-3-Bindestelle um S259 der C-RAF-Kinase umfasst die AS 256-261 und stellt mit der Sequenz R-S-T-pS-T-P ein *mode I*-Bindemotiv dar (siehe Tabelle 1 und Abschnitt 1.3.3). Diese Bindestelle ist in allen drei RAF-Isoformen konserviert (siehe Abbildung 1.14). Dabei entspricht das S259 dem S214 in A-RAF und S364 in B-RAF (Brummer *et al.*, 2006).

Obwohl Übereinstimmung darüber herrscht, dass die Bindung von 14-3-3 über die S259-Bindestelle inaktivierend auf die C-RAF-Kinase wirkt (Dhillon und Kolch, 2002; Dumaz und Marais, 2003), ist noch nicht geklärt, wie die Wechselwirkung reguliert wird. Die Proteinkinasen PKA und Akt können C-RAF an dieser Stelle phosphorylieren (Zimmermann und Moelling, 1999; Dumaz *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2002; Dumaz und Marais, 2003). Für die Dephosphorylierung sind die Phosphatasen PP1 und PP2A verantwortlich (Dhillon und Kolch, 2002; Kubicek *et al.*, 2002; Ory *et al.*, 2003; Raabe und Rapp, 2003; Dhillon *et al.*, 2007). Dumaz und Marais (2003) vermuten, dass die 14-3-3-Wechselwirkung über die S233- und S259-Bindestellen zusammen inaktivierend auf die C-RAF-Kinase wirkt. Sie schlagen vor, dass es sich bei der S259-vermittelten 14-3-3-Wechselwirkung um die *gatekeeper*-AS handelt und S233 in diesem Fall die schwächere 14-3-3-Wechselwirkung vermittelt (siehe Abschnitt 1.3.3 und Yaffe (2002)). Dhillon *et al.* (2007) hingegen vermuten, dass die S259-vermittelte 14-3-3-Wechselwirkung von C-RAF

zusammen mit der S621-vermittelten Wechselwirkung auftritt. Da die Wechselwirkung von S621 eine stärkere Affinität aufweist als die S259-vermittelte, halten sie S621 für die *gatekeeper*-AS.

S621-Bindestelle. Die C-terminale 14-3-3-Bindestelle um S621 der C-RAF-Kinase umfasst die AS 618-622 und stellt mit der Sequenz R-S-A-pS-E-P ein *mode I*-Bindemotiv dar (siehe Tabelle 1 und Abschnitt 1.3.3). Diese Bindestelle ist in allen drei RAF-Isoformen hoch konserviert (siehe Abbildung 1.14). Dabei entspricht das S621 dem S582 in A-RAF und S728 in B-RAF.

Welche Kinasen an der Phosphorylierung des S621 beteiligt sind, ist nicht aufgeklärt. Allerdings ist S621 auch das Ziel einer Autophosphorylierung (Mischak *et al.*, 1996; Thorson *et al.*, 1998; Hekman *et al.*, 2004; Noble *et al.*, 2008). C-RAF liegt in unstimulierten Zellen an S621 phosphoryliert vor (Morrison *et al.*, 1993). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Phosphorylierung an S621 durch Aktivierung der Zellen mit EGF oder NGF induziert wird (Kubicek *et al.*, 2002; Hekman *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte allerdings auch gezeigt werden, dass eine Inaktivierung der C-RAF-Kinase durch cAMP-Signalwege die S621-Phosphorylierung induziert (Mischak *et al.*, 1996). In einer weiteren Studie konnte durch Austausch der phosphorylierungsabhängigen S621-Bindestelle in eine phosphorylierungsunabhängige 14-3-3-Bindesequenz gezeigt werden, dass die 14-3-3-Bindung eine wichtige Rolle spielt und nicht nur die Phosphorylierung an sich (Light *et al.*, 2002).

Es ist noch nicht umfassend geklärt, ob die S621-vermittelte 14-3-3-Bindung an C-RAF auf dieses inaktivierend oder aktivierend wirkt (Mischak *et al.*, 1996; Tzivion *et al.*, 1998; Kubicek *et al.*, 2002; Dhillon und Kolch, 2002; Chong *et al.*, 2003). Dennoch weisen aktuelle Untersuchungen eher auf einen aktivierenden Mechanismus hin (Dumaz *et al.*, 2002; Hekman *et al.*, 2004; Noble *et al.*, 2008; Dhillon *et al.*, 2009). Noble *et al.* (2008) vermuten, dass die aktivierende Wirkung der S621-vermittelten 14-3-3-Bindung auf die C-RAF-Kinase durch einen stabilisierenden Effekt hervorgerufen wird und die Kinase so vor proteosomalem Abbau schützt. Zudem wird auch vermutet, dass die S621-vermittelte 14-3-3-Bindung zu einer Heterodimerisierung der B- und C-RAF-Kinasen führt (Weber *et al.*, 2001; Rushworth *et al.*, 2006). Wie zuvor beschrieben wirkt die Dimerisierung der RAF-Kinasen aktivierend bezogen auf ihre Kinaseaktivität (siehe Abschnitt 1.5.3 und Hekman *et al.* (2004)).

Regulation der C-RAF-Kinase durch 14-3-3-Proteine. Anhand der bisherigen Untersuchungen zu 14-3-3/C-RAF-Wechselwirkungen haben Matallanas *et al.* (2011) die in Abbildung 1.17 dargestellte Hypothese zur Regulation von C-RAF durch 14-3-3-Proteine aufgestellt. Demnach liegt C-RAF in unstimulierten Zellen an S259 und S621 phosphoryliert vor. Durch die Bindung eines 14-3-3-Dimers an beide Bindestellen gleichzeitig wird die C-RAF-Kinase in einer „geschlossenen“ inaktiven Konformation im CP gehalten. Eine Stimulation etwa durch EGF führt zur Plasmamembranrekrutierung der C-RAF-Kinase durch RAS. Dort wird S259 durch PP1 oder PP2A dephosphoryliert. Anschließend kann die C-RAF-Kinase für die Aktivierung an weiteren Stellen phosphoryliert werden und Homo- und Heterodimere ausbilden, die durch 14-3-3-Dimere stabilisiert werden. Allerdings lässt diese Hypothese die S233-Bindestelle der C-RAF-Kinase in Bezug auf eine mögliche Regulation durch 14-3-3-Proteine vollkommen außer Acht.

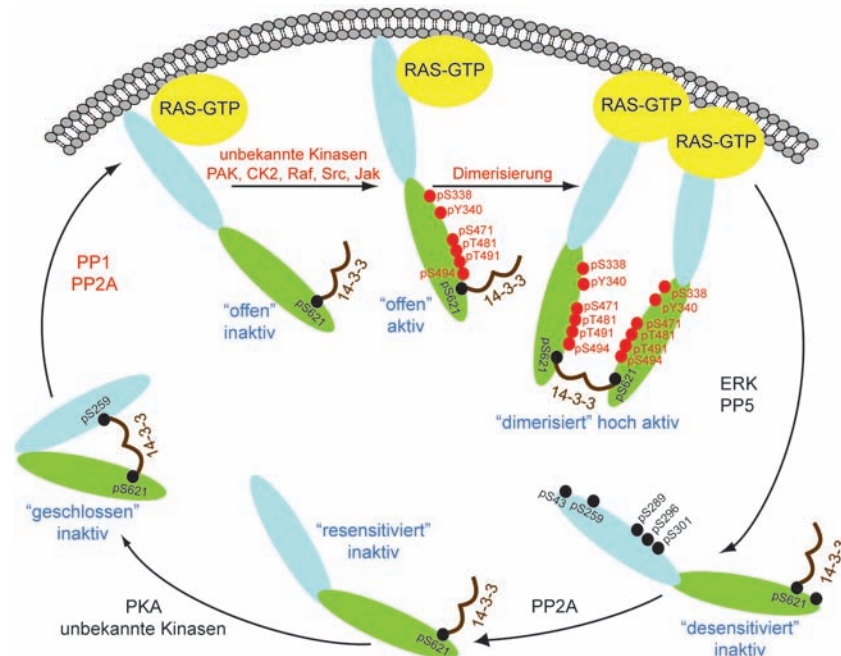


Abbildung 1.17: Regulation von C-RAF durch 14-3-3-Proteine. Aktivierende Prozesse sind rot markiert, inaktiverende schwarz und Aktivierungszustände in blau. Proteinphosphatase 5 (PP5) dephosphoryliert C-RAF an S338. Abbildung modifiziert nach Matallanas *et al.* (2011).

Noonan- und LEOPARD-Syndrome. Die Bedeutung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs lässt sich an der Tatsache messen, dass er in ~30% aller humanen Tumore aktiviert ist (Downward, 2003). Zudem sind auch die Entwicklungstörungen Noonan- und LEOPARD-Syndrom auf eine gestörte Regulation dieses Signalwegs zurückzuführen.

ren. Neben Mutationen in *PTPN11* (Tartaglia *et al.*, 2001), *SOS1* (Roberts *et al.*, 2007; Tartaglia *et al.*, 2007) und *KRAS* (Carta *et al.*, 2006; Schubbert *et al.*, 2006), können auch Mutationen in *RAF1*, das für die C-RAF-Kinase kodiert, zu Noonan- oder LEOPARD-Syndromen führen (Pandit *et al.*, 2007; Razzaque *et al.*, 2007). Neun von elf identifizierten Mutationen umgeben die S259-Bindestelle der C-RAF-Kinase (siehe Abbildung 1.18).

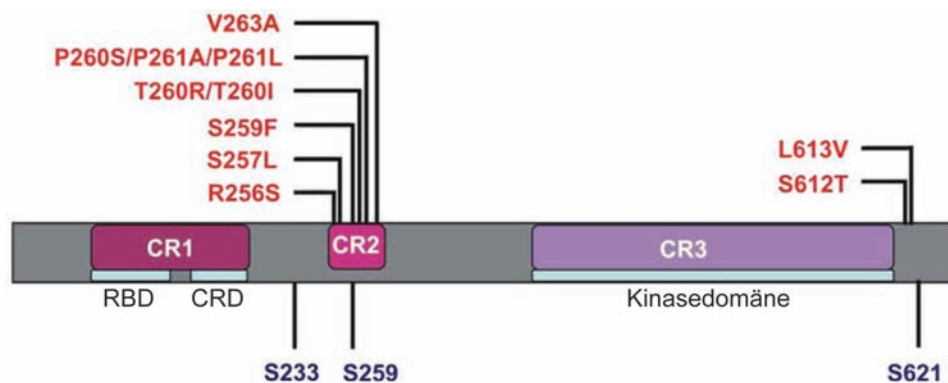


Abbildung 1.18: C-RAF-Mutationen in Noonan- und LEOPARD-Syndromen. Die konservierten Regionen CR1-3 sind in rosa und lila hervorgehoben und die RBD, CRD und Kinasedomäne beschriftet. Die drei bekannten 14-3-3-Bindestellen sind in lila unter dem Protein beschriftet und Mutationen, die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen vorkommen, in rot über dem Protein. Abbildung modifiziert nach Molzan *et al.* (2010).

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte die Struktur des Komplexes aus 14-3-3 ζ und einem C-RAF₍₂₅₅₋₂₆₄₎pS259-Phosphopeptid durch Micheal Weyand und Benjamin Schumacher mit einer Auflösung von 2,4 Å gelöst werden (siehe Abbildung 1.19A und B). Das er-

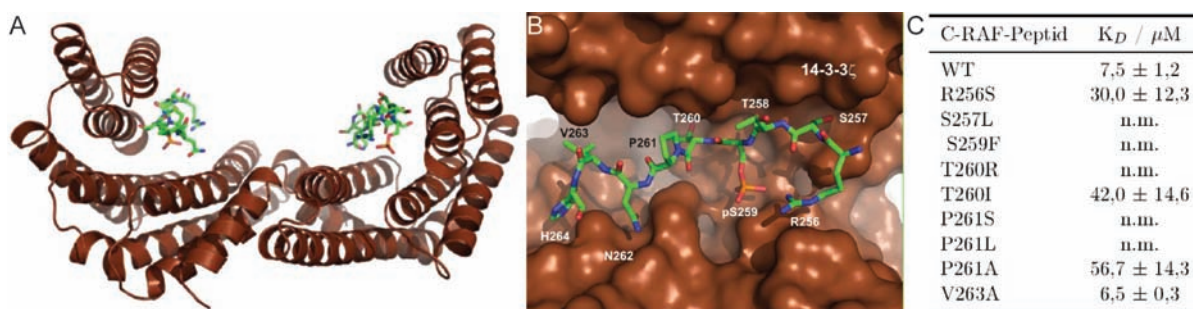


Abbildung 1.19: Strukturmodell des Komplexes aus 14-3-3 ζ und C-RAF₍₂₅₅₋₂₆₄₎pS259. (A) Das 14-3-3 ζ -Dimer ist in braun als Bändermodell abgebildet und das C-RAF-Peptid in grün als Stäbchenmodell. (B) Detaillierte Ansicht der Bindegroove. Das 14-3-3-Protein ist in brauner Oberflächendarstellung gezeigt und das C-RAF-Peptid wie in (A). Die AS des C-RAF-Peptids sind beschriftet. (C) Ergebnisse der ITC-Messungen von 14-3-3 ζ mit verschiedenen C-RAF-Phosphopeptiden. Abbildung aus Molzan *et al.* (2010).

haltene Strukturmodell zeigt, dass die AS 256-264 des C-RAF-Proteins an der Wech-

selwirkung beteiligt sind. Daraus konnte geschlossen werden, dass alle Aminosäuren um S259, die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen mutiert sein können (AS 256-263), für die Bindung an 14-3-3-Proteine wichtig sind. Weiterhin konnte Benjamin Schumacher mittels ITC zeigen, dass die Bindung zwischen 14-3-3 und C-RAF-Phosphopeptiden *in vitro* durch diese Mutationen gestört oder sogar verhindert wird (siehe Abbildung 1.19C und Molzan *et al.* (2010)).

Zusätzlich konnte Corinna Ottmann ebenfalls im Vorfeld dieser Arbeit zeigen, dass diese Mutationen Einfluss auf die Lokalisation eines C-terminal verkürzten C-RAF-Proteins in HEK293-Zellen haben. Dafür wurde C-terminal verkürztes GFP-C-RAF(1-330) mit H-RAS heterolog exprimiert (siehe Abbildung 1.20 und Molzan *et al.* (2010)). Während

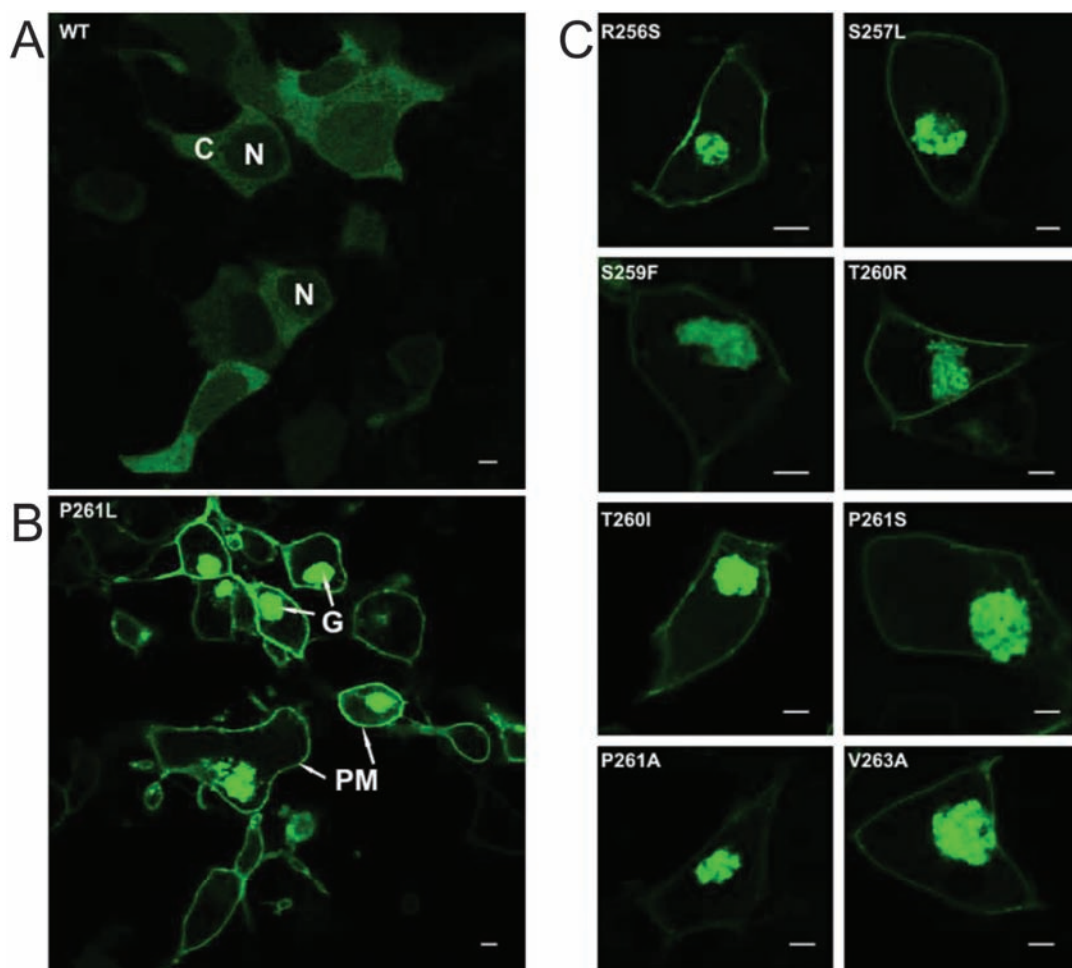


Abbildung 1.20: Lokalisation von C-RAF in HEK293-Zellen. (A) Lokalisation von heterolog exprimiertem C-terminal verkürztem C-RAF in HEK293-Zellen im CP. (B) Heterolog exprimiertes C-terminal verkürztes C-RAF P261L dagegen ist an der PM und am Golgi lokalisiert. (C) Auch die anderen Mutationen, die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen gefunden wurden, verändern die Lokalisation von C-RAF. Abbildung aus Molzan *et al.* (2010).

das C-terminal verkürzte WT-C-RAF im CP lokalisiert ist, sind die Proteine, die die Noonan- und LEOPARD-Syndrom-Mutationen tragen, an der Plasmamembran (PM) und am Golgi lokalisiert. Durch diese Mutationen wird also auch in Zellen die Bindung von C-RAF an 14-3-3-Proteine gestört. Das mutierte C-RAF co-lokalisiert mit H-RAS in der Zelle, von dem man weiß, dass es an der PM und am Golgi lokalisiert ist (Chiu *et al.*, 2002; Rocks *et al.*, 2005). H-RAS konkurriert also in Zellen mit 14-3-3-Proteinen um die Bindung an C-RAF und eine gestörte S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung sorgt für eine veränderte Lokalisation der C-RAF-Kinase und damit einhergehend für eine Co-Lokalisation mit H-RAS.

2. Zielsetzung

PPIs lassen sich mit Kleinmolekülen pharmakologisch modulieren. Im Gegensatz zu den PPI-Inhibitoren ist die Anzahl der bekannten PPI-Stabilisatoren jedoch vergleichsweise gering. Während einige PPI-Stabilisatoren als biologische *Tool Compounds* eingesetzt werden (Seamon *et al.*, 1981; Peyroche *et al.*, 1999), werden nur wenige in der Humanmedizin als Immunsuppressiva oder Krebsmedikamente angewendet (Vézina *et al.*, 1975; Dreyfuss *et al.*, 1976; Kino *et al.*, 1987; Wani *et al.*, 1971).

Um neue PPI-Stabilisatoren zu identifizieren, muss eine pharmakologisch interessante PPI zunächst umfassend charakterisiert werden. Es muss geprüft werden, ob eine Stabilisierung physiologisch sinnvoll und möglich ist, und schließlich die Suche nach Stabilisatoren durchgeführt werden.

In dieser Arbeit sollten die für Krebs relevanten 14-3-3-Protein-Wechselwirkungen mit MLF1 und C-RAF mit biochemischen und strukturellen Methoden charakterisiert werden. Es sollte weiterhin zellbiologisch überprüft werden, ob eine Stabilisierung dieser Wechselwirkungen aus physiologischer Sicht sinnvoll ist.

Im Fall der MLF1/14-3-3-Wechselwirkung sollte basierend auf der im Vorfeld dieser Arbeit gelösten Röntgenkristallstruktur des Komplexes aus dem MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Peptid und 14-3-3 ϵ die Dissoziationskonstante dieser Wechselwirkung und ausgewählten Mutanten der MLF1-Sequenz mittels ITC untersucht werden. Um der Frage nachzugehen, ob eine Stabilisierung dieser Wechselwirkung sinnvoll ist, sollte in Zellen untersucht werden, ob die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 direkt 14-3-3-abhängig ist, wie es von Winteringham *et al.* (2006) vorgeschlagen wurde.

Zudem sollte die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung weiter charakterisiert werden. Dafür sollte, basierend auf den im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die physiologische Auswirkung von Mutationen um S259, wie sie in Noonan- und LEOPARD-Syndromen gefunden wurden, untersucht werden. Außerdem sollte die S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung sowohl biochemisch als auch zellbiologisch untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob C-RAF auch gleichzeitig über S233 und S259 an 14-3-3-Proteine binden kann, und mit welcher Stöchiometrie eine derartige Wechselwirkung gegebenenfalls stattfindet. Weiterhin sollte überprüft werden, ob der bekannte 14-3-3-PPI-Stabilisator FCA die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung stabilisieren kann und gegebenenfalls nach einem ähnlichen Stabilisator gesucht werden. Dieser sollte biochemisch und strukturell charakterisiert werden und der Einfluss auf die aktivierende S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Agarosegelkammer	MPI für molekulare Physiologie (Dortmund)
Analysenwaage CP224S	Sartorius (Göttingen)
Analysenwaage ME235P	Sartorius (Göttingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
FPLC-Anlage, <i>Äkta-Purifier</i> , <i>Äkta-Explorer</i>	GE Healthcare (Freiburg)
Gefrierbehälter, Mr. Frosty Cryo 1 °C	Nalgene (Rochester, USA)
Heizblock, Dri-Block DB-2A	Techne (Stone, Grossbritannien)
Inkubator, WTC	BINDER (Tuttlingen)
ITC-Messgerät, VP-ITC	MicroCal (Northampton, MA)
Magnetrührer, MR 3001 K	Heidolph (Schwabach)
MicroFluidizer 110S	Microfluidics Corporation (Newton, USA)
Mikrotiterplatten-Lesegerät, Infinite®500	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop (Wilmington, USA)
PAP-Pen, <i>MaxTag</i> ™ Histo	Rockland (Gilbertsville, USA)
pH-Elektrode, Sentix 81	WTW (Weilheim)
pH-Meter, inoLab	WTW (Weilheim)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierroboter, Phoenix	Art Robins Instruments (Sunnyvale, USA)
Rotator, Sb3	Stuart (Stone, Großbritannien)
Schüttelinkubator, Innova 4430	New Brunswick (Enfield, USA)
Schüttler, Min-Gyro-Rocker	Stuart (Stone, Großbritannien)
SDS-PAGE Gelkammer	Bio-Rad (München)
SemidryBlot, T77PWR	Amersham (Uppsala, Schweden)
Spannungsgeber, Power Pac 300	Bio-Rad (München)
Spannungsgeber, Power Pac Basic	Bio-Rad (München)

SPR-Gerät, Biacore T100	GE Healthcare (Freiburg)
Thermocycler, T3000	Biometra (Göttingen)
Thermoschüttler, 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer, comfort	Eppendorf (Hamburg)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage, 44 0-47N	KERN (Balingen)
Zentrifuge, Avanti J-25, Rotor: JA25.50, JA10	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge, Avanti J26XP, Rotor: J1A-8.1000	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge, 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, 5804R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, Mikro 220R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge, Minispin	Eppendorf (Hamburg)

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bottletop-Filter	Nalgene (Neerijse, Belgium)
Deckgläser, Ø12 mm	VWR (Langenfeld)
Dialysekassetten, Slide-A-Lyzer, MWCO 30.000 Da	Thermo Fisher (Bonn)
8-Kammer-Deckglas, <i>ChamberSlide</i> , 1,0 Borosilikat	Nunc (Langenselbold)
Folie, HD Clear™, <i>Packaging Tape</i>	ShurTech Brands (Avon, USA)
Mikrotiterplatte, schwarz, 384-well, <i>small volume</i> , <i>medium binding</i>	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Mikrotiterplatte, durchsichtig, 96-well, 3550, <i>sitting drop</i>	Corning (New York, USA)
Nitrocellulose Transfer Membran, PROTRAN	Whatman (Springfield Mill, Grossbritannien)
Objektträger, 76/26, geschliffen	Diagonal (Münster)
Pipettenspitzen, 0,1-20 µl	BRAND (Wertheim)
Pipettenspitzen,	Nerbe Plus (Winsen/Luhe)

10 μ l, 200 μ l und 1250 μ l	
Plastikküvetten, 1 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Platten, 6- <i>well</i> , 24- <i>well</i>	BD Biosciences (Heidelberg)
Platten, 24- <i>well</i> , Linbro	Jena Bioscience (Jena)
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Sartstedt (Nümbrecht)
Ultrafiltrationsröhrchen, Amicon, MWCO 30.000 Da	Millipore Corporation (Billerica, USA)
Gel-blotting Papier, Whatman™	GE Healthcare (Freiburg)
Zellkulturflaschen, T75	BD Biosciences (Heidelberg)
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen, Ø10 cm	BD Biosciences (Heidelberg)

3.1.3. Chemikalien

Die Chemikalien wurden soweit nicht anders aufgeführt von einem der folgenden Hersteller bezogen: Aldrich (Steinheim), Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu Biotechnik (Gaiberg), Life Technologies (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Eine ausführliche Chemikalienliste ist dem Anhang zu entnehmen (siehe A.2).

3.1.4. Proteine, Enzyme und Proteasen

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (Beverly, USA)
DNase I	Roche (Penzberg)
illustra Hot Start Master Mix	GE Healthcare (Freiburg)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Agilent (Böblingen)
<i>Pfu</i> HotStart DNA Polymerase	Agilent (Böblingen)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Beverly, USA)
Shrimp Alkalische Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 Quick Ligase	New England Biolabs (Beverly, USA)
Thrombin	Serva (Heidelberg)
TEV Protease	MPI für molekulare Physiologie (Dortmund)

3.1.5. Antibiotika

Ampicillin	Gerbu (Gaiberg)
Chloramphenicol	Gerbu (Gaiberg)
Kanamycinsulfat	Gerbu (Gaiberg)
Tetracyclin	Gerbu (Gaiberg)

3.1.6. Größenstandards

100 bp-DNA-Leiter	Roth (Karlsruhe)
1 kbp-DNA-Leiter	Roth (Karlsruhe)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Roti®-Mark 10-150	Roth (Karlsruhe)

3.1.7. FPLC-Säulen und Säulenmaterial

Hi-Load™ Superdex™ 75, 16/60 und 26/60	GE Healthcare (Freiburg)
Ni-Sepharose™ 6 <i>fast flow</i>	GE Healthcare (Freiburg)

3.1.8. Molekularbiologische Kits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)

3.1.9. Transfektions Kits

Effectene® Transfection Kit	Qiagen (Hilden)
FuGENE® Transfection Reagent	Roche (Penzberg)
GeneJammer Transfection Reagent	Stratagene (La Jolla, USA)
jetPEI™	Polyplus-Transfection SA (Illkirch, Frankreich)
Mammalian Transfection Kit	Stratagene (La Jolla, USA)

3.1.10. Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)(137F5)	Kaninchen monoklonal (4695)	Cell Signaling (Boston, USA)
anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen polyklonal (9101)	Cell Signaling (Boston, USA)
anti-GFP (E385)	Kaninchen monoklonal (ab32146)	Abcam (Cambridge, USA)
anti-Raf-1 (C-12)	Kaninchen polyklonal, Alexa647-konjugiert, (sc-133)	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
anti-rabbit	Ziege, AP-konjugiert, (ab67221)	Abcam (Cambridge, USA)

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

3.1.11. Peptide

Bezeichnung	Sequenz
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 WT	MIRSF-pS-EPFGRDLL
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 F33A	MIRSA-pS-EPFGRDLL
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 E35A	MIRSF-pS-APFGRDLL
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 F37A	MIRSF-pS-EPAGRDLL
C-Raf ₍₂₅₄₋₂₆₄₎ pS259	RQRST-pS-TPNVH
C-Raf ₍₂₅₄₋₂₆₄₎ pS233,pS259	QHRY-pS-TPHAFTFNTSSPSSEGLS-QRQRST-pS-TPNVH
FAM-C-Raf ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259	FAM-QHRY-pS-TPHAFTFNTSSPSSEGLSQRQRST-pS-TPNVH
FAM-C-Raf ₍₂₅₄₋₂₆₄₎ pS259	FAM-RQRST-pS-TPNVH
FAM-C-Raf ₍₂₂₉₋₂₃₈₎ pS233	FAM-QHRY-pS-TPHAF
FAM-C-Raf ₍₂₅₂₋₂₆₄₎ pS259	FAM-SQRQRST-pS-TPNVH
FAM-C-Raf ₍₂₅₂₋₂₆₄₎ pS259,T260E	FAM-SQRQRST-pS-EPNVH
FAM-C-Raf ₍₆₁₄₋₆₂₆₎ pS621	PKINRSA-pS-EPSLH
C-Raf ₍₆₁₈₋₆₂₅₎ pS621	RSA-pS-EPSL

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Peptide.

Die Peptide wurden von Biosyntan (Berlin) oder GenScript (Piscataway, USA) synthetisiert, über HPLC aufgereinigt und über Massenspektrometrie analysiert. Sie lagen als lyophilisiertes TFA-Salz mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ vor.

3.1.12. Medien für die Kultivierung von *E.coli*

Die Medien wurden mit ddH₂O hergestellt und bei 121 °C und 2,1 bar autoklaviert. Danach wurden die entsprechenden Antibiotika in der angegebenen Konzentration dazu gegeben (siehe Tabelle 4). Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C.

LB-Flüssigmedium	10 g × l ⁻¹ Bacto-Trypton 10 g × l ⁻¹ NaCl 5 g × l ⁻¹ Hefeextrakt pH 7,2 mit NaOH
LB-Agarplatten	10 g × l ⁻¹ Bacto-Trypton 10 g × l ⁻¹ NaCl 5 g × l ⁻¹ Hefeextrakt 16 g × l ⁻¹ Bacto-Agar pH 7,2 mit NaOH
TB-Flüssigmedium	12 g × l ⁻¹ Bacto Trypton 24 g × l ⁻¹ Hefeextrakt 0,4 % (v/v) Glycerin 2,31 g × l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 12,54 g × l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ pH 7,2 mit NaOH
SOB-Flüssigmedium	5 g × l ⁻¹ Hefeextrakt 20 g × l ⁻¹ Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 6,8 -7,0
SOC-Flüssigmedium	SOB-Medium 20mM Glucose

Antibiotikum	Konzentration ($\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ Medium)
Ampicillin	100
Chloramphenicol	34
Kanamycin	30
Tetracyclin	12,5

Tabelle 4: Antibiotikakonzentrationen.

3.1.13. Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit ddH₂O hergestellt.

Anodenpuffer	200 mM Tris
Biacore-Puffer	10 mM HEPES 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 0,05 % Tween20 pH 7,5
Blocking-Puffer	5 % (w/v) Milcpulver in TBS-T
Dialysepuffer	25 mM HEPES 100 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 4 mM 2-ME pH 7,5 mit NaOH
DNS-Probenpuffer (5x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 30 % (v/v) Glycerin
<i>E. coli</i> -Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,0 300 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin 10 mM Imidazol 2 mM 2-ME 1 mM PMSF

Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8,0 300 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin 250 mM Imidazol 2 mM 2-ME
Gel-Entfärbelösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Gel-Färbelösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 1 g × l ⁻¹ Coomassie Brillant Blau R250 1 g × l ⁻¹ Coomassie Brillant Blau G250
Gelpuffer	3 M Tris 3 g × l ⁻¹ SDS pH 8,45 mit HCl
HBS-T-Puffer	10 mM HEPES 150 mM NaCl pH 7,4 0,1 % (v/v) Tween-20 (frisch dazu) 0,1 % (w/v) BSA (frisch dazu)
ITC-Puffer 6,5	20 mM MES 2 mM MgCl ₂ pH 6,5 mit NaOH
ITC-Puffer 7,5	20 mM MES 2 mM MgCl ₂ pH 7,5 mit NaOH
Kathodenpuffer	100 mM Tris HCl (pH 8,25) 100 mM Tricin 0,1 % (w/v) SDS

Komplexierungspuffer	20 mM HEPES 2 mM MgCl ₂ 2 mM 2-ME pH 7,5
Lysepuffer	25 mM Tris pH 8,0 2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) TritonX-100 0,1 % (v/v) SDS 0,5 mM TCEP Lagerung bei 4 °C
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Proteinprobenpuffer (5x)	0,25 M Tris-HCl pH 8,0 25 % (v/v) Glycerin 7,5 % (w/v) SDS 0,25 mg × ml ⁻¹ Bromphenolblau 7,5 % (v/v) 2-ME
Quench-Puffer	50 mM Tris pH 8,0 100 mM NaCl
TAE (50x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8.3

TB-Puffer	10mM Pipes oder HEPES 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl pH 6,7 mit KOH 55 mM MnCl ₂ sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C
TBS	65 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ pH 7,4
TBS-T	TBS 0,2 % (v/v) Tween20
Towbinpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Waschpuffer	50 mM Tris pH 8,0 500 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin 25 mM Imidazol 2 mM 2-ME

3.1.14. Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	B F^- ompT, hsdS ($r_B^- m_B^-$), dcm^+ Tet^r gal λ (DE3), endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]	Stratagene (La Jolla, USA)
DH5 α	F^- , endA, hsdR17 ($r_k^- m_k^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, s80dlacZ M15	Invitrogen (Karlsruhe)
Rosetta(DE3)pLysS	$F1^-$ ompT hsdS ($r_B^- m_B^-$) gal dcm (DE3) $pLysSRARE^6$ (Cam^r)	Novagen (Madison, USA)
SCS110	rpsL, (Str^r), thr, leu, endA, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI q Z Δ M15].	Stratagene (La Jolla, USA)
XL10 Gold	Tet^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsd-SMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI q Z Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]	Stratagene (La Jolla, USA)

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

3.1.15. Säugerzelllinien

Bezeichnung	Organismus	Gewebe/Morphologie	Bezugsquelle
HEK293	<i>H.sapiens</i>	Nierenepithelzellen, transformiert mit Adenovirus 5-DNS	MPI für molekulare Physiologie
HEK293T	<i>H.sapiens</i>	Nierenepithelzellen, transformiert mit Adenovirus 5-DNS, stabil transfiziert mit dem SV40 <i>Large T-Antigen</i> (TAg)	MPI für molekulare Physiologie
Cos-7	<i>C.aethiops</i>	Nierenfibroblasten, transformiert mit SV40	MPI für molekulare Physiologie
K-562	<i>H.sapiens</i>	Knochenmark, Lymphoblasten	Cell Lines Service (Eppelheim)

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Säugerzelllinien.

3.1.16. Plasmide

Für die heterologe Expression der humanen 14-3-3-Proteine in *E. coli* wurde der Vektor pProEXHTb eingesetzt (siehe Abbildung A.1 im Anhang). Für die heterologe Expression humaner Proteine in Säugerzellen wurden verschiedene Vektoren verwendet (siehe Tabelle 7 und Abbildung A.2 im Anhang). Die in dieser Arbeit mit molekularbiologischen Methoden (3.2) erstellten Konstrukte sind der Tabelle 17 im Anhang zu entnehmen.

Bezeichnung	Expression in	Bezugsquelle
pProEXHTb	<i>E. coli</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
pEGFP-C1	Säugerzellen	Clontech (Mountain View, USA)
pEGFP-N1	Säugerzellen	Clontech (Mountain View, USA)
pmCherry-C1	Säugerzellen	Clontech (Mountain View, USA)
pOPINE(c)Cherry	Säugerzellen	DPF (Dortmund)
pCMV-HA	Säugerzellen	Corinna Ottmann

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Leervektoren.

3.1.17. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von *Eurofins MWG Operon* synthetisiert und mittels der HPSF^(R)-Methode aufgereinigt. Eine ausführliche Liste der verwendeten Oligonukleotide ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 18).

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. PCR

Um ein Gen oder einen Teil eines Gens zu vervielfältigen wurde eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987).

Vor der Kettenreaktion findet eine Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNS statt, sodass sie anschließend einzelsträngig vorliegt. Hierfür wird die Temperatur auf 95°C erhöht.

Jeder Zyklus der PCR besteht aus drei Schritten mit unterschiedlichen Funktionen. Zuerst findet eine kurze Denaturierung bei 95°C statt (meist 30 s). Als nächstes findet bei abgesenkter Temperatur (50-60°C) die Anlagerung der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNS statt. Während der Elongation kann eine hitzestabile DNS-Polymerase

bei der für sie optimalen Temperatur (65-72°C) die DNS in 5'-3' Richtung vom Oligonukleotid aus synthetisieren. Die oben beschriebenen Schritte werden mehrmals hintereinander durchgeführt (25-40 mal). So kann eine exponentielle Vervielfältigung der DNS erreicht werden. Der in dieser Arbeit verwendete „illustra Hot Start Master Mix“ beinhaltet neben dem notwendigen Puffer und Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) eine *Taq* DNS-Polymerase, die aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermus aquaticus* stammt. Diese Polymerase hat ein Temperatur-Optimum von 72°C.

Der in dieser Arbeit verwendete Reaktionsansatz, wurde wie folgt hergestellt:

Oligonukleotid 5' (100 μ M)	1 μ l
Oligonukleotid 3' (100 μ M)	1 μ l
Matrizen-DNS (100-300ng \times μ l ⁻¹)	1 μ l
ddH ₂ O	22 μ l
illustra Hot Start Master Mix	25 μ l

Die PCR wurde in einem *Thermocycler* mit folgendem Programm durchgeführt:

94 °C	2:00 min	
<hr/>		
94 °C	1:00 min	
55 °C	1:00 min	30 Zyklen
72 °C	2:30 min	
<hr/>		
72 °C	10:00 min	
4 °C	Pause	

3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Analyse von biologischen Makromolekülen nach ihrer Größe. In einem Agarose-Gel, das an eine Stromquelle angeschlossen ist, wandern die negativ geladenen DNS-Moleküle zur Anode. Die Porengröße des Gels ist abhängig von der Agarose-Konzentration. Große Moleküle wandern bei gleicher Spannung langsamer durch das Gel als kleine, da sie auf einen größeren Widerstand treffen. Auf diese Weise können gleich geladene Moleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dafür wurde die Agarose in TAE-Puffer (3.1.13) aufgekocht, 1:10000 mit SYBR® Safe DNA Gel Stain versetzt und anschließend in die entsprechende Gelkammer gegossen. Die ausgehärteten Gele waren ungefähr 0,5 cm hoch und 5 cm lang.

Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden 1:5 mit DNS-Probenpuffer (3.1.13) gemischt und der komplette Ansatz auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten 10 μl einer 100 bp- oder 1 kbp-DNA-Leiter. Die Auftrennung wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht analysiert und die gewünschte Bande ausgeschnitten.

3.2.3. Aufreinigung von DNS aus einem Agarosegel

Zur Aufreinigung der DNS-Moleküle aus dem Agarosegel wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ modifiziert verwendet. Die ausgeschnittene DNS-Bande wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und dieses mit Puffer *QG* aufgefüllt. Zur Auflösung des Gels wurde diese Mischung in einem Thermoschüttler bei 50 °C für 5 min unter Schütteln inkubiert. 750 μl dieser Lösung wurden auf eine *QIAquick spin*-Säule aufgetragen, die in ein 2 ml Reaktionsgefäß gestellt wurde. Die Säule wurde mit 12000 g 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die komplette Lösung auf die Säule aufgetragen war. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 500 μl Puffer PE gewaschen und jeweils 45 Sekunden (s) bei 12000 g zentrifugiert. Nach dem Trocknen der Säule mit 12000 g für 2 min wurde die DNS mit 30 μl Puffer EB eluiert.

3.2.4. Restriktionsverdau

Jeweils ein μg der aufgereinigten DNS beziehungsweise Plasmid-DNS wurden mit 20 U Restriktionsenzym in einem Reaktionsvolumen von 50 μl 12-16 Stunden bei 37°C verdaut. Hierbei wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Puffermengen eingesetzt. Wann immer möglich wurde ein Doppelverdau durchgeführt. War dies nicht möglich, so wurde die DNS nach dem ersten Verdau aufgereinigt (3.2.3) und dann der zweite Verdau durchgeführt. Plasmid-DNS wurde zusätzlich nach dem Restriktionsverdau mit Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) oder Alkalischer Phosphatase (AP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurden zu dem Reaktionsansatz nach dem Restriktionsverdau 2 μl AP oder SAP hinzu gegeben und 30 min bei 37°C im PCR-Block inkubiert. Anschließend wurde die SAP 15 min bei 65°C inaktiviert.

Die restringierten Proben wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2) und Gelextraktion (3.2.3) aufgereinigt.

3.2.5. Ligation

Die restringierten und aufgereinigten DNS-Moleküle wurden mittels *Quick T4 DNA Ligase* in ebenfalls restringierte und aufgereinigte Plasmid-DNS ligiert. Hierfür wurde das „Quick Ligation™ Kit“ verwendet. Die Ligation erfolgte nach Herstellerempfehlung mit 50 ng Plasmid-DNS in einem molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:6 zu aufgereinigtem DNS-Molekül.

3.2.6. Transformation chemisch kompetenter *E.coli*

Kompetente *E.coli* DH5 α oder XL10 Gold (3.3.3) wurden jeweils mit 3 μ l des Ligationsansatzes (3.2.5) transformiert.

Die DNS wurde zu 50 μ l chemisch kompetenten *E.coli* Zellen gegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 1 min bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium und eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C und 450 upm in einem Thermoschüttler. Die Suspension wurde anschließend 1 min bei 12000 g zentrifugiert und das erhaltene Zellsediment auf LB-Agar-Platten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren, ausgestrichen. Die LB-Agar-Platten wurden 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.7. Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS erfolgte aus Einzelkolonien. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft. Die Zellsuspension wurde mindestens sechs Stunden bei 37°C und 140-170 upm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 12000 g geerntet. Die Plasmid-DNS wurde mittels des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits“ isoliert, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht (Birnboim und Doly, 1979). Dabei wurde nach Herstellerempfehlung vorgegangen. Die DNS wurde mit 40 μ l EB-Puffer eluiert.

Für höhere DNS-Ausbeuten und -Konzentrationen wurde das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ verwendet. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft und 12-16 Stunden bei 37°C und 140-170 upm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 3800 g geerntet. Auch hier wurde nach Herstellerempfehlung vorgegangen.

3.2.8. Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNS

Die aromatischen Ringsysteme der Nukleotidbasen absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich somit spektroskopisch die DNS-Konzentration einer Lösung bestimmen.

$$A_{260nm} = E \times l \times c \quad (1)$$

(A_{260nm} = Absorption bei 260 nm, E = molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \times cm^{-1}$), l = Weglänge (cm), c = DNS-Konzentration (M)).

Der durchschnittliche Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNS hat den Wert $E = 0,020 (\mu g \times ml^{-1})^{-1} \times cm^{-1}$. Damit kann man die Konzentration mit der Faustregel abschätzen, dass eine Lösung mit einer DNS-Konzentration von $50 \mu g \times ml^{-1}$ einen Wert von $A_{260nm} = 1$ hat.

Zur Überprüfung der Reinheit der Probe lassen sich durch Messung der Absorption bei 230 und 280 nm die Quotienten 260/230 und 260/280 bilden. Der Quotient 260/230 gibt an, ob die Probe mit Salzen oder organischen Substanzen verunreinigt ist, und sollte nicht größer als 2 sein. Der Quotient 260/280 dagegen dient als Hinweis für eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen. Er sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen.

Zur Bestimmung der DNS-Konzentration wurde das *NanoDrop*-UV-Spektroskop benutzt. Die Absorption von $1 \mu l$ DNS-Lösung wurde gegen $1 \mu l$ ddH₂O gemessen. Außerdem wurden die Quotienten 260/230 und 260/280 bestimmt.

3.2.9. Sequenzierung von Plasmid-DNS

Zur Überprüfung der Sequenz der isolierten DNS wurden Einzelklone mittels Sequenzierung analysiert (Sanger *et al.*, 1977). Dabei handelt es sich um eine PCR, bei der Desoxy- und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zufällig in den neuen DNS-Strang eingebaut werden. Der Einbau eines Didesoxynukleotids führt zu einem Kettenabbruch, da das für die weitere Synthese benötigte 3'-OH nicht vorhanden ist. Dies erzeugt DNS-Stränge unterschiedlicher Länge, die an ihrem 3'-OH-Ende je nach eingebautem Nukleotid unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Die Auftrennung dieser Kettenabbruchprodukte erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Ein Laser regt die fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmente an und die unterschiedlichen Signale werden von einem Detektor aufgenommen. Die Abfolge der detektierten Signale gibt die DNS-Sequenz wieder.

Hierfür wurde die isolierte DNS mittels des „ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits“ analysiert (Perkin Elmer, Überlingen). Dieses Kit

beinhaltet eine AmpliTaq® Polymerase FS, eine Variante der *Thermus aquaticus* Polymerase, die zusätzlich eine Punktmutation aufweist, die die Fähigkeit der Polymerase verringert zwischen Desoxynukleotiden und Didesoxynukleotiden zu unterscheiden. Eine weitere Punktmutation hebt die intrinsische 5'→3'-Nukleaseaktivität der Polymerase auf. Des Weiteren beinhaltet das Kit die Desoxynukleotide dATP, dCTP, dTTP und dUTP sowie die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Oligonukleotid (5' <u>oder</u> 3', (5 μM))	1 μl
isolierte DNS	250-350 ng
Terminator-Mix	3 μl
ddH ₂ O	ad 20 μl

Mit dem Reaktionsansatz wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

96 °C	30 s	
<hr/>		
96 °C	30 s	
50 °C	15 s	25 Zyklen
60 °C	4 min	
<hr/>		
4 °C	Pause	

Um die erhaltenen PCR-Produkte ethanolisch zu fällen (Eickbush und Moudrianakis, 1978) wurden 2 μl 125 mM EDTA (pH=8), 2 μl 3 M Na-Acetat und 55 μl 100 %iges Ethanol zum Reaktionsansatz gegeben. Die Probe wurde gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen des Sediments wurden 75 μl 75 %iges Ethanol hinzugegeben und nochmals 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die DNS an der Luft getrocknet. Die Sequenzanalyse erfolgte, wie oben beschrieben, am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund mittels eines 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems Foster City, USA).

Die erhaltenen DNS-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software *ClustalW* Software ausgewertet (Larkin *et al.*, 2007; Goujon *et al.*, 2010)

3.2.10. Zielgerichtete Mutagenese

In dieser Arbeit wurde die *QuickChange*®-Methode angewendet, um eine spezifische Mutation in ein Plasmid einzubringen.

Bei dieser PCR wurden in dieser Arbeit Oligonukleotide verwendet, die den Austausch von 1-3 Basen beinhalten, was bei der Proteinbiosynthese zum Austausch einer einzelnen

AS führt. In diesem Fall wird sowohl ein 5'- als auch ein 3'-Oligonukleotid benötigt. Während der PCR lagern sich beide an die Zielsequenz des Plasmids an und die DNS wird von beiden Oligonukleotiden ausgehend synthetisiert. Auf diese Weise wird das vollständige Plasmid während der PCR amplifiziert.

Im Gegensatz zu der eingesetzten Plasmid-DNS, die aus *E.coli* isoliert wurde und daher methyliert vorliegt, ist die während der PCR synthetisierte DNS nicht methyliert. Diese Tatsache kann man sich zu Nutze machen, um die eingesetzte Plasmid-DNS-Matrize aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Das Restriktionsenzym DpnI verdaut spezifisch methylierte DNS an der Erkennungssequenz 5'-GAmTC-3', wobei das Adenosin (A) methyliert (Am) ist.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Oligonukleotid 5'	125 ng
Oligonukleotid 3'	125 ng
Plasmid-DNS	50-100 ng
dNTPs	1 μ l
<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5 μ l
<i>Pfu</i> -Polymerase	2,5 U
ddH ₂ O	ad 50 μ l

Mit dem Reaktionsansatz wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

95 °C	2:00 min	
<hr/>		
95 °C	1:00 min	
55 °C	1:00 min	30 Zyklen
72 °C	2:00 min/kb	
<hr/>		
72 °C	20 min	
4 °C	Pause	

Anschließend wurden 1.5 μ l (30 U) DpnI zum Ansatz gegeben und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit 3 μ l dieser Lösung wurden 50 μ l kompetenter *E.coli* transformiert (3.2.6). Sowohl die Isolierung als auch die Sequenzierung der Plasmid-DNS erfolgten wie jeweils unter 3.2.7 und 3.2.9 beschrieben.

3.3. Mikrobiologische Methoden

3.3.1. Kultivierung von *E.coli*

E.coli wurden auf LB-Agar, in LB- oder in TB-Flüssigmedium bei 37 °C 6-16 Stunden kultiviert. Flüssigkulturen wurden zudem bei 140-160 upm geschüttelt.

3.3.2. Bestimmung der Zelldichte von *E.coli*

Die Zelldichte von *E.coli* wird über die optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Dabei gilt als Näherung, dass 1×10^9 *E.coli*-Zellen eine $OD_{600} = 1$ aufweisen.

1 ml einer *E.coli*-Kultur wurden in einer Plastikkuvette mit 1 cm Durchmesser in einem BioPhotometer (Eppendorf) gegen 1 ml Medium gemessen. War der gemessene OD_{600} -Wert größer als 1,0, wurde die Probe so weit verdünnt, dass der OD_{600} -Wert zwischen 0,1 und 0,9 lag.

3.3.3. Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Damit *E.coli* Zellen mit Plasmid-DNS durch einen Hitzeschock transformiert werden können (3.2.6), müssen die Zellen zunächst chemisch kompetent gemacht werden. Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* wurde ein Protokoll von Inoue *et al.* (1990) angewendet. Jeweils 100 μ l chemisch kompetenter Zellsuspension wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.4. Lagerung transformierter *E.coli*

Um transformierte *E.coli* über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden 0,5 ml einer LB- oder TB-Flüssigkultur mit 0,5 ml Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Kultivierung von Säugerzellen

HEK293-, HEK293T- und Cos-7-Zelllinien. Die humanen Zelllinien HEK293 und HEK293T unterscheiden sich dadurch, dass die HEK293T-Zelllinie zusätzlich mit dem SV40 *Large T* Antigen stabil transfiziert ist. Dies ermöglicht die episomale (also nicht chromosomale) Replikation von transfizierten Plasmiden und eine verlängerte Expression der entsprechenden Genprodukte. Da die beiden Zelllinien abgesehen davon identisch sind, können sie unter den gleichen Bedingungen kultiviert werden. Auch die Cos-7-Zelllinie wurde unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5 % CO_2 in 10 cm-Schalen in DMEM kultiviert, das mit $4,5 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Glucose, $584 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ L-Glutamin und $110 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ Na-Pyruvat angereichert war und jeweils frisch mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (englisch: *fetal calf serum*, FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U Penicillin und $0,1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ Streptomycin versetzt wurde.

Zur Passagierung wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,05 % (v/v) Trypsin-EDTA von der Oberfläche gelöst. Die gelösten Zellen wurden zusammen mit 4 ml DMEM 3 min bei 110 g zentrifugiert, anschließend in 5-6 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (3.4.2). Für die Kultivierung wurden 5×10^5 oder 1×10^6 Zellen in 10 ml frischem Medium ausgesät und bis zur nächsten Passage 3-4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden bis Passagenzahl 30 verwendet.

K-562-Zellen. K-562-Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in T75-Flaschen unter sterilen Bedingungen in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 2 mM L-Glutamin angereichert war und jeweils frisch mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 U Penicillin und $0,1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ Streptomycin versetzt wurde.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen zunächst gezählt (3.4.2). Da es sich um Suspensionszellen handelt, war keine Ablösung notwendig. Lag die Zellzahl höher als 1×10^6 Zellen pro ml ($Z \times \text{ml}^{-1}$), wurde die gesamte Kultur 3 min bei 110 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml PBS resuspendiert und $1 \times 10^5 Z \times \text{ml}^{-1}$ als neue Kultur in Medium wie oben beschrieben ausgesät und bis zur nächsten Passage 3-4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden bis Passagenzahl 30 verwendet.

3.4.2. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Kammer verwendet (siehe Abbildung 3.1). Die Tiefe der Neubauer-Kammer beträgt 0,1 mm und besteht aus neun großen Quadraten mit einer Seitenlänge von 0,2 mm. Daraus ergibt sich pro Quadrat ein Fläche von $0,04 \text{ mm}^2$, was bei der angegebenen Tiefe einem Volumen von $0,004 \mu\text{l}$ entspricht. Es wurden jeweils die vier Eckquadrate, die aus 16 Einzelquadraten bestehen, ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Um die Zellzahl pro μl zu berechnen, wurde die erhaltene Zahl mit 10^4 multipliziert.

3.4.3. Lagerung von Säugerzellen

Um Säugerzellen langfristig zu lagern, wurden die Zellen wie unter 3.4.1 beschrieben von der Kulturschale gelöst. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen jedoch nicht in PBS sondern in 5 ml frischem Medium resuspendiert, das wie unter 3.4.1 beschrieben angereichert und zusätzlich mit 10 % DMSO versetzt war. Jeweils 1 ml wurde in Kryoröhrchen überführt und dieses zunächst drei Tage bei -80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter inkubiert. Nach drei Tagen erfolgte die Überführung in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff.

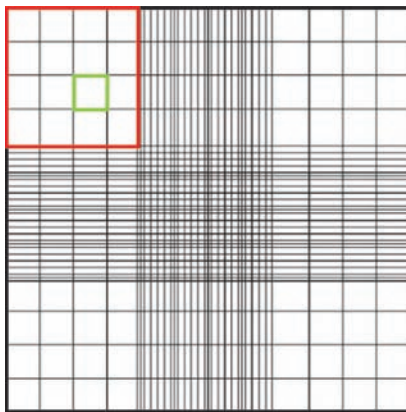


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer. Das Zählnetz einer Neubauer-Zählkammer ist in neun große Quadrate mit einer Seitenlänge von 0,2 mm aufgeteilt (rote Umrandung). Daraus ergibt sich eine Fläche von 0,04 mm². Die großen Quadrate sind zur besseren Übersicht in 16 kleine Quadrate aufgeteilt (grüne Umrandung). Abbildung modifiziert nach LO-Laboroptik (2012).

Aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen wieder in Kultur genommen, indem sie zunächst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt nach dem Auftauen in 9 ml frischem Medium resuspendiert wurden. Anschließend wurden sie 3 min bei 110 g zentrifugiert, in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in in einer 10 cm-Schale wie unter 3.4.1 beschrieben kultiviert.

3.4.4. Transfektion von Säugerezellen

Aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer Größe ist der spontane Eintritt von DNS in eukaryotische Zellen ineffizient. Daher bedarf es der Möglichkeit diesen Vorgang effizienter zu gestalten. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Technologien entwickelt, wie zum Beispiel die Transfektion mittels Polykationen, Calciumphosphat, Liposomen, Retroviren oder die Einführung der DNS in die Zelle mittels Mikroinjektion, Elektroporation oder Protoblastenfusion (Kawai und Nishizawa, 1984; Loyter *et al.*, 1982; Cepko *et al.*, 1984; Neumann *et al.*, 1982; Schaffner, 1980). Da jede Zelllinie unterschiedliche Eigenschaften aufweist, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zur Transfektion mit unterschiedlichen Reagenzien behandelt.

Transfektion von HEK293-Zellen mit kationischen Lipiden. Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde das Effectene[®]-Transfektionskit verwendet. Dieses beruht auf kationischen Lipiden, die Mizellen bilden, welche sich wiederum an die negativ geladene DNS anlagern und sie somit umschließen. Dadurch wird die negative Ladung der DNS abgeschirmt. Die so entstandenen DNS-Mizellkomplexe haben eine schwach positive Ladung und können sich an die Zellmembran anlagern. Die Aufnahme der DNS erfolgt endocytotisch (Friend *et al.*, 1996; Zuhorn *et al.*, 2002).

Für die Weiterverwendung von HEK293-Zellen für die konfokale Mikroskopie (3.4.8) wurden in einer 24-*well*-Platte 1×10^5 Zellen pro *well* auf 12 mm-Deckgläser ausgesät und nach ungefähr 24 Stunden mit folgendem Protokoll transfiziert. 250 ng DNS wurden in 50 μl EC-Puffer verdünnt. Zu dieser Lösung wurde 1 μl *Enhancer* pipettiert. Die Lösung wurde 1 s mittels eines Vortexers gut gemischt und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden 5 μl Effectene[®]-Reagenz dazugegeben, 10 s lang mittels eines Vortexers gründlich gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Das Medium der am Vortag ausgesäten Zellen wurde gegen 1 ml frisches Medium ausgetauscht und außerdem 350 μl frisches Medium zu der DNS-Effectene[®]-Lösung gegeben und gemischt. Diese Lösung wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese sechs Stunden wie oben beschrieben (3.4.1) kultiviert. Danach wurde das Medium gegen 1 ml frisches Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 16-48 Stunden kultiviert, bevor sie konfokalmikroskopisch untersucht wurden (3.4.8).

Transfektion von HEK293T mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Das „Mammalian-Transfection-Kit“ basiert auf der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitations-Methode. Bei dieser Transfektionsmethode wird DNS mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, das aus CaCl_4 und Na_3PO_4 gebildet wird, co-präzipitiert. Dieses Präzipitat sinkt auf die Oberfläche von adhärennten Zellen herab und wird von diesen durch Endocytose aufgenommen (Loyter *et al.*, 1982; Batard *et al.*, 2001).

Zur Weiterverwendung von transfizierten HEK293T-Zellen für Zelllysate (3.4.5) und Immunoblots (3.4.6) wurden in einer 6-*well*-Platte 5×10^5 Zellen pro *well* ausgesät und nach 24 Stunden mit folgendem Protokoll transfiziert. Pro *well* wurden 300 ng DNS (3 μl einer $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ -Lösung) eingesetzt. Diese wurde mit je 270 μl ddH₂O verdünnt und 30 μl Lösung 1 aus dem „Mammalian-Transfection-Kit“ hinzugeben. Die Lösung wurde gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 μl Lösung 2 aus dem „Mammalian-Transfection-Kit“ dazu gegeben, gut gemischt und 20-30 min bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde auf die am Vortag ausgesäten Zellen getropft. Acht Stunden nach der Transfektion wurden das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 16 Stunden kultiviert, bevor sie wie unter 3.4.5 beschrieben geerntet und lysiert wurden.

Zur Weiterverwendung von transfizierten HEK293T-Zellen für die konfokale Mikroskopie (3.4.8) wurden in einer 24-*well*-Platte 6×10^4 Zellen pro *well* auf 12 mm-Deckgläser ausgesät und nach 24 Stunden wie oben beschrieben transfiziert. Allerdings wurden pro *well* nur 100 ng DNS (1 μl einer $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ -Lösung) eingesetzt. Diese wurde mit je 45 μl ddH₂O verdünnt und 5 μl der Lösung 1 hinzugeben. Anschließend wurde wie oben

beschrieben gemischt und inkubiert und danach 50 μl Lösung 2 hinzu gegeben. Diese gut gemischte und wie oben inkubierte Lösung wurde auf die am Vortag ausgesäten Zellen getropft. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen jeweils mit 1 ml PBS gewaschen und weitere 16 Stunden in frischem Medium kultiviert (3.4.1), bevor diese konfokalmikroskopisch untersucht wurden (3.4.8).

Transfektion von HEK293T-Zellen mit kationische Lipiden. Zur Transfektion von HEK293T-Zellen mit kationischen Lipiden wurde das FuGENE[®]-Transfektionsreagenz verwendet.

Zur Weiterverwendung von transfizierten HEK293T-Zellen für Zelllysate (3.4.5) und Immunoblots (3.4.6) wurden in einer 6-*well*-Platte 5×10^5 Zellen pro *well* ausgesät und nach 24 Stunden Kultivierung mit folgendem Protokoll transfiziert. Pro *well* wurden 85 μl serumfreies Medium mit 5 μl FuGENE[®]-Transfektionsreagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde jeweils 1 μg DNS (10 μl einer $100 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ -Lösung) dazugegeben, nochmals gut gemischt und 20 min bei RT inkubiert, bevor die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde. Ungefähr 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht und die Zellen weitere 16-24 Stunden kultiviert, bevor sie wie unter 3.4.5 beschrieben geerntet und lysiert wurden.

Zur Weiterverwendung von transfizierten HEK293T-Zellen für konfokale Mikroskopie (3.4.8) wurden in einem 8-Kammer-Deckglas $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer ausgesät und nach 24 Stunden wie oben beschrieben transfiziert. Allerdings wurden pro *well* nur 80 ng DNS (4 μl einer $20 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ -Lösung) eingesetzt. Dazu wurden 5,6 μl serumfreies Medium mit 0,4 μl FuGENE[®]-Transfektionsreagenz gemischt und anschließend wie oben beschrieben vorgegangen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen jeweils mit 200 μl PBS gewaschen und weitere 16-24 Stunden in frischem Medium kultiviert (3.4.1), bevor sie konfokalmikroskopisch untersucht wurden (3.4.8).

Transfektion von Cos-7-Zellen mit Polykationen. Cos-7-Zellen wurden in dieser Arbeit mit dem „GeneJammer Transfektionsreagenz“ transfiziert. Dieses besteht aus Polyaminen, die zu den Polykationen gehören. Die zelluläre Aufnahme von DNS mittels Polykationen beruht auf der Komplexbildung von negativ geladener DNS mit den Polykationen. Daraufhin liegt dies als positiv geladener Komplex vor, der an die negativ geladenen Proteoglykane der Zellmembran adsorbieren kann. Die DNS-Kation-Komplexe werden endocytotisch von den Zellen aufgenommen und die DNS durch Lyse der Endoso-

men ins CP freigesetzt (Ogris und Wagner, 2002; Thomas und Klibanov, 2003; Sonawane *et al.*, 2003).

Zur Weiterverwendung von transfizierten Cos-7-Zellen für konfokale Mikroskopie (3.4.8) wurden in einer 24-*well*-Platte 6×10^4 Zellen pro *well* auf 12 mm-Deckgläser ausgesät und nach 24 Stunden transfiziert. Je *well* wurden $27 \mu\text{l}$ serumfreies Medium mit $1,2 \mu\text{l}$ GeneJammer Transfektionsreagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 ng DNS dazu gegeben, gemischt und nochmals 30 min bei RT inkubiert, bevor die Lösung auf die Zellen getropft wurde.

Transfektion von K-562-Zellen mit Polykationen. K-562-Zellen wurden mit dem „jetPEI™-Transfektionsreagenz“ transfiziert. Dabei handelt es sich um Polyethylenimin (PEI), das in wässriger Lösung als Polykation vorliegt. Somit basiert das Prinzip der DNS-Aufnahme auf den gleichen Vorgängen wie zuvor für das „GeneJammer Transfektionsreagenz“ beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1×10^5 Zellen in 0,5 ml Medium (siehe 3.4.1) in ein *well* einer 24-*well*-Platte ausgesät. $2 \mu\text{g}$ DNS wurden in einer 150 mM NaCl-Lösung auf $50 \mu\text{l}$ verdünnt. $4 \mu\text{l}$ des jetPEI™-Transfektionsreagenz wurden ebenfalls in einer 150 mM NaCl-Lösung auf $50 \mu\text{l}$ verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte jetPEI™-Lösung zu der verdünnten DNS-Lösung gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde auf die zuvor ausgesäten Zellen getropft und diese weitere 48 Stunden wie beschrieben (3.4.1) kultiviert.

Da es sich um Suspensionszellen handelt, ist eine konfokalmikroskopische Untersuchung der Zellen nicht ohne Weiteres möglich. Zu diesem Zweck müssen die Zellen möglichst vorsichtig auf einen Objektträger aufgebracht, fixiert und mit einem Deckglas verschlossen werden. Die transfizierten Zellen wurden dafür 3 min bei 1000 g zentrifugiert und in 2 ml *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) aufgenommen. 1 ml dieser Zellsuspension wurde mittels einer Cytospinapparatur 3 min bei 1700 upm auf einen Objektträger zentrifugiert. Überschüssiger Puffer wurde entfernt und die Zellen mit einem *PAP-Pen* eingekreist bevor sie mit $200 \mu\text{l}$ 4 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS, das frisch angesetzt wurde, für 15 min bei RT fixiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen mit $200 \mu\text{l}$ PBS für 15 min bei RT gewaschen und die Probe anschließend mit einem Tropfen FluorSave™ und einem 12 mm Deckglas verschlossen. Die Probe wurde mindestens 24 Stunden im Dunkeln getrocknet, bevor sie am konfokalen Mikroskop untersucht wurde.

3.4.5. Herstellung von Zelllysat

Um Zelllysate aus transfizierten oder nicht transfizierten Zellen herzustellen, wurden die Zellen in der 6-well-Platte zunächst auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml eiskaltem TBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit jeweils 150 μ l eiskaltem Lysepuffer lysiert, zu dem „Phosphatase Inhibitor Cocktail I und II“ im Verhältnis 1:100 dazu gegeben wurden. Daraufhin wurden die Zellreste mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 20 min bei 31000 g und 4 °C zentrifugiert.

Um die Gesamtproteinkonzentration näherungsweise bestimmen zu können, wurde ein Bradford-*Assay* durchgeführt (siehe unten). Zu den Lysatproben wurden jeweils 35 μ l 5 \times -Proteinprobenpuffer gegeben, gemischt und mindestens 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Diese Proben konnten entweder direkt verwendet oder bei -20 °C für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

Bradford Assay. Der Bradford-Proteinassay macht sich die Eigenschaften von Coomassie-Brillant-Blau G-250 zu Nutze (Bradford, 1976). Dieser Farbstoff adsorbiert an positiv geladene und hydrophobe Seitenketten von AS. Bei niedrigem pH-Wert resultiert dies in einer Absorptionsverschiebung von 470 nm (rote Lösung) zu 595 nm (blaue Lösung). Da diese Verschiebung direkt mit der Proteinkonzentration korreliert, kann diese darüber bestimmt werden.

Um eine Kalibrierungskurve zu erhalten wird eine Verdünnungsreihe mit einem Referenzprotein, zum Beispiel Rinderserumalbumin (englisch: *bovine serum albumin*, BSA), gemessen und die erhaltenen Absorptionswerte bei 595 nm anschließend gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die Funktion, die sich aus dem linearen Teil dieser Kurve ergibt, kann verwendet werden, um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen. Die Absorption der Probe sollte ebenfalls einen Wert im linearen Bereich der Kalibrierungskurve aufweisen, also in etwa zwischen 0,1 und 1,0 liegen.

3.4.6. Immunblot

Die Zelllysateproben wurden zur weiteren Analyse über ein Tris-Tricin-Gel (3.6.1) gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979).

Hierfür wurden das Tris-Tricin-Gel und die Nitrocellulose-Membran nach der Elektrophorese 20 min bei RT unter Schütteln in Towbin-Puffer äquilibriert. Insgesamt vier

Lagen Gel-blotting Papier wurden in Towbin-Puffer getränkt und anschließend eine vertikale Versuchsanordnung in einem SemidryBlot-Gerät aufgebaut (siehe Abbildung 3.2). Der Transfer fand bei 280 mA für 20 min statt.

Um den Proteintransfer zu überprüfen wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Daraufhin wurde die Membran mit Wasser entfärbt und freie unspezifische Bindestellen auf der Membran mit Blocking-Puffer eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln gesättigt. Danach wurde die Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß

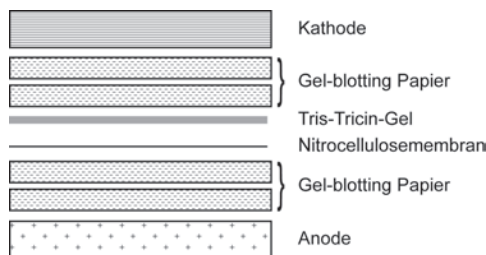


Abbildung 3.2: Vertikale Versuchsanordnung für einen Immunblot im SemidryBlot-Gerät.

überführt und 12-16 Stunden bei 4°C in einem Rotator bei 15 upm mit dem ersten Antikörper behandelt. Die jeweilige Antikörperkonzentration ist im Ergebnisteil angegeben.

Nach der Behandlung mit dem ersten Antikörper wurde die Membran dreimal je 10 min mit 10 ml TBS-T gewaschen und anschließend mit dem zweiten, an

alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörper, für zwei Stunden bei RT inkubiert. Dieser wurde anschließend durch dreimaliges, zehnminütiges Waschen mit 10 ml TBS-T und zweimaliges, zehnminütiges Waschen mit 10 ml TBS gründlich entfernt und die durch die Antikörper markierten Banden mit BCIP/NBT, dem Substrat der AP, angefärbt (De Jong *et al.* (1985) und Abbildung A.3 im Anhang).

3.4.7. Immunfärbung

Im Gegensatz zur Transfektion, bei der ein Gen heterolog exprimiert wird, kann man mittels der Immunfärbung die Lokalisation endogener Proteine sichtbar machen. Dabei werden Zellen zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert, damit ein Antikörper auch an Proteine im CP binden kann. Anschließend werden unspezifische Bindestellen ähnlich wie beim Immunblot (3.4.6) mit einer Proteinlösung gesättigt. Daraufhin findet die Bindung des Antikörpers statt, der entweder direkt markiert ist, oder durch einen zweiten markierten Antikörper detektiert wird. Da viele Waschschriffe stattfinden ist es sinnvoll, das Deckglas, auf dem die Zellen wachsen sollen, mit einem Polymer zu beschichten, sodass eine bessere Anhaftung der Zellen an das Trägermaterial erreicht wird.

Dafür wurden 12 mm Deckgläser zunächst zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und daraufhin mit 1 ml einer 1:10 in PBS verdünnten Poly-L-Lysin-Lösung 10 min bei RT be-

handelt. Danach wurde das Deckglas zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und bei RT vollständig getrocknet.

Auf die so beschichteten Deckgläser wurden in 24-*well*-Platten 1×10^5 Zellen HEK293-Zellen ausgesät und wie oben beschrieben mit Effectene[®] transfiziert (3.4.4).

Zur Immunfärbung wurden die Zellen jeweils mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 10 min mit $150 \mu\text{l}$ 4% (v/v) Paraformaldehyd in PBS, das frisch angesetzt wurde, fixiert. Das Paraformaldehyd wurde durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Quench-Puffer entfernt und freie Aldehydgruppen durch Inkubation für 5 min mit 1 ml Quench-Puffer reduziert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 0,1% (v/v) Triton[®]X-100 in PBS 15 min bei RT permeabilisiert. Dann wurden sie dreimal jeweils mit 1 ml PBS gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in PBS 5 min bei RT inkubiert. Unspezifische Bindestellen wurden mit jeweils 1 ml 5% (w/v) BSA in PBS für 30 min bei RT gesättigt. Danach wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper (anti-Raf-1 (C-12), siehe Tabelle 2), 1:50 in 1% (w/v) BSA in PBS für eine Stunde bei RT und vor Licht geschützt behandelt. Danach wurde fünfmal mit 1 ml PBS gewaschen, bevor das Deckglas mit Fluorsave[™] auf einem Objektträger befestigt wurde. Derartige Proben wurden lichtgeschützt gelagert und frühestens nach 24 Stunden im Konfokalmikroskop untersucht.

3.4.8. Konfokale Lasermikroskopie

Bei der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie werden die Fluorophore einer gesamten Probe angeregt (siehe Abbildung 3.3A). Das detektierte Licht stammt zudem aus der Emission aller ober- und unterhalb der Fokusebene liegenden Fluorophore und ergibt damit eine Abbildung mehrerer Schichten, was zu einer insgesamt reduzierten Auflösung entlang der optischen Achse z führt.

Um die z -Auflösung zu erhöhen, kann man das Anregungslicht in der Fokusebene zu einem Punkt bündeln, wie es bei der Punkt-Raster-Mikroskopie der Fall ist (siehe Abbildung 3.3B). Somit werden nur die Fluorophore in der Fokusebene angeregt, die sich im Fokuspunkt des Lichts befinden. Trotzdem wird bei dieser Methode auch die Fluoreszenz der Moleküle detektiert, die sich im Lichtstrahl befinden, also ober- und unterhalb der Fokusebene. Durch die zusätzliche Verwendung einer Lochblende vor dem Detektor, die nur das aus der Fokusebene emittierte Licht durchlässt, kann die Fluoreszenz, die ober- und unterhalb der Fokusebene entsteht, abgeschirmt werden (siehe Abbildung 3.3C). Dadurch wird die Auflösung weiter erhöht. Da in diesem Fall Anregungs- und Detektionsfokus übereinander liegen, spricht man von konfokaler Mikroskopie.

Die in dieser Arbeit erzeugten mikroskopischen Bilder wurden mittels eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (engl. *confocal laser scanning microscope* CLSM) erstellt. Es wurde ein Leica TCS SP2 Mikroskop verwendet, das mit einem Argon-Laser, einem GreNe-Laser und einem HeNe-Laser ausgestattet ist, und ein Öl-Objektiv mit 63x-Vergrößerung verwendet. Für die Untersuchung lebender Zellen, wurden die Ø12 mm-Deckgläser auf denen die Zellen ausgesät und transfiziert wurden (3.4.4) in eine Leica-Kammer eingespannt und mit HBSS oder DMEM ohne Phenolrot (mit $4,5 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Glucose, 25 mM HEPES und $3,7 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ NaHCO_3) überschichtet. Die Untersuchung fand für kurze Zeiträume bei RT, für längere Messungen bei 37°C und 5% CO_2 statt. Zellen in 8-Kammer-Deckgläsern wurden ebenfalls mit HBSS oder DMEM ohne Phenolrot überschichtet und direkt untersucht.

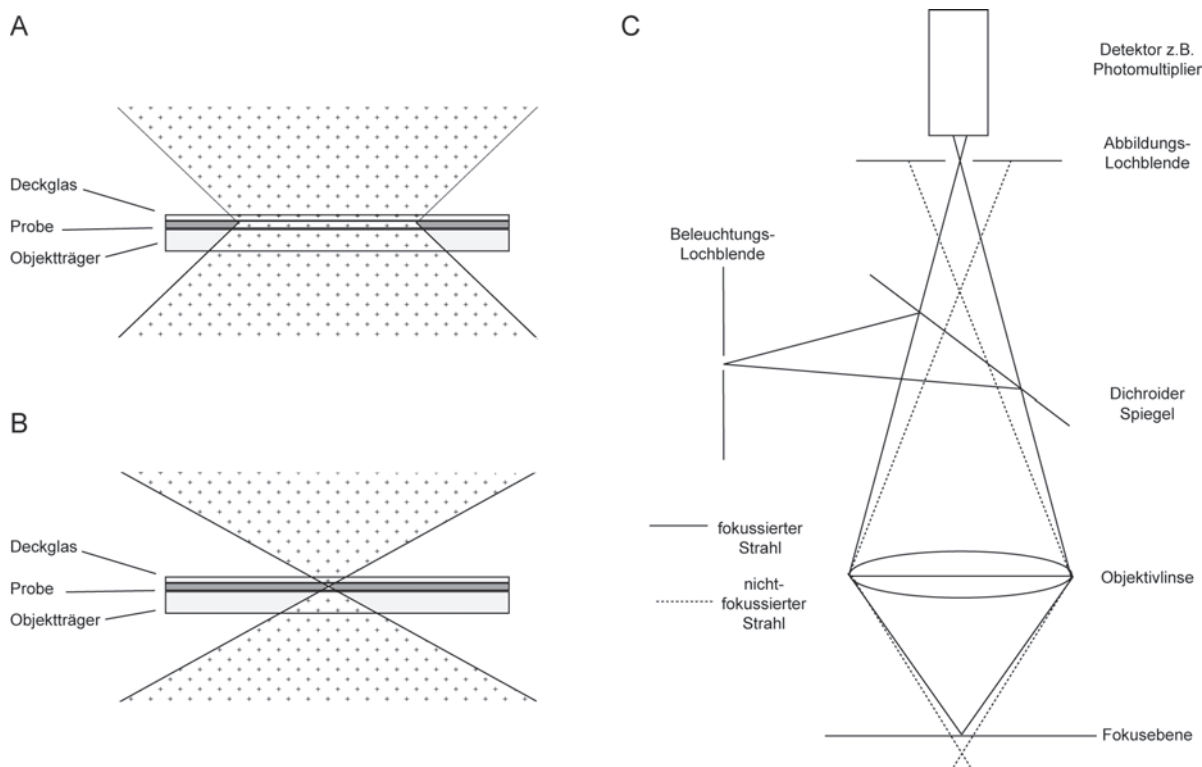


Abbildung 3.3: Verschiedene Formen der Fluoreszenzmikroskopie. (A) Weitefeld-Fluoreszenzmikroskopie. Die gesamte Probe wird in der Fokusebene angeregt. Somit wird auch die Emission vieler Fluorophore detektiert. (B) Punkt-Raster-Mikroskopie. Durch Bündelung des Lichtstrahls wird nur ein Punkt der Probe in der Fokusebene angeregt. Allerdings werden auch Fluorophore ober- und unterhalb der Fokusebene angeregt und deren Emission detektiert. (C) Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Durch die zwei Lochblenden wird nur fokussiertes Licht detektiert. Abbildung modifiziert nach Shotton und White (1989).

3.5. Proteinaufreinigung

3.5.1. Proteinexpression in *E.coli*

Für die Expression humaner 14-3-3-Proteine wurden *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS entweder frisch mit dem Expressionsplasmid transformiert (3.2.6) oder LB-Medium mit Antibiotikum direkt mit einer Glycerinkultur angeimpft (3.3.4). Wobei die Glycerinkultur aus bereits transformierten *E.coli* bestand.

Das Expressionsplasmid enthält vor der Sequenz des zu exprimierenden Gens einen induzierbaren Promotor. Dadurch kann die Expression des Gens durch Zugabe von IPTG zur Expressionskultur induziert werden. Die Kultivierung der *E.coli* erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben in 5l-Erlenmeyerkolben, die jeweils 2,5l TB-Medium und das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten. Die Proteinexpression wurde bei einer $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ mit 0,4 mM IPTG induziert und erfolgte 12-16 Stunden bei 20 °C und 140 upm. Die Zellen wurden durch 15 min Zentrifugation bei 2900 g und 10 °C geerntet und in 50 ml *E.coli*-Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

3.5.2. Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellen (3.5.1) wurden nach Zugabe von 100 μ l DNase I (10 mg \times ml⁻¹-Lösung) pro 5l-Expressionskultur 3-4 mal durch einen *Fluidizer* gegeben. Dort werden die Zellen durch den hohen Druck in Verbindung mit dem schmalen Kapillardurchmesser, was große Scherkräfte auf die Zellen ausübt, zum Platzen gebracht und somit lysiert.

Das Rohlysate wurde anschließend mit 64000 g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Zellextrakt, also der Überstand nach der Zentrifugation, der die löslichen Zellbestandteile enthielt, wurde wie unter 3.5.3 erläutert weiterverwendet.

3.5.3. Affinitätschromatographie

Durch die Klonierung in den pProEXHTb-Vektor waren die humanen 14-3-3-Gene auf DNS-Ebene an einen sogenannten His-*Tag* fusioniert (3.1.16 und A.2.2). Nach der Expression in *E.coli* lagen sie daher als His6-14-3-3-Fusionsproteine vor. Der His-*Tag* kann über die Imidazolgruppen der Histidinreste Ni²⁺-Ionen komplexieren. Über Ni²⁺-Ionen, die an Nitrotriessigsäure (NTA)-Agarose-Kügelchen komplexiert sind, kann aus einem Zellextrakt das fusionierte Protein spezifisch angereichert werden. Durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol, kann das Protein daraufhin von dem Ni-NTA-Material eluiert werden.

Für die Aufreinigung wurde eine *Äkta-Purifier*-FPLC-Anlage verwendet, die mit einem Druck von maximal 5 bar betrieben wurden. Weiterhin wurde eine 30 ml Ni-NTA-Säule eingesetzt, die mit dem dreifachen Säulenvolumen (SV) *E. coli*-Lysepuffer (3.1.13) und einer Flussrate von $4 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ äquilibriert wurde. Anschließend wurde der Zell-extrakt (3.5.2) mit $2\text{-}4 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ Flussgeschwindigkeit auf die Säule auftragen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und später mittels SDS-PAGE (3.6.1) auf Rückstände des rekombinanten Proteins untersucht. Danach wurde die Säule mit 20 SV Waschpuffer (3.1.13) bei $4\text{-}5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ gewaschen, um eventuell unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Im Anschluss daran wurde das Protein mit drei SV Elutionspuffer eluiert. Während der gesamten Aufreinigung wurde die UV-Absorption nach der Ni-NTA-Säule bei 280 nm, detektiert, um Aufschluss über den Proteingehalt der Lösungen zu geben.

3.5.4. Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein Filtrationsverfahren, mit dem sich makromolekulare Substanzen und kleine Partikel aus einem Medium abtrennen und konzentrieren lassen. In dieser Arbeit wurde eine Methode angewendet, bei der eine Proteinlösung auf eine Filtermembran gegeben und anschließend zentrifugiert wird. Das Protein bleibt bei der Zentrifugation oberhalb des Filters, während der Puffer durch die Filtermembran gedrückt wird.

Um das Volumen der eluierten Proteinprobe zu reduzieren, wurden Amicon Ultrafiltrationsröhrchen mit einem Größenausschluss (MWCO) von 30.000 Da verwendet. Die mit Proteinlösung beladenen Röhrchen wurden mit 3800 g bei 4°C zentrifugiert, bis das Volumen auf 3-4 ml reduziert war.

3.5.5. Dialyse

Der Dialyse liegt das Prinzip der Osmose zugrunde. Hierbei sind zwei Flüssigkeiten mit unterschiedlich hoch konzentrierten Molekülen durch eine semi-permeable Membran getrennt. Moleküle, die klein genug sind die Poren der Membran zu passieren, gleichen den Konzentrationsunterschied aus. So kann die Dialyse verwendet werden, um die Pufferbedingungen einer Proteinlösung zu ändern beziehungsweise unerwünschte Moleküle wie zum Beispiel Imidazol aus der Lösung zu entfernen.

In dieser Arbeit wurden Dialysekassetten mit einem Größenausschluss (MWCO) von 30.000 Da und einem Volumen von 3 ml verwendet. Die konzentrierte Proteinlösung wurde in die Dialysekassette gegeben und in 2 l Dialysepuffer bei 4°C unter leichtem Rühren

der Lösung auf einem Magnetrührer 12-16 Stunden dialysiert. Danach wurde der Dialysepuffer gegen 2l frischen Dialysepuffer ausgetauscht und es wurde nochmals bei 4°C unter leichtem Rühren der Lösung auf einem Magnetrührer für zwei Stunden dialysiert.

3.5.6. Abspaltung des His-Tags

Wie bereits erwähnt, wurden die humanen 14-3-3-Proteine als Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Für die Kristallisation der 14-3-3 Δ C-Proteine ist der His-Tag hinderlich, da er keine Sekundärstruktur ausbildet und daher am N-Terminus flexibel bleibt. Diese Beweglichkeit stört die Ausbildung von Proteinkristallen. Daher war es notwendig den N-terminalen His-Tag abzuspalten. Zwischen dem His-Tag und dem 14-3-3-Protein befindet sich ein *Linker*, der die Erkennungssequenz der TEV-Protease beinhaltet.

TEV-Protease ist die allgemeine Bezeichnung für die 27 kDa große Domäne des *Nuclear Inclusion a* (NIa)-Proteins, das vom *Tobacco Etch Virus* (TEV) exprimiert wird. Die TEV-Protease erkennt ein lineares Epitop mit der allgemeinen Sequenz E-X-X-Y-X-Q (G/S), wobei X jede AS sein kann und zwischen Q und G beziehungsweise Q und S geschnitten wird. Die optimale Erkennungssequenz lautet ENLYFQG und die optimale Reaktionstemperatur der TEV-Protease liegt bei 34°C. Allerdings ist das Enzym auch bei 4°C und 20°C aktiv. Dabei ist zu beachten, dass das Enzym bei 4°C dreimal weniger aktiv ist als bei 20°C und die Reaktionszeiten daher angepasst werden müssen.

Zu der konzentrierten Proteinlösung wurden 2 mg TEV-Protease gegeben, gemischt und 12-16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde mittels SDS-PAGE (3.6.1) überprüft und die TEV-Protease und der His-Tag über präparative Gelfiltration (3.5.7) aus der Proteinlösung entfernt.

3.5.7. Präparative Gelfiltration

Die Größenausschlusschromatographie ist eine Form der Flüssigchromatographie, bei der Makromoleküle entsprechend ihrer Größe, speziell ihres hydrodynamischen Radius aufgetrennt werden. Wird als flüssige Phase eine wässrige Lösung verwendet, spricht man von Gelfiltration.

Die Auftrennung der Makromoleküle hängt hierbei von ihrer Fähigkeit ab, durch kleine poröse Kügelchen der Matrix zu diffundieren. Je kleiner das Molekül ist, desto größer ist seine Verweildauer in der Matrix und umso später wird es eluiert. Moleküle, die größer sind als die Poren der Matrixkügelchen, diffundieren nicht in diese hinein und werden mit dem Ausschlussvolumen eluiert. Der gesamte Auftrennungsprozess findet in einem

SV Puffer statt, der unter konstantem Druck und konstanter Geschwindigkeit über die Säule gegeben wird.

Das zur Auftrennung verwendete Matrix-Material muss bestimmte Eigenschaften aufweisen. Es sollte aus Kügelchen bestehen, die chemisch inert und zudem chemisch und physikalisch stabil sind. In dieser Arbeit wurde Sepharose™ als Gelfiltrations-Matrix verwendet. Dabei handelt es sich um eine hoch verzweigte Agarose-Matrix mit kovalent gebundenen Dextranketten. Die Größe einer Gelfiltrationssäule wird in Durchmesser und Länge in cm in dem Format Ø/l angegeben. Weiterhin wird zwischen unterschiedlichen Auftrennungsgraden unterschieden. Zum Beispiel wird Superdex 75 (S75) für Proteine im Größenbereich von 3-70 kDa verwendet (bezogen auf globuläre Proteine). Wohingegen Superdex 200 (S200) für Proteine im Größenbereich von 10-600 kDa eingesetzt wird.

Für die Aufreinigung der humanen 14-3-3-Proteine, die unter physiologischen Bedingungen als Dimer mit einer Größe von etwa 60 kDa vorliegen, wurden S75-Säulen verwendet. Abhängig von der Proteinmenge wurde bis ungefähr 40 mg Protein eine 16/60- und bei mehr als 40 mg Protein eine 26/60-Säule verwendet. Die Säule wurde mit einem SV Dialysepuffer (3.1.13) und einer Flussrate von 1 ml (16/60) beziehungsweise 2 ml (26/60) pro min äquilibriert. Anschließend wurde die konzentrierte Proteinlösung (3.5.4) 10 min mit 31.000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Auftrennung fand bei 0,5 ml (16/60) oder 1 ml (26/60) pro min statt. Die Absorption bei 280 nm wurde detektiert und 1 ml oder 2 ml Fraktionen gesammelt. Für die Gelfiltration wurde eine *Äkta-Explorer*-FPLC-Anlage verwendet und mit einem Druck von maximal 5 bar betrieben. Die UV-Absorption bei 280 nm wurde nach der Säule detektiert. Proben des Eluats wurden mittels SDS-PAGE (3.6.1) auf ihre Reinheit überprüft. Reine Proben wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (3.5.4) auf das gewünschte Volumen und die gewünschte Konzentration eingengt.

3.5.8. Lagerung von Protein

Um die 14-3-3-Proteine über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden 10 µl-, 30 µl- und 50 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.6. Proteinanalytische Methoden

3.6.1. SDS-Gel Elektrophorese

Ebenso wie die Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2) wird die SDS-Gelelektrophorese verwendet, um Moleküle wie zum Beispiel Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Da das Gel aus polymerisiertem Acrylamid besteht, spricht man in diesem Fall auch von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Da Proteine unter physiologischen Bedingungen zumeist gefaltet oder partiell gefaltet vorliegen, ist es notwendig sie zu denaturieren. Die Denaturierung durch Natriumdodecylsulfat (englisch: *sodium dodecyl sulfate*, SDS) und Hitze überführt die Proteine in eine lineare Form und erleichtert einen Größenvergleich. Die Denaturierung mittels SDS sorgt zudem dafür, dass das gesamte Protein eine netto negative Ladung erhält. Somit können verschiedene Proteine bei gleicher (negativer) Ladung nach ihrer Größe aufgetrennt werden, indem sie in einem Spannungsfeld zum positiven Pol wandern. Auch hier wandern kleine Moleküle in einer bestimmten Zeit weiter als größere. Um Proteine zwischen 10 kDa und 100 kDa aufzutrennen, wurde ein 12%iges Acrylamid-Gel verwendet.

Es wurde ein Puffersystem nach Schägger und von Jagow (1987) modifiziert verwendet: Nach jedem Schritt der Proteinaufreinigung (3.5.2 und 3.5.3) wurde eine Probe genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Nach dem Zellaufschluss (3.5.2), der Zentrifugation (3.5.2) und der Auftragung auf die Affinitätschromatographiesäule (3.5.3) wurden jeweils 10 μl Probe mit 10 μl 5x-Proteinprobenpuffer (3.1.13) gemischt und mit Dialysepuffer ein Volumen von 50 μl eingestellt. Von dem Eluat nach der Affinitätschromatographie (3.5.3) wurden jeweils 20 μl Probe mit 8 μl 5x-Proteinprobenpuffer gemischt und wie vorher ein Volumen von 40 μl eingestellt. Jeweils 10 μl dieser Proben wurden über ein 12%iges Tricin-Gel (siehe Tabelle 8) aufgetrennt. Nach der Gelfiltrati-

12 % Tricin-Gel		
	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
Acrylamid	0.5 ml	3.9 ml
Gelpuffer	0.38 ml	2.5 ml
ddH ₂ O	2.1 ml	3.2 ml
10 % APS in ddH ₂ O	50 μl	100 μl
TEMED	5 μl	10 μl

Tabelle 8: Tris-Tricin-Gel.

on (3.5.7) wurden jeweils 40 μl Probe mit 10 μl 5x-Proteinprobenpuffer gemischt. Jeweils 10 μl dieser Proben wurden über ein 12%iges Tricin-Gel aufgetrennt. Um die Reinheit eines konzentrierten Proteins zu bestimmen, wurde die Probe mit Dialysepuffer und 5x-Proteinprobenpuffer auf $1\ \mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$ verdünnt und anschließend 2,5 μg , 5 μg und 10 μg mittels SDS-PAGE analysiert. Als Größenstandard wurden zusätzlich 10 μl des Roti®-Mark 10-150-Standards auf jedes Gel aufgetragen, der für Proteine mit einer Größe von 10-150 kDa geeignet ist.

Die Gelelektrophorese wurde bei 60 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in Gel-Färbelösung (3.1.13) mit Coomassie Brillant Blau R250 für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln gefärbt. Danach wurde mittels Gel-Entfärbelösung (3.1.13) für eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln entfärbt.

3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration eines aufgereinigten Proteins bietet sich die UV-Spektroskopie an. Die Absorption des Proteins wird bei 280 nm gemessen und anschließend die Proteinkonzentration unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt:

$$A_{280nm} = E \times l \times c \quad (2)$$

(A_{280nm} = Absorption bei 280 nm, E = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), l = Weglänge (cm), c = Proteinkonzentration (M))

Der Extinktionskoeffizient ist für jedes Protein unterschiedlich und hängt von der verwendeten Wellenlänge ab. Im Falle von Proteinen bezieht er sich auf eine Wellenlänge von 280 nm und kann aus der Aminosäuresequenz berechnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde er mittels der Software *ProtParam* berechnet (Gasteiger *et al.*, 2005).

Diese Software verwendet folgenden Algorithmus (Edelhoch, 1967; Gill und von Hippel, 1989; Pace *et al.*, 1995):

$$E(\text{Protein}) = \text{Anzahl}(Y) \times E(Y) + \text{Anzahl}(W) \times E(W) + \text{Anzahl}(C) \times (C) \quad (3)$$

(für Proteine in Wasser bei 280 nm gemessen gilt: $E(Y) = 1490$, $E(W) = 5500$, $E(C) = 125$)

Da reduzierte und oxidierte Cysteine bei 280 nm unterschiedlich absorbieren, errechnet der oben genannte Algorithmus zwei Werte (siehe Gleichung 3). Der eine Wert geht davon aus, dass alle Cysteine (C) im Protein oxidiert vorliegen. Der andere Wert basiert auf der Annahme, dass alle Cysteine im Protein reduziert sind. Da das Protein im Dialysepuffer

in Gegenwart des Reduktionsmittels 2-ME vorlag, wurde davon ausgegangen, dass alle Cysteine im Protein reduziert vorlagen. Daher wurde der zweite angezeigte Wert für den molaren Extinktionskoeffizienten verwendet. Obwohl die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten für Proteine zuverlässig ist, die Tryptophan-Reste beinhalten, kann es dennoch bei der Berechnung für Proteine ohne Tryptophan-Rest zu einem Fehler von mehr als 10 % kommen (Gasteiger *et al.*, 2005).

Die zu messende Proteinlösung wurde mindestens 10 min mit 31.000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das für die Messung verwendete *NanoDrop*-UV-Spektroskop wurde mit 2 μ l ddH₂O initialisiert und die Absorption der Proteinlösung gegen 2 μ l Dialysepuffer (3.1.13) gemessen. Falls die gemessene Konzentration größer als 90 mg/ml war, wurde die Messung mit im Verhältnis 1:2 in Dialysepuffer verdünntem Protein wiederholt.

3.7. Biochemische und biophysikalische Methoden

3.7.1. Isothermale Titrationskalorimetrie

Unter Kalorimetrie versteht man die Messung von Wärmemengen, die durch biologische, chemische oder physikalische Prozesse entstehen. Diese Prozesse können exotherm oder endotherm sein, also Wärme abgeben oder aufnehmen. Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie (englisch: *isothermal titration calorimetry*, ITC) wird die Energie gemessen, die notwendig ist um den Unterschied zwischen einer Messzelle, in der die Reaktion stattfindet, und einer Referenzzelle auszugleichen (Wiseman *et al.*, 1989). Da dieser Vorgang in einem adiabatischen Mantel stattfindet, spricht man von isothermen Bedingungen.

In Abbildung 3.4A ist der schematische Aufbau eines ITC-Instruments dargestellt. Durch ein komplexes Rückkopplungssystem wird der Temperaturunterschied zwischen der Mess- und der Referenzzelle fortwährend gemessen und möglichst klein gehalten. Wird nun ein Reaktant A mittels einer Spritze, die gleichzeitig als Rührer dient, auf einen Reaktant B titriert, muss der durch die Reaktion entstehende Temperaturunterschied durch das System ausgeglichen werden. Die hierfür benötigte Energie ist gleichzeitig das Messsignal. Bei einer endothermen Reaktion wird Wärme aufgenommen. Es muss also Energie zugeführt werden, um die Messzelle auf die gleiche Temperatur zu bringen wie die Referenzzelle, und das gemessene Signal ist daher positiv. Bei exothermen Prozessen verhält es sich genau umgekehrt. Da Wärme frei wird, wird weniger Energie benötigt,

um die Messzelle bei einer bestimmten Temperatur zu halten als die Referenzzelle. Somit ist der gemessene Wert negativ.

In Abbildung 3.4B ist das Ergebnis einer typischen ITC-Messung eines exothermen Prozesses dargestellt. Der obere Graph zeigt als direktes Messsignal die aufgebrachte Energie, um den verursachten Temperaturunterschied zur Referenzzelle auszugleichen. Dieser Energieaufwand ist in Mikrokalorien pro Sekunde ($\mu\text{cal}/\text{sec}$) gegen die Zeit in Minuten (min) aufgetragen. Nach jeder Injektion wird das thermische Gleichgewicht wieder hergestellt. Somit ist die durch Integration berechnete Fläche eines jeden Ausschlags die aufgewendete Energie pro Injektion. Im unteren Graphen ist die auf die molare Menge des injizierten Reaktanten A normalisierte Energie gegen das molare Verhältnis der Reaktanten A und B in der Messzelle aufgetragen.

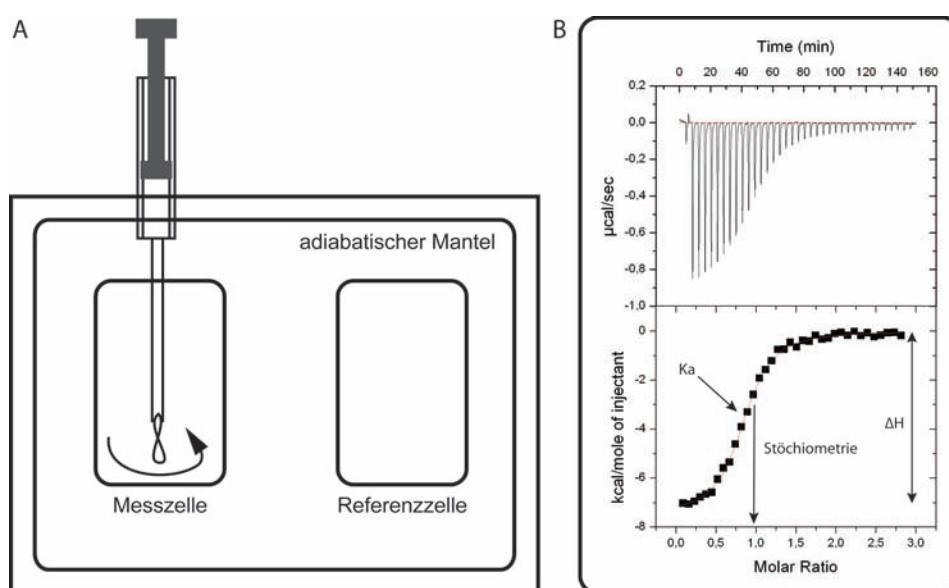


Abbildung 3.4: Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC). Schematischer Aufbau eines ITC-Geräts (A). Über eine Spritze, die auch als Rührer dient, wird ein Reaktant A in eine Messzelle mit Reaktant B injiziert. Da dies in einem adiabatischen Mantel geschieht, kann die exakte Wärmedifferenz zur Referenzzelle detektiert und ausgeglichen werden. Die zum Wärmeausgleich aufgewendete Energie wird gegen die Zeit in Minuten (min) aufgetragen (B). Die Flächen der Injektionsausschläge werden integriert und gegen das molare Verhältnis der Reaktanten A und B aufgetragen. Abbildung modifiziert nach Velázquez-Campoy *et al.* (2004).

Durch nichtlineare Regression lassen sich drei Parameter bestimmen. Der Y-Achsenabschnitt gibt die Enthalpieänderung (ΔH) der Reaktion an. Am Wendepunkt der Kurve lässt sich die Stöchiometrie (N) ablesen. Des weiteren lässt sich aus der Steigung der Kurve die Gleichgewichtskonstante der Reaktion (K) bestimmen. Mit diesem Wert kann man die Änderung der freien Enthalpie (ΔG), auch Gibbs-Energie genannt, unter An-

wendung folgender Gleichung bestimmen:

$$\Delta G = -RT \times \ln K \quad (4)$$

Anhand der freien Enthalpieänderung (ΔG) und der Enthalpieänderung (ΔH) kann man nun anhand der Gibbs-Helmholtz-Gleichung die Entropieänderung (ΔS) der Reaktion bestimmen:

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad (5)$$

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ITC-Messungen wurden mit dem VP-ITC Gerät von MicroCal durchgeführt. Für die Messungen wurde ein 14-3-3-Protein mit dem jeweiligen Phosphopeptid titriert. Hierfür wurde das ITC-Gerät auf einen Referenzwert von 30 °C eingestellt. Das 14-3-3-Protein wurde gegen ITC-Puffer 6,5 oder 7,5 dialysiert und bei einer Konzentration von 50 μM in dem entsprechenden ITC-Puffer auf 29 °C erwärmt und entgast. Die synthetischen Phosphopeptide wurde käuflich erworben und lagen lyophilisiert vor. Sie wurden mit einer Konzentration von 10 mM in ddH₂O gelöst und diese Lösung mit erwärmtem und entgastem ITC-Puffer auf 500 μM verdünnt. Anschließend wurde das 14-3-3 Protein bei 30 °C mit 8 μl großen Aliquots des Phosphopeptids titriert. Die 300 μl des Phosphopeptids in der Spritze reichten dabei für etwa 35 Injektionen aus. Zwischen jeder Injektion lagen 120 s, um dem System Zeit zu geben das thermische Gleichgewicht wieder herzustellen. Um unspezifische Effekte wie zum Beispiel die Lösungswärme des Phosphopeptids identifizieren zu können, wurden die Messungen jeweils als Pufferkontrolle wiederholt. Dabei wurde die Messung wie oben beschrieben wiederholt, aber jeweils nur ITC-Puffer auf 14-3-3 Protein oder Phosphopeptid auf ITC-Puffer titriert. Erst nach Abzug der erhaltenen Wärmeänderungen, wurden die Daten ausgewertet.

Die mathematische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *Origin7* (OriginLab, Northampton, USA). Um die Assoziationskonstante (K_A), die molare Bindungsstöchiometrie (N) und die molare Bindungsenthalpie (ΔH) zu bestimmen, wurde von einem einfachen Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle ausgegangen. Der K_D wurde mit $1/K_A$ aus dem K_A -Wert berechnet.

3.7.2. Fluoreszenzpolarisation

Regt man einen Fluorophor mit polarisiertem Licht an, so emittiert er auch polarisiertes Licht. Dieses Phänomen wird Fluoreszenzpolarisation (FP) genannt. Bewegt sich der Fluorophor jedoch in der Zeit seiner Fluoreszenzlebensdauer, also zwischen Anregung

und Emission, so ist das emittierte Licht nicht mehr vollständig polarisiert. Damit ergibt sich eine proportionale Abhängigkeit zwischen der Fluoreszenzpolarisation und der Rotationsrelaxationszeit eines Moleküls. Die wird wiederum durch die Viskosität des Mediums (η), die Temperatur (T), das Molekülvolumen (V) und die Gaskonstante (R) bestimmt und ist bei konstanter Temperatur und Viskosität direkt proportional zum Molekülvolumen.

$$\text{Rotationsrelaxationszeit} = \frac{3V\eta}{RT} \quad (6)$$

Diese Tatsache kann man sich bei der Untersuchung von Bindungsvorgängen zu Nutze machen. Markiert man ein kleines Molekül A mit einem Fluorophor und beobachtet die Bindung an ein großes Molekül B, so wird bei Bindung von A an B in der Regel eine Zunahme der Polarisation zu beobachten sein (siehe Abbildung 3.5).

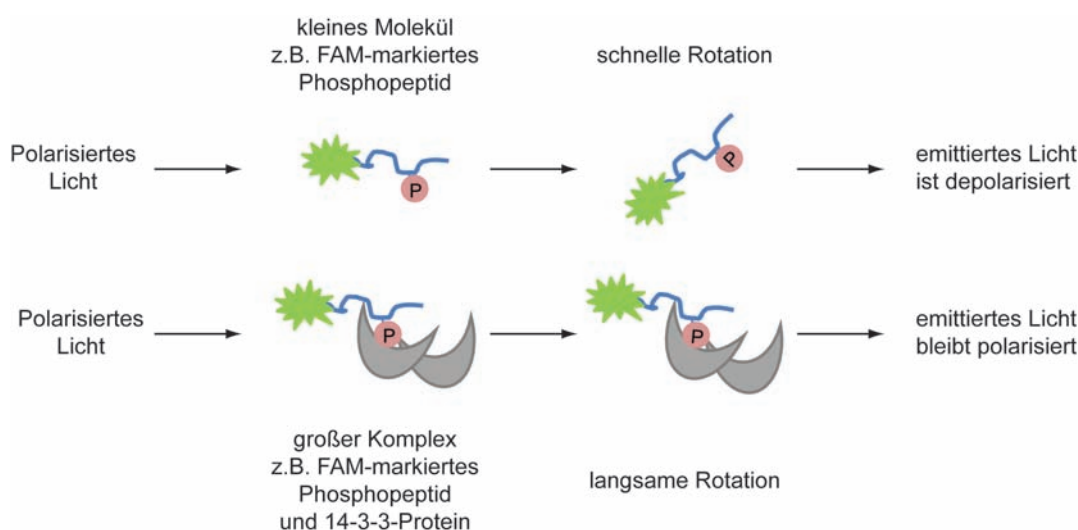


Abbildung 3.5: Schematische Abbildung eines Fluoreszenzpolarisationsversuchs. Wird ein kleines fluoreszierendes Molekül mit polarisiertem Licht angeregt, kann es sich in der Zeit zwischen Anregung und Emission schnell bewegen und das emittierte Licht ist depolarisiert. Bindet ein kleines fluoreszierendes Molekül an ein großes nicht fluoreszierendes Molekül, so bildet sich ein großer fluoreszierender Komplex. Dieser bewegt sich in der Zeit zwischen Anregung und Emission des Fluorophors nur wenig und das emittierte Licht bleibt polarisiert. Somit erlaubt die Polarisation des emittierten Lichts einen Rückschluss auf eine mögliche Komplexbildung. Abbildung modifiziert nach Lakowicz (2006).

Im Versuchsaufbau wird eine fluoreszente Probe mit polarisiertem Licht angeregt und das emittierte Licht nach einem zweiten Polarisator detektiert. Dieser wird einmal parallel und einmal senkrecht zum ersten Polarisator ausgerichtet und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten gemessen. Das Verhältnis der mit paralleler (I_{\parallel}) und mit senkrechter Ausrichtung (I_{\perp}) gemessenen Intensitäten gibt Aufschluss darüber, wie sich die fluoreszente Probe verhält.

Mathematisch betrachtet ist die Polarisation (P) die Differenz von (I_{\parallel}) und (I_{\perp}) normalisiert auf die Summe von (I_{\parallel}) und (I_{\perp}).

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (7)$$

Aus den Intensitätswerten lässt sich außerdem die Anisotropie (r) berechnen. Diese ist mathematisch betrachtet die Differenz der Intensitäten des parallel und des senkrecht polarisierten emittierten Lichts normalisiert auf die Gesamtintensität (I_T) des senkrecht und parallel polarisierten Lichts.

$$I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad (8)$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (9)$$

Durch die Normalisierung auf die Gesamtintensität ist die Verwendung des Anisotropiewerts über der des Polarisationswerts zu bevorzugen. Insbesondere in komplexen Systemen, in denen es mehr als eine emittierende Spezies gibt, ist die Anisotropie mathematisch leichter zu handhaben als die Polarisation.

Theoretisch können in zwei Extremfällen Anisotropie- und Polarisationswert gleich sein. Wenn die Emission vollständig polarisiert ist, also $I_{\perp} = 0$ ist, gilt $P = r = 1$. Ist die Emission dagegen vollständig depolarisiert, also $I_{\parallel} = I_{\perp}$ so ist $P = r = 0$. Für alle zwischen diesen beiden Extremen liegenden Werte sind P und r nie gleich, lassen sich aber mit folgenden Formeln in einander umrechnen.

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad (10)$$

$$r = \frac{2P}{3-P} \quad (11)$$

Bei der Messung ist zu beachten, dass sich die Sensitivitäten (S) des Detektionssystems oft für vertikal und senkrecht polarisiertes Licht unterscheiden. Daher sollte zusätzlich auch immer der G-Faktor bestimmt werden.

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (12)$$

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (13)$$

(I_{VV} = gemessener Wert für I_{\parallel} , I_{VH} = gemessener Wert für I_{\perp})

Unter Verwendung von Gleichung 13 kann sich das tatsächliche Verhältnis von I_{\parallel} zu I_{\perp} bestimmen lassen (Lakowicz, 2006; Invitrogen, 2006).

In dieser Arbeit wurde 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Fluorophor für FP-Messungen eingesetzt. Das zu untersuchende FAM-markierte Phosphopeptid wurde in HBS-T-Puffer auf 20 nM verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 10 μl pro *well* in einer 384-*well*-Platte vorgelegt. HBS-T-Puffer ohne FAM-markiertes Phosphopeptid wurde als Negativkontrolle verwendet. In das erste *well* wurden zusätzlich je 8 μl 20 nM Peptid und 2 μl unverdünntes 14-3-3-Protein gegeben und gemischt. Anschließend wurde die Platte 1 min bei 230 g zentrifugiert, um eventuell durch das Mischen entstandene Luftblasen zu entfernen. Nachfolgend wurde von dem ersten *well* an eine 1:1 Verdünnungsreihe über 22 *wells* pipettiert und die in der Pipette verbleibenden 10 μl verworfen. Ein *well*, das nur FAM-markiertes Phosphopeptid enthielt, aber kein 14-3-3-Protein, diente als Referenz für die Fluoreszenzpolarisation des ungebundenen Peptids und zur Bestimmung des G-Faktors. Daraufhin wurde nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert und die Messung in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite[®]500 durchgeführt. Dabei wurde mit weißem Licht unter Verwendung eines Filters mit 485 ± 10 nm angeregt und die Emission bei $535 \pm 12,5$ nm gemessen. Es wurde ein dichroitischer Spiegel verwendet, der bei 510 nm durchlässig war. Der G-Faktor wurde aus den FP-Werten der Referenzproben bestimmt und die Referenzpolarisation auf 35 mP festgelegt. Die Integrationszeit betrug 50 μs . Die Messergebnisse wurden mit der Software *Prism* (GraphPad) ausgewertet. Zur nichtlinearen Regression wurde folgende Gleichung verwendet, deren Herleitung unter A.3 im Anhang ausführlich dargestellt ist:

$$Y = r_f + ((r_b - r_f) \times \left(\frac{X}{K_D + X}\right)) \quad (14)$$

(Y = gemessener Anisotropiewert, X = 14-3-3-Proteinkonzentration, r_f = Anisotropiewert des freien Phosphopeptids (kleinster gemessener Y -Wert), r_b = Anisotropiewert des gebundenen Phosphopeptids (größter gemessener Y -Wert), K_D = Dissoziationskonstante des untersuchten Gleichgewichts, welche dem X -Wert beim halbmaximalen Y -Wert entspricht.)

Um den stabilisierenden Effekt eines Moleküls zu quantifizieren, wird die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) bestimmt. Um den EC_{50} von Cotylenin A (CNA) an den C-RAF/14-3-3-Komplex zu bestimmen, wurde dieses in Anwesenheit von 14-3-3-Protein auf FAM-markiertes Phosphopeptid titriert. Die Messergebnisse wurden normalisiert und gegen die CNA-Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Mit der

Software *Prism* (GraphPad) wurden die Daten mit nichtlinearer Regression über folgende Gleichung ausgewertet:

$$Y = Top + \frac{Bottom - Top}{1 + 10^{-(\log EC_{50} - X) \times HillSlope}} \quad (15)$$

($X = \log(\text{CNA-Konzentration})$, Y gemessene Anisotropie, Top = größter Y-Wert, $Bottom$ = kleinster Y-Wert, $\log EC_{50}$ = X-Wert bei halbmaximalem Y-Wert, $HillSlope$ = Steigung der Kurve zwischen Y-Wert der größten Konzentration von X und Y-Wert der kleinsten Konzentration von X)

3.7.3. Oberflächenplasmonenresonanz

Oberflächenplasmonenresonanz (englisch: surface plasmon resonance = SPR) bezeichnet eine optische Methode, mit der der refraktorisches Index sehr dünner Schichten, die an Metall adsorbiert sind, gemessen werden kann (Pattniak, 2005). Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass Oberflächenplasmonen (delokalisierte Elektronen im Metall) unter bestimmten Bedingungen durch Photonen angeregt werden können. Ein Plasmon absorbiert dabei ein Photon, das daraufhin in dem reflektierten Licht fehlt. Der Winkel, bei dem dies geschieht hängt hauptsächlich vom refraktorisches Index des Mediums in direkter Nähe der Metallschicht ab.

Abbildung 3.6A zeigt den schematischen Aufbau einer Flusszelle eines SPR-Geräts. Polarisiertes Licht wird durch ein Prisma geleitet und anschließend an einer sehr dünnen Metallschicht, meist aus Gold bestehend, in einem bestimmten Winkel reflektiert. Die Intensität des reflektierten Lichts wird detektiert. Einige Photonen des Lichtstrahls werden von Plasmonen des Metalls absorbiert. Ob ein Plasmon angeregt wird, hängt hauptsächlich von der Beschaffenheit des Mediums auf der gegenüberliegenden Seite der Metallschicht ab. Dort können Moleküle immobilisiert und unter konstanten Flussraten Bindungspartner („Probe“) dazu gegeben werden. Die Immobilisierung von Biomolekülen wie zum Beispiel globulären Proteinen findet häufig über Carboxymethyliertes Dextran (CM5) statt.

Injiziert man nun unter konstanter Flussrate einen Bindungspartner, so kann eine Bindung an das immobilisierte Molekül stattfinden. Dies führt zu einer Massenzunahme. Sobald dies geschieht, ändert sich an dieser Stelle der refraktorisches Index und damit auch der Winkel des emittierten Lichts. Diese Winkeländerung wird in Echtzeit gemessen und als Sensogramm dargestellt (3.6B). Nachdem ein Bindungspartner injiziert wurde, wird anschließend nur der Puffer ohne Bindungspartner injiziert. Dadurch kann bei glei-

cher Flussrate auch die Dissoziation der Bindung gemessen werden. Durch Messung der Assoziations- und Dissoziationsrate (k_a und k_d) kann die Gleichgewichtskonstante K_D bestimmt werden:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (16)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle SPR-Messungen an einem Biacore T100 SPR-Gerät von Malgorzata Skwarczynska durchgeführt. Es wurden CM5-beschichtete Goldchips verwendet und alle Messungen in Biacore-Puffer (3.1.13) bei 25°C durchgeführt. 1736 Resonanzeinheiten (englisch: *response units*, RU) 14-3-3 Protein wurden mit einer Flussrate von $10 \mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$ immobilisiert. Die Flussrate bei der eigentlichen Messung betrug jeweils $30 \mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$. Der Bindungspartner (Phosphopeptid) wurde 1:1 titriert und die Assoziation über einen Zeitraum von 180 s gemessen. Anschließend wurde mit Biacore-Puffer gewaschen und die Dissoziation über einen Zeitraum von 240 s gemessen. Die Oberfläche wurde nach jeder Titration mit 2 M MgCl_2 regeneriert. Unspezifische Effekte wurden als die auf der Referenzzelle detektierten Signale von den Messsignalen abgezogen. Die detektierten Signale (RU) wurden gegen die eingesetzte Peptidkonzentration aufgetragen. Über nichtlineare Regression und der Annahme von Gleichgewichtsbedingungen konnte die apparente Affinität K_D bestimmt werden (siehe A.3 im Anhang).

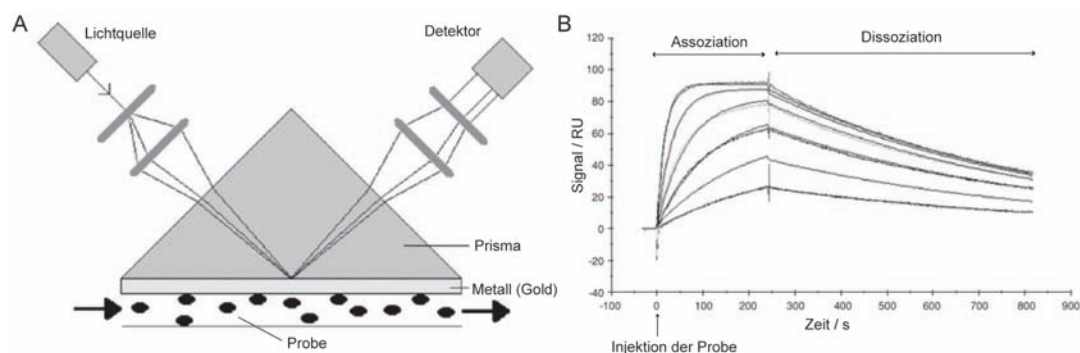


Abbildung 3.6: Oberflächenplasmonenresonanz. (A) Schematische Darstellung einer Flusszelle eines SPR-Geräts mit Detektionseinheit. (B) Typisches Sensogramm einer SPR-Messung. Abbildung modifiziert nach Pattniak (2005).

Zur Bestimmung des EC_{50} -Werts von CNA wurde dieses in Anwesenheit von C-RAF-Phosphopeptid auf das immobilisierte 14-3-3-Protein titriert und die SPR-Messung wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die detektierten Signale gegen die eingesetzte CNA-Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen, normalisiert und über nichtlineare Regression unter Verwendung von Gleichung 15 der EC_{50} bestimmt.

3.8. Strukturbiologische Methoden

3.8.1. Proteinkristallisation

Um die 3D-Struktur eines Proteins oder Proteinkomplexes zu bestimmen, kann man sich der Methode der Röntgenkristallographie bedienen. Hierbei macht man sich die Eigenschaft von Kristallen zu Nutze, Röntgenstrahlen zu beugen. Bei der Röntgenkristallographie wird gemessen, in welche Richtung und wie stark ein Proteinkristall Röntgenstrahlen beugt. Aus den gewonnenen Daten kann man über mathematische Verfahren Rückschlüsse auf den Inhalt des Kristalls also die 3D-Proteinstruktur ziehen.

Unter einem Kristall versteht man die regelmäßige Anordnung von Molekülen in einem Kristallgitter, das durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Um einen Proteinkristall herzustellen verwendet man aufgereinigtes Protein. Dieses wird mit Puffer verdünnt, um eine bestimmte Proteinkonzentration und einen bestimmten pH-Wert einzustellen. Zudem wird ein sogenanntes Präzipitans benötigt. Dabei kann es sich zum Beispiel um Salze wie Ammoniumsulfat oder Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) handeln. Dieses wird in einer etwas niedrigeren Konzentration eingesetzt, als es zum vollständigen Präzipitieren des Proteins aus der Lösung heraus nötig wäre. Anschließend wird durch kontrollierte Verdunstung der Proteinprobe Wasser entzogen, sodass ein Zustand erreicht wird, bei der ein Proteinkristall entstehen kann (siehe Abbildung 3.7).

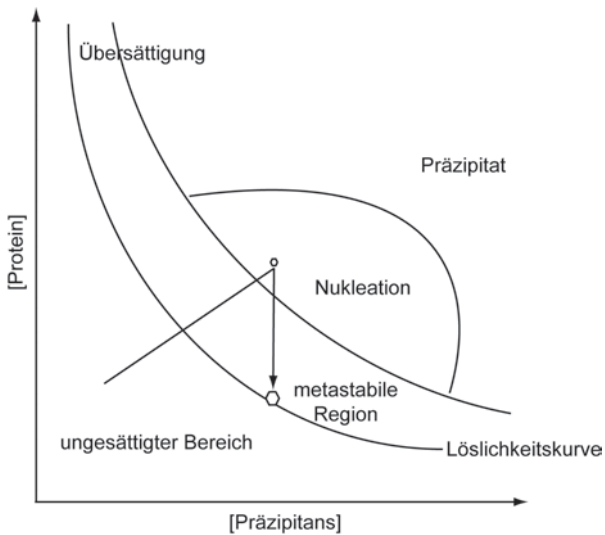


Abbildung 3.7: Phasendiagramm eines Proteins. Mit zunehmender Präzipitanskonzentration tritt ein Protein bei gleich bleibender Konzentration aus einer Lösung heraus in den übersättigten Bereich über und fällt als amorphes Präzipitat aus. Je höher die Proteinkonzentration ist, desto weniger Präzipitans ist notwendig, um diesen Phasenübergang zu erreichen. Da die Nukleation von Proteinkristallen im übersättigten Bereich stattfindet, muss die Präzipitanskonzentration schonend erhöht werden (siehe Abbildung 3.8). Das Kristallwachstum geschieht in der metastabilen Region. Proteinkristalle im Gleichgewichtszustand mit dem Lösungsmittel, auch Mutterlauge genannt, befinden sich auf der Löslichkeitskurve. Abbildung modifiziert nach Chayen (1998).

Um diesen Vorgang zu bewerkstelligen sind zwei Methoden weit verbreitet; die Methode des hängenden und des sitzenden Tropfens (siehe Abbildung 3.8). Bei beiden Methoden wird die Protein-Präzipitanslösung in einem luftdicht verschlossenen Gefäß (meist ein *well* in einer 24- oder 96-*well*-Platte) mit einem größeren Volumen an Reservoirolö-

sung äquilibriert, die nur das Präzipitans aber kein Protein enthält. Durch Gasdiffusion kommt es zum Austausch von Wasser zwischen der Protein-Präzipitanslösung und der Reservoirlösung, bis die Präzipitanskonzentration in beiden Lösungen annähernd gleich ist. Sobald ein Gleichgewichtszustand erreicht ist, kann das Kristallwachstum beginnen.

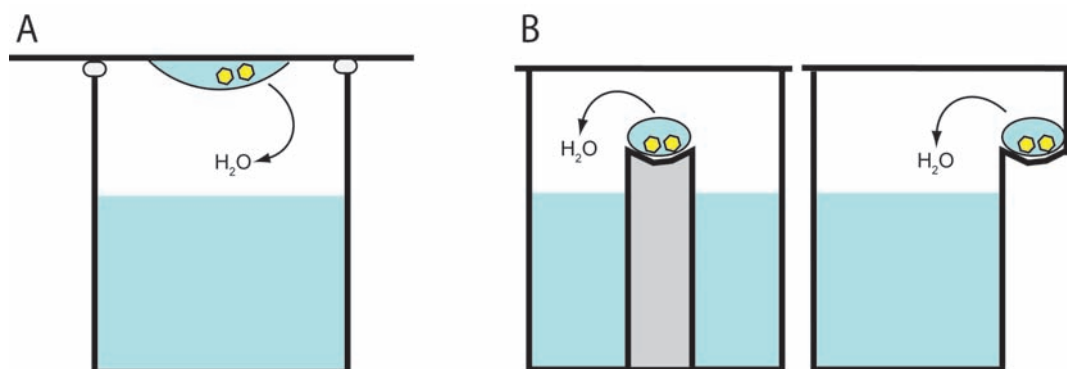


Abbildung 3.8: Die Methode des hängenden (A) und sitzenden (B) Tropfens. Bei beiden Methoden ist die Gasdiffusion die treibende Kraft zur Erhöhung der Protein- und Präzipitanskonzentration im Kristallisationstropfen. (A) Die Methode des hängenden Tropfens kommt oft bei der Reproduktion und Optimierung von Proteinkristallen (3.8.2) zum Einsatz. (B) Die Methode des sitzenden Tropfens dagegen wird üblicherweise zur initialen Suche einer Kristallisationsbedingung verwendet (rechte Abbildung), kann aber auch bei der Reproduktion und Optimierung zum Einsatz kommen (linke Abbildung und 3.8.2).

Da unterschiedlichste Faktoren wie pH-Wert, Temperatur aber auch Proteinkonzentration Einfluss auf das Kristallwachstum haben, ist es notwendig in einem initialen Test möglichst viele unterschiedliche Bedingungen auszuprobieren. Dafür werden im Allgemeinen kommerzielle Reservoirösungen verwendet, die sich in Bezug auf pH-Wert, Präzipitans- und/oder Salzkonzentration in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden. Nachdem man eine Bedingung gefunden hat, bei der das Protein Kristalle bildet, kann man diese Bedingung in einem Variationsansatz (3.8.2) reproduzieren und in Bezug auf Kristallgröße, gute Röntgenbeugung oder auch Kristallisationsgeschwindigkeit optimieren.

In dieser Arbeit wurde aufgereinigtes 14-3-3 Protein bei einer Konzentration von 10-20 mg/ml im Verhältnis 1:0,5 oder 1:1,5 mit Peptid in Komplexierungspuffer komplexiert und für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Mittels eines Phoenix-Pipettierroboters wurden 100 nl Tropfen auf eine 96-well-Platte (3550, Corning) abgesetzt. In dieser Platte kommt das Prinzip des sitzenden Tropfens (siehe Abbildung 3.8B, rechts) zum Tragen. Daraufhin wurde mit 100 nl der „JCSG Core Suites I-IV“ (Qiagen, Hilden) als Reservoirlösung gemischt, die Platte mit Folie verschlossen und der Tropfen über 75 µl

der entsprechenden Reservoirlösung äquilibriert. Nachfolgend wurde die Platte in einem Formulatrix-Imager (Formulatrix, Waltham, USA) bei 4°C inkubiert und regelmäßig Bilder der Kristallisationstropfen aufgenommen, um das Kristallwachstum zu überprüfen.

3.8.2. Reproduktion und Optimierung von Proteinkristallen

Zur Reproduktion von Kristallisationsbedingungen wurde zunächst die Methode des hängenden Tropfens verwendet. Dazu wurden jeweils 1 ml der Präzipitanslösung als Reservoir in jeweils ein *well* einer 24-*well*-Platte (Linbro, Jena Bioscience) gegeben. 1 μ l der entsprechenden Proteinlösung wurde auf ein 20 mm-Deckglas pipettiert und mit 1 μ l der Reservoirlösung luftblasenfrei gemischt. Anschließend wurde das Deckglas mit Silikonpaste auf dem *well* über der Reservoirlösung luftdicht befestigt (siehe Abbildung 3.8A). Danach wurde die Platte bei 4°C inkubiert und regelmäßig mittels eines Durchlichtmikroskops auf Kristallwachstum überprüft.

Da die Kristallisation im hängenden Tropfen eine andere Kinetik aufweist als die Kristallisation im sitzenden Tropfen, kann es notwendig sein, die Reproduktion der Kristalle im sitzenden Tropfen durchzuführen. Dies entspricht eher den Versuchsbedingungen in der initial gefundenen Kristallisationsbedingung. Zu diesem Zweck wurde eine 24-*well-SittingDrop*-Platte verwendet. In ein *well* dieser Platte wurden jeweils 0,5 ml der Präzipitanslösung als Reservoir gegeben. 1 μ l der entsprechenden Proteinlösung wurde auf die Erhöhung für den sitzenden Tropfen pipettiert und mit 1 μ l der Reservoirlösung luftblasenfrei gemischt. Anschließend wurde die Platte mit Folie verschlossen (siehe Abbildung 3.8B). Danach wurde die Platte bei 4°C inkubiert und regelmäßig mittels eines Durchlichtmikroskops auf Kristallwachstum überprüft.

Zur Reproduktion und Optimierung von 14-3-3-Proteinkristallen wurden standardmäßig der pH-Wert des Puffers in 0,2-Schritten beziehungsweise die Konzentration des Präzipitans in möglichst kleinen Abstufungen variiert. Zudem wurden verschiedene Proteinkonzentrationen getestet.

3.8.3. Kryokonservierung von Proteinkristallen

Um Strahlenschäden an den Kristallen zu verhindern, werden die Röntgenbeugungsmessungen bei 100 K (-173°C) in einem Strahl gasförmigen Stickstoffs durchgeführt. Dafür müssen die Proteinkristalle zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. In wässrigen Lösungen könnten sich dabei Eiskristalle bilden, die die Datensammlung stören oder das Proteinkristallgitter schädigen. Daher ist es notwendig, zu der Kristallisationsbedingung Chemikalien dazu zugeben, die die Bildung von Eiskristallen verhin-

dern. Diesen Vorgang nennt man Kryokonservierung. Dabei wird ein Frostschutz wie zum Beispiel PEG oder Zucker zur Reservoirlösung oder zur Mutterlauge des Proteinkristalls gegeben. Der Kristall wird darin einige Sekunden inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren, wo er auch über längere Zeiträume gelagert werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kristalle wurden durch Zugabe von Saccharose zur Mutterlauge kryokonserviert.

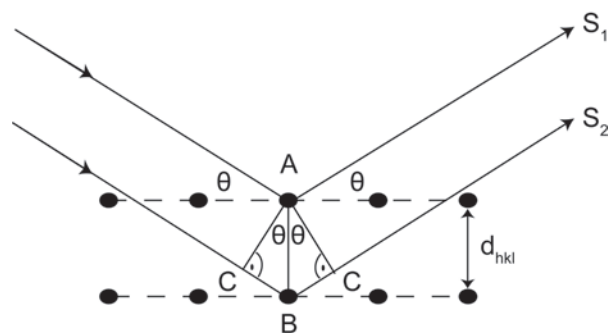
3.8.4. Röntgenbeugungsmessung von Proteinkristallen

Wie bereits erwähnt, sind Proteinkristalle in der Lage, Röntgenstrahlen zu beugen. Dies geschieht durch die Wechselwirkung der Elektronen des Proteins mit den Röntgenstrahlen. Dabei kann jedes Elektron mit dem Röntgenstrahl, also einer elektromagnetischen Welle, interagieren. Die reflektierten (gebeugten) Wellen können sich durch destruktive Interferenz gegenseitig auslöschen oder sich durch konstruktive Interferenz verstärken. Dies führt zu voneinander getrennten Beugungspunkten (Reflexen), deren Intensität gemessen werden kann. Die Abhängigkeit positiver Interferenz von dem Kristallgitter und der Wellenlänge ist in der Bragg'schen Gleichung zusammengefasst (Bragg und Bragg, 1913):

$$2 \times d_{hkl} \times \sin\Theta = n \times \lambda \quad (17)$$

Dabei ist d_{hkl} der Netzebenenabstand eines Kristallgitters in Å mit den Indizes hkl , Θ ist der Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene (auch *Glanzwinkel*), λ ist die Wellenlänge der Röntgenstrahlung und n ein ganzzahliger Wert. Dies ist in Abbildung 3.9 veranschaulicht.

Abbildung 3.9: Geometrische Bedingungen, die notwendig sind, um einen starken gebeugten Strahl zu erhalten. Die Punkte stellen zwei parallele Ebenen von Gitterpunkten dar. Zwei Strahlen S_1 und S_2 werden an diesen Ebenen mit dem Winkel Θ reflektiert. Abbildung modifiziert nach Rhodes (2000).



Die Linie AC führt vom Reflektionspunkt A des Strahls S_1 im rechten Winkel zum Punkt C auf dem Strahl S_2 . Wenn Strahl S_2 am Punkt B reflektiert wird, dann ist die Weglänge des Strahls S_2 um $2BC$ länger als die des Strahls S_1 . Da AB rechtwinklig zur Gitterebene und AC rechtwinklig zum einfallenden Strahl ist, ist der Winkel CAB gleich

dem Einfallswinkel Θ . Da weiterhin ABC ein rechtwinkliges Dreieck bildet, ist der Sinus Θ gleich BC/AB beziehungsweise BC/d_{hkl} . Daraus folgt, dass $BC = d_{hkl}\sin\Theta$ und die zusätzliche Weglänge des Strahls S_2 gleich $2d_{hkl}\sin\Theta$ entspricht. Wenn diese Weglänge ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist, also Gleichung 17 zutrifft, dann sind Strahlen, die an parallelen Ebenen reflektiert werden, in Phase miteinander und durch positive Interferenz kommt es zu einem starken reflektierten Strahl. Jeder dieser Strahlen erzeugt auf dem in einem bestimmten Abstand vorhandenen Detektor einen Reflex. Die Summe dieser Reflexe wird Diffraktionsbild genannt.

Zur Beugungsmessung wurden die Kristalle so auf einem Goniometerkopf montiert, dass sie im Schnittpunkt der Rotationsachse mit dem Röntgenstrahl lagen. Durch Rotieren des Kristalls um 1° wurden abhängig vom Kristallgitter eine bestimmte Anzahl kontinuierlicher Beugungsbilder aufgenommen. Als Röntgenquelle diente eine rotierende Cu- K_α -Anode (Micro-MAX-007 HF, Rigaku, Berlin). Diese wurde mit 40 kV und 30 mA betrieben und erzeugte Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $1,5418 \text{ \AA}$. Zur Detektion wurde ein „MARdtb image plate detector“ Detektorsystem verwendet (Marresearch, Norderstedt).

Hochauflösende Datensätze wurden am *Swiss Light Source* (SLS) in Villigen (Schweiz) unter Synchrotron-Strahlung aufgenommen. Die Indizierung, Integration und Datenreduktion der Diffraktionsbilder erfolgte mit der Software *XDS* (Kabsch, 2010).

3.8.5. Computergestützte Strukturbestimmung

Der Strukturfaktor F beschreibt einen gebeugten Röntgenstrahl, der einen Reflex produziert, welcher an einem Detektor aufgenommen werden kann. Mathematisch betrachtet ist F_{hkl} , der eine Reflexion hkl beschreibt, eine Fourier-Reihe, bei der jeder einzelne Term dem Beitrag eines Atoms zum Reflex hkl entspricht. Das Atom wird dabei als einfache Sphäre von Elektronendichte behandelt.

Wie jede Wellengleichung besteht auch der Strukturfaktor F_{hkl} aus einer Frequenz, einer Amplitude und einer Phase. Somit kann F_{hkl} in eine Strukturfaktoramplitude $|F_{hkl}|$ und den Phasenwinkel α_{hkl} zerlegt werden.

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \times \exp(i\alpha_{hkl}) \quad (18)$$

Die gemessenen Intensitäten I der einzelnen Reflexe hkl sind proportional zum Quadrat der Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$.

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2 \quad (19)$$

Die Elektronendichte ρ an Position x, y, z im kartesischen Koordinatensystem der Einheitszelle kann über folgende Gleichung berechnet werden.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \times \exp(-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}) \quad (20)$$

($\rho(xyz)$ = Elektronendichte im kartesischen Koordinatensystem an der Position x,y,z , V = Volumen der Einheitszelle, $|F_{hkl}|$ = Strukturfaktoramplitude, i = imaginäre Zahl, h,k,l = Frequenzen der Welle in Richtung x,y,z und Indizes eines spezifischen Reflexes im reziproken Gitter, α_{hkl} = Phasenwinkel)

Die Strukturfaktoramplitude kann wie in Gleichungen 19 beschrieben aus den gemessenen Intensitäten berechnet werden. Die Information über den Phasenwinkel α_{hkl} , der die Phasenverschiebung zwischen dem einfallenden und gebeugten Strahl enthält, hingegen kann nicht direkt gemessen werden und muss auf anderem Wege erzeugt werden. Dies ist auch als „Phasenproblem“ bekannt.

Zur Lösung des Phasenproblems werden verschiedene Methoden verwendet. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Methode des molekularen Ersatzes (englisch: *molecular replacement*, MR) verwendet. Bei dieser Methode „leiht“ man sich die Phasen eines Strukturmodells, von dem man annimmt, dass es eine ähnliche Struktur wie das kristallisierte Protein aufweist. Daher verwendet man als Suchmodell oft die bekannte Struktur eines Proteins, das eine hohe Sequenzhomologie zum kristallisierten Protein aufweist. In den meisten Fällen ist jedoch das als Suchmodell dienende Protein in einer anderen Raumgruppe mit einer anderen Orientierung kristallisiert worden. Daher ist es notwendig das Modell in der neuen Einheitszelle zu positionieren. Dies geschieht durch Rotation und Translation des Suchmodells. Da dieser Vorgang sehr viele Freiheitsgrade beinhaltet, wird er in zwei Teilschritte aufgespalten. Zunächst wird durch Vergleich der Pattersonkarten beider Modelle eine Rotationsuche durchgeführt, welche das Suchmodell im Kristallgitter möglichst gut ausrichtet. Anschließend wird das so orientierte Suchmodell durch Translation in der Einheitszelle verschoben. Dabei wird für jede Position der Strukturfaktor des Suchmodells berechnet (F_{calc}). Über den sogenannten R-Wert werden die Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ und $|F_{calc}|$ verglichen.

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} \quad (21)$$

Je kleiner der R-Wert ist, umso ähnlicher sind sich die gefundenen und berechneten Strukturfaktoramplituden. Daher wird in dem Prozess der Translation der kleinstmögliche R-Wert gesucht. Aus diesem wird der entsprechende Wert für $|F_{calc}|$ verwendet, die Phasen α_{calc} des Suchmodells in dieser Orientierung zu berechnen. Als Annäherung werden diese Phasen zur Berechnung der Elektronendichte in dem neuen Modell eingesetzt. Zur Phasierung über molekularen Ersatz wurde die Software *Phaser* des Programmpakets *CCP4* eingesetzt (McCoy *et al.*, 2007).

Nachdem die Elektronendichte berechnet wurde, muss das erhaltene Strukturmodell verfeinert werden. Diese Verfeinerung dient dazu, die Geometrie des Modells (Winkel und Abstände zwischen Atomen) zu korrigieren und weiter an die initial berechneten Phasen anzunähern. Nach jeder Verfeinerung werden mit dem neuen Modell Strukturfaktoramplituden und Phasen berechnet. Anschließend werden die berechneten und beobachteten Strukturfaktoramplituden über den R-Wert miteinander verglichen (siehe Gleichung 21). Je niedriger der R-Wert ist, umso besser passt das berechnete und verfeinerte Modell zu den gemessenen Daten. Die Berechnung der neuen Phasen basiert immer auf dem verfeinerten Modell, sodass fehlerhaft verfeinerte Bereiche auch die Berechnung der Phasen beeinflussen. Aus diesem Grund werden 5 % der gemessenen Reflexe aus dem Verfeinerungsprozess ausgeschlossen. Damit wird analog zu dem R-Wert (auch R_{krist}) der freie R-Wert (R_{free}) berechnet. Die Differenz zwischen R_{krist} und R_{free} sollte nicht größer als 5 % sein (Brünger, 1992, 1997).

Die Interpretation der Dichtekarte und der Bau des Modells wurde mit der Software *Coot* durchgeführt (Emsley und Cowtan, 2004). Zur Verfeinerung des Modells wurde die Software *REFMAC* eingesetzt (Murshudov *et al.*, 1997). Abbildungen wurden mit der Software *PyMOL* erstellt (DeLano, 1998).

4. Ergebnisse

4.1. Biochemische Charakterisierung der Wechselwirkung von MLF1 und 14-3-3

Zur biochemischen Untersuchung der 14-3-3/MLF1-Wechselwirkung wurde das 14-3-3 ϵ -Protein aufgereinigt (3.5) und gegen ITC-Puffer mit pH 7,5 dialysiert (3.1.13 und 3.5.5). Diese 14-3-3-Isoform wurde gewählt, da auch die Kristallisation mit dieser Isoform erfolgt war (siehe Abschnitt 1.4.3). Das 14-3-3 ϵ -Protein wurde als Vollängen-Protein (VL) aufgereinigt und der zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung benötigte His6-*Tag* nicht abgespalten. Daher wird das Protein im Folgenden als His6-14-3-3 ϵ (VL) bezeichnet.

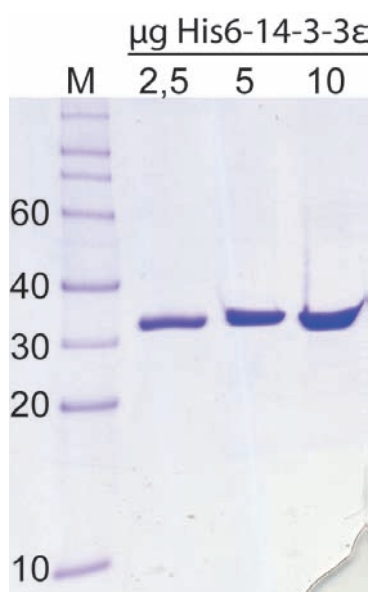


Abbildung 4.1: Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten His6-14-3-3 ϵ (VL). Unterschiedliche Mengen His6-14-3-3 ϵ (VL) wurden über ein 12%iges Tris-Tricin-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt (3.6.1). Als Größenstandard diente der Roti[®]-Mark 10-150 (M, siehe 3.1.6) die Laufhöhen für 10, 20, 30, 40 und 60 kDa sind beschriftet.

Mittels UV-Spektroskopie und einem berechneten Molekulargewicht von $M = 32414 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ sowie einem molaren Extinktionskoeffizienten von $E = 34965 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ wurde die Konzentration des Proteins bestimmt. Die Reinheit des His6-14-3-3 ϵ (VL)-Proteins konnte anhand des Tris-Tricin-Gels nach der Gelelektrophorese (siehe Abbildung 4.1) auf über 95% geschätzt werden.

Zunächst sollte der Beitrag einzelner AS an der 14-3-3/MLF1-Wechselwirkung abgeschätzt werden. Dafür wurden Peptide verwendet, die in der 14-3-3-Bindestelle des MLF1-Proteins, um S34, eine Alanin(A)-Mutation in einer der benachbarten AS trugen. Neben dem synthetischen 14mer MLF1-WT-Peptid, das an S34 phosphoryliert (pS34) und für die Kristallisation eingesetzt worden war

(MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34 WT, Biosynthan, siehe Abschnitt 1.4.3), wurden die entsprechenden A-Mutanten synthetisiert (MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34, F33A, E35A und F37A, Biosynthan). Mit diesen Peptiden wurden ITC-Messungen in ITC-Puffer pH 7,5 wie unter 3.7.1 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 4.2A ist das Ergebnis einer Titration von 14-3-3 ϵ -Protein mit dem MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Peptid dargestellt. Der obere Graph zeigt jeweils den benö-

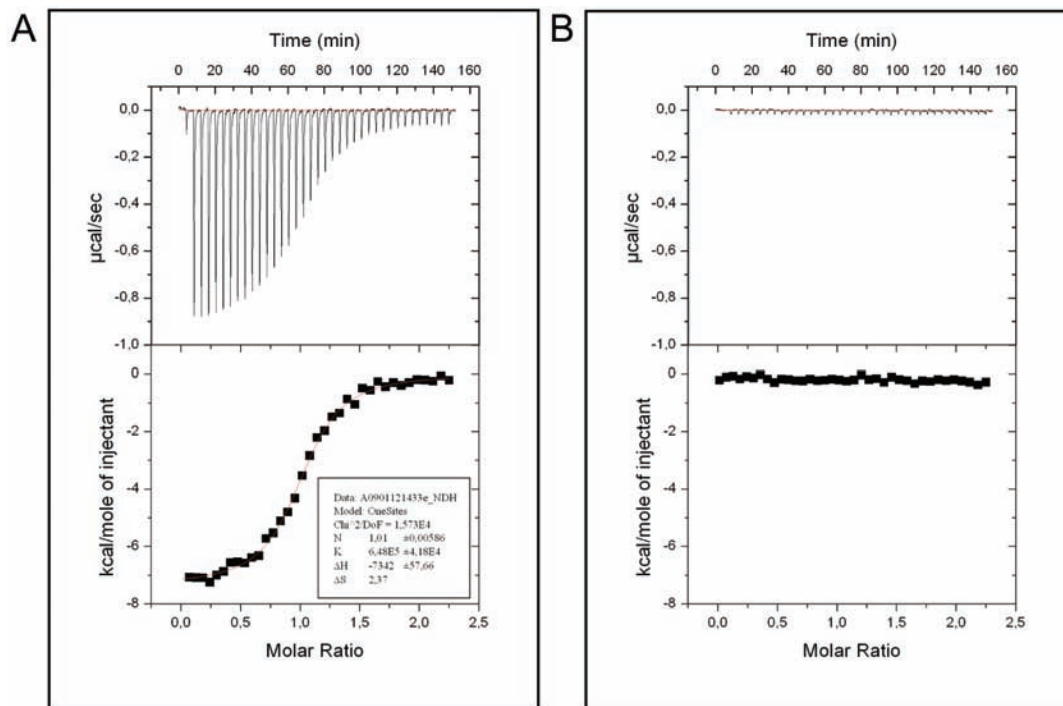


Abbildung 4.2: Ergebnis einer ITC-Messung von 14-3-3 ϵ mit MLF1-Phosphopeptid. (A) Titration von MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34 WT auf 14-3-3 ϵ . (B) Titration von ITC-Puffer pH 7,5 auf 14-3-3 ϵ -Protein als Kontrollmessung.

tigten Energieaufwand zum Ausgleich der durch die einzelnen Injektionen entstandenen Wärmeänderungen aufgetragen gegenüber der Zeit. Der untere Graph stellt jeweils die integrierte Fläche der Wärmeänderungen der einzelnen Injektionen normalisiert auf das molare Verhältnis von 14-3-3 ϵ -Protein zu MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Peptid dar. Da der Energieaufwand zum Temperatenausgleich zur Referenzzelle negativ ist, kann man davon ausgehen, dass es sich um eine exotherme Reaktion handelt. Die Entropieänderung (ΔS) ist verglichen zur Enthalpieänderung (ΔH) vergleichsweise gering. Abbildung 4.2B zeigt das Ergebnis einer Kontrollmessung. Hierbei wurde ITC-Puffer auf 14-3-3-Proteinlösung in der Messzelle titriert. Die (geringen) Wärmeänderungen der Kontrollmessung wurden vor Auswertung der Messdaten von diesen abgezogen.

Für jedes MLF1-Phosphopeptid wurde diese Messung mindestens fünfmal durchgeführt und die erhaltenen K_D -Werte gemittelt. Die gemittelten K_D -Werte sind in Tabelle 9 aufgeführt. Wie anhand der strukturellen Daten erwartet (siehe 1.4.3), zeigten alle gemessenen Peptide eine Stöchiometrie von ~ 1 bezogen auf ein 14-3-3 ϵ -Monomer. Dagegen war es unerwartet, dass die Mutation E35A und F37A keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungskonstante hatte verglichen zum WT-Peptid. Dies bedeutet, dass die Reste dieser beiden AS nur wenig zur Bindung des WT-MLF1-Phosphopeptids an

Peptid	Sequenz	$K_D / \mu\text{M}$	N
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 WT	MIRSF -pS- EPFGRDLL	$1,55 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,08$
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 F33A	MIRSA-pS- EPFGRDLL	$4,99 \pm 0,59$	$0,93 \pm 0,07$
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 E35A	MIRSF -pS- APFGRDLL	$1,53 \pm 0,05$	$0,99 \pm 0,03$
MLF1 ₍₂₉₋₄₂₎ pS34 F37A	MIRSF -pS- EPAGRDLL	$1,55 \pm 0,29$	$1,03 \pm 0,03$

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der ITC-Messungen von 14-3-3 ϵ mit verschiedenen MLF1-Phosphopeptiden. N = Bindungsstöchiometrie.

das 14-3-3 ϵ -Protein beitragen. Der Austausch von F33 zu A hingegen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Bindung. Das kann mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur des 14-3-3/MLF-Komplexes erklärt werden (siehe Abbildung 4.3). Während die Reste der AS E35 und F37 nur die Oberfläche des 14-3-3 ϵ -Proteins kontaktieren, ist der Phenylring des F33 in einer hydrophoben Tasche gebunden. Diese hydrophobe Tasche wird durch die AS L223 und L230 sowie durch die Hauptkette der Helix 9 des 14-3-3 ϵ -Proteins gebildet. Insgesamt entsteht dadurch eine große hydrophobe Interaktionsfläche. Darüber kann das F33 einen signifikanten Beitrag zur Bindung des WT-MLF1-Phosphopeptids an das 14-3-3 ϵ -Protein leisten.

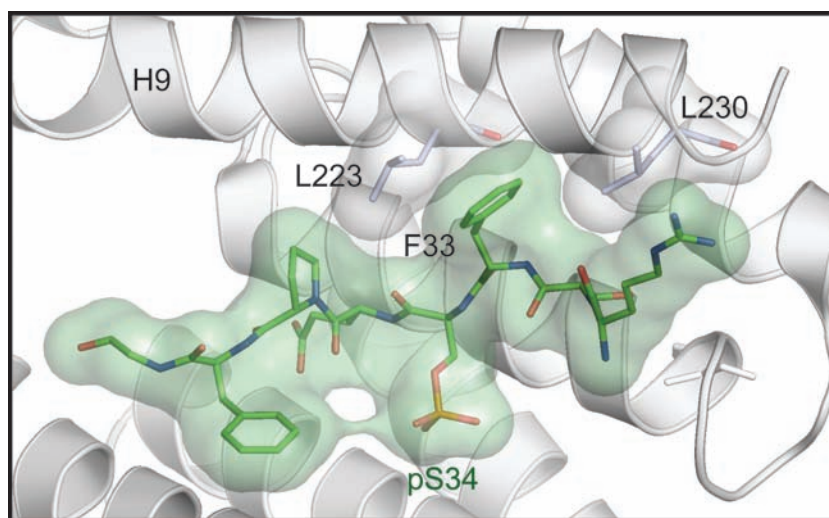


Abbildung 4.3: Ausschnitt des Strukturmodells des 14-3-3 ϵ -MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Komplexes (siehe 1.4.3). Der Ausschnitt zeigt das MLF1-Phosphopeptid in der 14-3-3-Bindegrube. Das phosphorylierte MLF1-Peptid ist als grünes Stäbchenmodell mit der entsprechenden Oberfläche in halb transparentem grün dargestellt. Zur besseren Orientierung ist das pS34 markiert. Das 14-3-3 ϵ -Protein ist in grau als Bändermodell gezeigt und Helix 9 beschriftet (H9). Die hydrophoben AS L223 und L230 sind zudem als Stäbchenmodelle mit entsprechender halbtransparenter Oberflächendarstellung hervorgehoben.

4.2. Zellbiologische Untersuchungen zur 14-3-3-abhängigen MLF1-Lokalisation

4.2.1. Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisation des humanen MLF1-Proteins wurde das MLF1-Gen über Restriktion und Ligation in den pEGFP-C1 und den pEGFP-N1 Vektor kloniert (siehe 3.2.4 und 3.2.5). Anschließend wurden HEK293T-Zellen mittels der Calciumphosphat-Methode mit der DNS transfiziert (3.4.4). Die Lokalisation der N- und C-terminal mit GFP fusionierten MLF1-Proteine, die im Folgenden als GFP-MLF1 und MLF1-GFP bezeichnet werden, wurde an einem konfokalen Mikroskop untersucht.

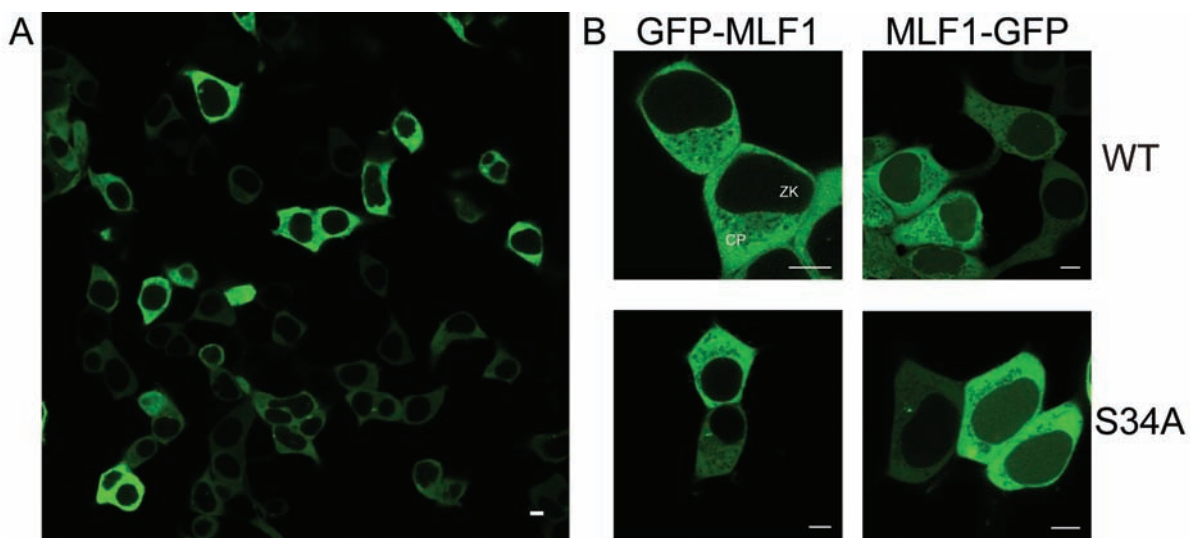


Abbildung 4.4: Lokalisation von GFP-Fusionen des humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen. (A) Lokalisation von N-terminal mit GFP fusioniertem MLF1. (B) Vergleich von N- und C-terminal mit GFP fusioniertem MLF1 WT und S34A. Maßstabsleiste = 10 µm.

Die konfokalmikroskopische Untersuchung zeigte, dass das GFP-MLF1-Fusionsprotein ausschließlich im CP der HEK293T-Zellen lokalisiert ist (siehe Abbildung 4.4A). Das C-terminal mit GFP fusionierte humane MLF1-Protein, MLF1-GFP, liegt ebenfalls überwiegend im CP vor (siehe Abbildung 4.4B oben). Allerdings kann man im Vergleich zum GFP-MLF1 eine schwache, gleichmäßige Lokalisation im ZK erkennen.

Des Weiteren wurde über zielgerichtete Mutagenese die 14-3-3-Bindestelle des MLF1-Proteins S34 zu A mutiert (3.2.10). Die so entstandenen mutierten Proteine (S34A) wurden ebenfalls auf ihre Lokalisation in HEK293T-Zellen untersucht (siehe Abbildung 4.4B, unten). Auch hier lässt sich eine überwiegende Lokalisation im CP erkennen. Zu-

sätzlich ist kein Unterschied zu den jeweiligen WT-Proteinen GFP-MLF1 und MLF1-GFP sichtbar.

Die Fusion des MLF1-Proteins mit GFP zur Sichtbarmachung der Lokalisation in der Zelle birgt die Gefahr, dass das Protein sich aufgrund der GFP-Fusion anders verhält als ohne Fusionspartner. Es kann zum Beispiel sein, dass es aufgrund der durch die Fusion erhöhten Größe nicht mehr in den ZK translokieren kann, obwohl es dies ohne Fusionsprotein tun würde. In Abbildung 4.5 ist die schematische Primärstruktur des humanen MLF1-Proteins dargestellt. Neben dem 14-3-3-Bindemotiv um S34, sind außerdem noch zwei Kernimportsequenzen (NLS, AS 168-174 und 232-236) sowie eine Kernexportsequenz (NES, AS 89-98) bekannt (siehe 1.4.2).



Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des humanen MLF1-Proteins.

Eine Mutation der NES sorgt dafür, dass ein ansonsten intaktes Protein, das sich normalerweise zwischen ZK und CP hin- und herbewegt, im ZK gehalten wird, da es nicht mehr an den Exportkomplex bestehend aus CRM1 und Ran-GTP binden kann. Dass die Mutation des L89 in der MLF1-NES (89-LERNFGQLSV-98) ausreicht, um die Bindung an CRM1 und den damit einhergehenden Kernexport zu verhindern, konnte bereits gezeigt werden (Yoneda-Kato und Kato, 2008). Das bedeutet, dass man durch diese Mutation der NES überprüfen kann, ob das GFP-fusionierte MLF1-Protein in den ZK translokieren kann. Das an der NES mutierte GFP-fusionierte MLF1-Protein sollte, sofern es voll funktionell ist, vorwiegend im ZK lokalisiert sein.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die NES-Mutanten L89E und L89A des GFP-MLF1-Proteins hergestellt (3.2.10) und HEK293T-Zellen wiederum mittels der Calciumphosphat-Methode mit der DNS transfiziert (3.4.4). Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, verhalten sich beide NES-Mutanten des GFP-MLF1-Proteins, L89E und L89A, wie erwartet. In beiden Fällen ist eine überwiegende Lokalisation im ZK zu erkennen. Darüber hinaus ist eine Lokalisation des Proteins ebenfalls in den Nucleoli (N) zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das GFP-MLF1-Protein trotz der erhöhten Größe in den ZK translokieren kann.

Daraufhin wurde eine weitere NES-Mutation getestet. Diese sollte schwächer sein als der Austausch von L zu E oder A. Da sich die AS L und V in ihren chemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind, wurde eine L89V-Mutante hergestellt. Die L89V-Mutation sollte die Lokalisation des GFP-MLF1-Proteins im CP verringern und das Protein somit

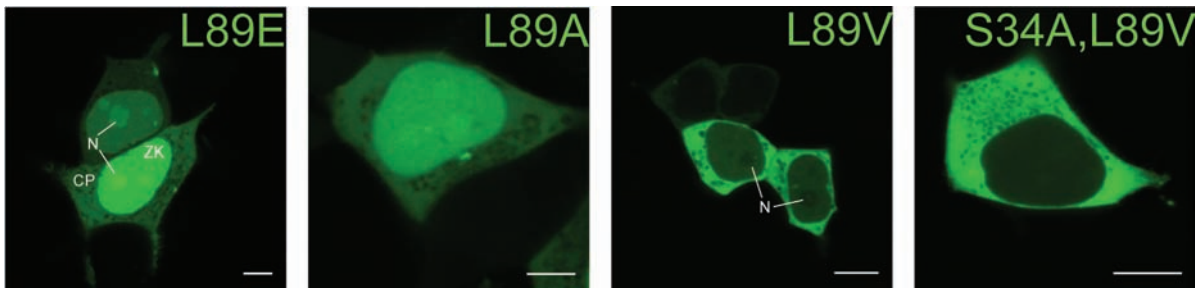


Abbildung 4.6: Lokalisation der angegebenen NES-Mutanten des GFP-MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen. Maßstabsleiste = 10 μm .

zu etwa gleichen Anteilen im CP und ZK vorliegen. Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, trifft diese Erwartung nicht zu. Das GFP-MLF1 L89V ist überwiegend im CP lokalisiert. Dennoch kann man im Vergleich zum WT GFP-MLF1 eine etwas erhöhte Lokalisation im ZK erkennen (siehe Abbildung 4.4). Daher wurde in dieses Protein zusätzlich die 14-3-3-Bindemutation S34A eingebracht. Das daraus resultierende doppelt mutierte GFP-MLF1 S34A,L89V wies jedoch bezüglich der subzellulären Lokalisation keinen Unterschied zum einfach mutierten GFP-MLF1 L89V auf (siehe Abbildung 4.6).

4.2.2. Lokalisation des verkürzten humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen

Um auszuschließen, dass ein unbekannter Interaktionspartner, der ebenfalls an das humane MLF1-Protein bindet, die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins beeinflusst oder dem Effekt der aufgehobenen 14-3-3 Bindung entgegenwirkt, wurden sechs verschiedene verkürzte MLF1-Proteine getestet. In Abbildung 4.7 sind die verkürzten Proteine schematisch aufgezeichnet.

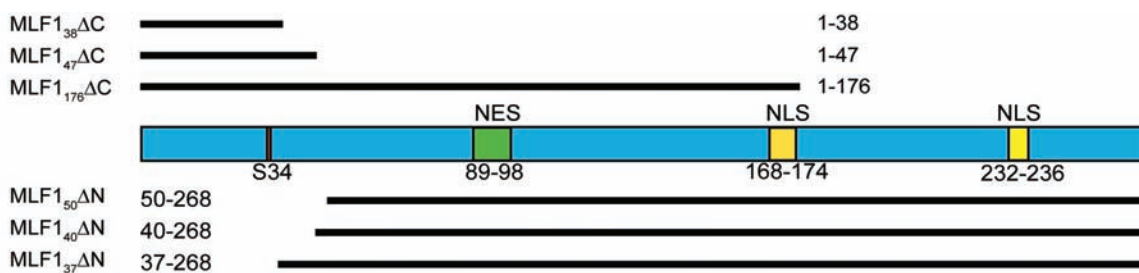


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der verkürzten MLF1-Proteine. Die Konstruktgrenzen sind bezogen auf die Aminosäuresequenz angegeben.

Zunächst wurden drei verschieden lange, C-terminal verkürzte MLF1-Proteine hergestellt. Ein Konstrukt enthielt sowohl die NES als auch eine NLS (MLF1₁₇₆ΔC). Das sollte bewirken, dass nicht der Einfluss einer Lokalisationssequenz überwog, sondern der

Effekt der 14-3-3-Bindung detektiert werden konnte. Zwei weitere MLF1-Proteine wurden so hergestellt, dass sie weder die NES noch eine NLS enthielten. Eines der beiden Konstrukte endete C-terminal direkt hinter der 14-3-3 Bindestelle (MLF1₃₈ΔC), das andere Konstrukt etwas weiter davon entfernt (MLF1₄₇ΔC).

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation dieser verkürzten Konstrukte als C-terminal mit GFP fusionierte Proteine untersucht. Wie in Abbildung 4.8A ersichtlich, sind die verkürzten MLF1₃₈ΔC-GFP- und MLF1₄₇ΔC-GFP-Proteine, die weder eine NES noch NLS beinhalten, in etwa zu gleichen Anteilen im ZK und im CP lokalisiert. Das etwas längere MLF1₁₇₆ΔC-GFP hingegen, das sowohl die NES als auch eine NLS

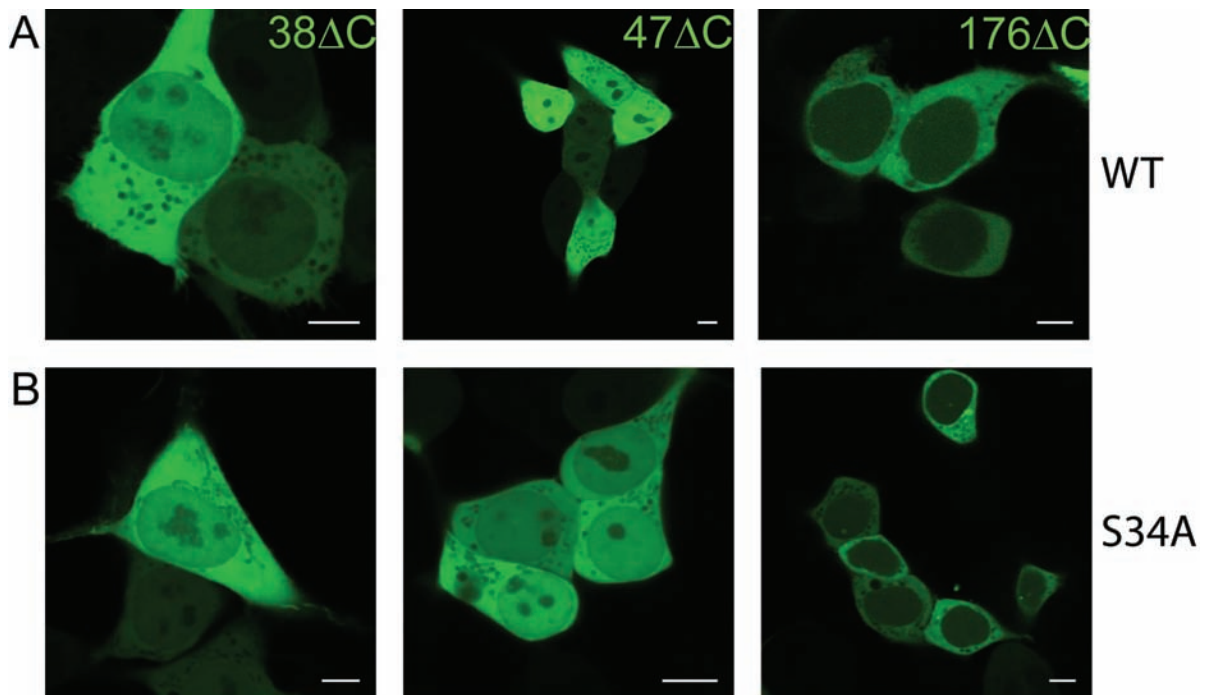


Abbildung 4.8: Lokalisation von C-terminal verkürztem MLF1-GFP in HEK293T-Zellen. (A) C-terminal verkürztes WT-MLF1₃₈ΔC- und WT-MLF1₄₇ΔC-GFP ist in etwa in gleichen Anteilen im ZK und im CP sichtbar. Das längere WT-MLF1₁₇₆ΔC-GFP, das sowohl die NES als auch eine NLS enthält, ist überwiegend im CP lokalisiert. (B) Die 14-3-3-Bindemutation S34A scheint keinen Einfluss auf die Lokalisation des C-terminal verkürzten MLF1-GFP zu haben. Maßstabsleiste = 10 μ m.

beinhaltet, ist überwiegend im CP lokalisiert. Für die entsprechenden verkürzten GFP-MLF1-Fusionsproteine zeigten sich die gleichen subzellulären Lokalisationen wie für die oben beschriebenen MFL1-GFP-Proteine (Daten nicht abgebildet). Zudem wurde in die verkürzten MLF1-GFP-Proteine die 14-3-3-Bindemutation S34A eingebracht (siehe Abbildung 4.8B). Auch hier konnte kein Unterschied bezüglich der subzellulären Lokalisation zu den entsprechenden WT-Proteinen festgestellt werden. Dies zeigte sich auch für die entsprechend mutierten GFP-MLF1-Verkürzungsstrukture (Daten nicht gezeigt).

Obwohl 14-3-3-Proteine in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiert werden (Aitken *et al.*, 1992), könnte es sein, dass der endogene Gehalt an 14-3-3-Proteinen nicht ausreicht, um einen Einfluss auf die Lokalisation des unter dem starken CMV-Promotor exprimierten MLF1-Proteins zu zeigen. Daher wurden HEK293T-Zellen zusätzlich zu den C-terminal verkürzten MLF1-Proteinen mit 14-3-3 ϵ co-transfiziert, das C-terminal mit mCherry fusioniert war (14-3-3 ϵ -mCherry). Das 14-3-3 ϵ -mCherry ist in allen untersuchten Zellen erwartungsgemäß überwiegend im CP und nur zu einem geringen Anteil im ZK lokalisiert (siehe Abbildung 4.9A). Die C-terminal verkürzten MLF1-Proteine

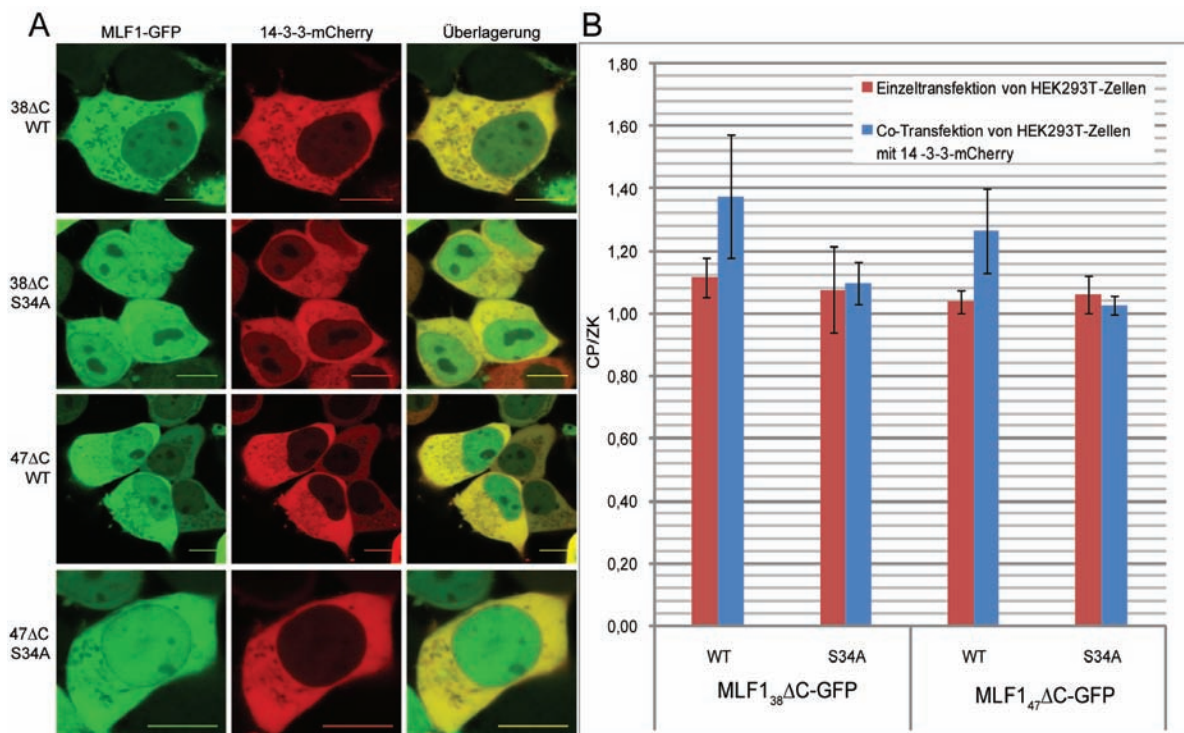


Abbildung 4.9: Co-Transfektion von HEK293T-Zellen mit C-terminal verkürztem MLF1-GFP und 14-3-3 ϵ -mCherry. (A) Untersucht wurde der Einfluss der Co-Expression von 14-3-3 ϵ -mCherry auf die subzelluläre Lokalisation der C-terminal verkürzten MLF1₃₈ΔC-GFP- und MLF1₄₇ΔC-GFP-Konstrukte als WT und S34A-Mutante. (B) Verhältnis von CP zu ZK (CP/ZK) in der subzellulären Lokalisation von C-terminal verkürztem MLF1-GFP. Dargestellt ist der Median von jeweils mindestens 14 untersuchten Zellen und die entsprechenden Abweichungen (MAD) als Fehlerbalken. Maßstabsleiste = 10 μ m.

hingegen weisen eine etwas unterschiedliche subzelluläre Lokalisation in Abhängigkeit der 14-3-3 Bindestelle auf. Die WT-Proteine MLF1₃₈ΔC-GFP und MLF1₄₇ΔC-GFP weisen eine etwas stärkere Lokalisation im CP verglichen mit der Lokalisation im ZK auf, wenn sie mit 14-3-3 ϵ -mCherry co-exprimiert werden. Hingegen zeigt sich bei den

14-3-3-Bindemutanten S34A-MLF₁₃₈ΔC-GFP und S34A-MLF₁₄₇ΔC-GFP weiterhin eine gleichmäßige Verteilung zwischen ZK und CP (Vergleich Abbildung 4.8A und 4.9).

Mittels der Software *ImageJ* (Rasband, 2004) wurde überprüft, ob dieser Unterschied statistisch signifikant ist. Dazu wurden konfokalmikroskopisch aufgenommene Bilder von mindestens 14 verschiedenen Zellen aus insgesamt drei voneinander unabhängigen Experimenten untersucht. Mit der Software *ImageJ* wurde die durchschnittliche Pixelintensität des Hintergrunds, des CPs und des ZKs bestimmt. Die erhaltenen Werte für den Hintergrund wurden von denen des CPs und ZKs abgezogen und der Quotient der so erhaltenen Intensitäten aus CP und ZK gebildet. Der Median und dessen absolute Abweichung (MAD) wurden ermittelt und für die jeweiligen transfizierten Zellen aufgetragen (siehe Abbildung 4.9B). Zusätzlich zu den mit 14-3-3ε-mCherry co-transfizierten HEK293T-Zellen wurden auch die oben beschriebenen mit C-terminal verkürztem MLF1-GFP einfach transfizierten Zellen auf diese Weise analysiert.

Zunächst verdeutlicht der in Abbildung 4.9B gezeigte Graph, dass der qualitative Eindruck aus Abbildung 4.8 auch quantitativ belegt werden kann. In HEK293T-Zellen ist der Unterschied der subzellulären Lokalisation in Bezug auf das Verhältnis von CP zu ZK (CP/ZK) zwischen den C-terminal verkürzten MLF1-GFP Fusionsproteinen als WT oder als S34A-Mutante statistisch nicht signifikant.

In den HEK293T-Zellen, in denen C-terminal verkürztes MLF1-GFP mit 14-3-3ε-mCherry co-exprimiert wurde, zeigen sich jedoch Unterschiede. Zum Beispiel ist in Zellen, in denen 14-3-3ε-mCherry co-exprimiert wurde, das Verhältnis von CP/ZK höher als in Zellen, in denen WT-MLF₁₃₈ΔC-GFP allein exprimiert wurde. Das spricht dafür, dass das zusätzlich exprimierte und hauptsächlich im CP lokalisierte 14-3-3ε-mCherry an das WT-MLF₁₃₈ΔC-GFP bindet und dieses im CP hält. Des Weiteren ist ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem WT-MLF₁₃₈ΔC-GFP und der entsprechenden S34A-Mutante zu erkennen, wenn diese beiden Proteine heterolog mit 14-3-3ε-mCherry co-exprimiert werden. Das Verhältnis von CP/ZK ist für S34A-MLF₁₃₈ΔC-GFP jedoch das gleiche wie für das mit 14-3-3ε-mCherry exprimierte Protein. Das unterstreicht die Hypothese, dass das co-exprimierte 14-3-3ε-mCherry das WT-MLF₁₃₈ΔC-GFP bindet und im CP hält. Eine Bindung von 14-3-3ε-mCherry an das mutierte S34A-MLF₁₃₈ΔC-GFP ist nicht möglich und daher auch kein Unterschied zwischen einfach exprimiertem und mit 14-3-3ε-mCherry co-exprimiertem Protein sichtbar.

Die gleichen Effekte wurden für das etwas längere C-terminal verkürzte MLF₁₄₇ΔC-GFP beobachtet. Auch hier zeigt sich bei den einfach exprimierten MLF₁₄₇ΔC-GFP Fusionsproteinen kein Unterschied zwischen WT und S34A-Mutante bezogen auf ihre

subzelluläre Lokalisation und das entsprechende Verhältnis CP/ZK. Hingegen zeigt sich in HEK293T-Zellen, die mit 14-3-3 ϵ -mCherry und WT-MLF1 $_{47}\Delta$ C-GFP co-transfiziert wurden, eine erhöhte Lokalisation des WT-MLF1 $_{47}\Delta$ C-GFP Fusionsproteins im CP, was zu einem erhöhten Verhältnis von CP/ZK führt. Zudem hat die Co-Expression von 14-3-3 ϵ -mCherry mit S34A-MLF1 $_{47}\Delta$ C-GFP keinen Einfluss auf dessen Lokalisation verglichen mit dem einfach exprimierten Protein. Das Verhältnis von CP/ZK ist in beiden Fällen gleich hoch und deutlich niedriger als bei dem mit 14-3-3 ϵ -mCherry co-exprimiertem WT-MLF1 $_{47}\Delta$ C-GFP.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die gesamte 14-3-3-Bindestelle auf die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins hat, wurden MLF1-Proteine hergestellt, denen der vollständige N-terminale Bereich fehlt (siehe Abbildung 4.7). Dafür wurden drei verschieden lange Proteine MLF1 $_{50}\Delta$ N, MLF1 $_{40}\Delta$ N und MLF1 $_{37}\Delta$ N als GFP-MLF1 Fusionsproteine hergestellt und deren Lokalisation in HEK293T-Zellen überprüft. Abbildung 4.10 zeigt, dass für alle drei Proteine eine ausschließliche Lokalisation im CP festgestellt werden konnte. Das bedeutet, dass die 14-3-3-Bindestelle des humanen MLF1-Proteins in HEK293T-Zellen keinen direkten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins hat.

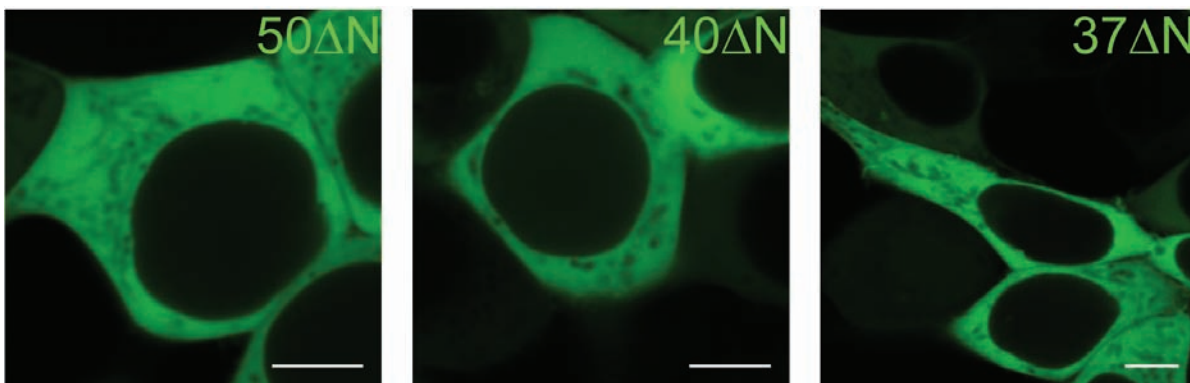


Abbildung 4.10: Lokalisation von N-terminal verkürztem MLF1 in HEK293T-Zellen. Maßstabsleiste = 10 μ m.

4.2.3. Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in anderen Säugerzellen

Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in der Primatenzelllinie Cos-7. Da die Originalstudie zur 14-3-3-abhängigen Lokalisation des murinen MLF1-Proteins in Cos-7-Zellen durchgeführt worden war (siehe Abschnitt 1.4.3 und Winteringham *et al.* (2006)), wurde die subzelluläre Lokalisation des humanen MLF1-Proteins auch in Cos-7-Zellen

untersucht. Der Wechsel von den menschlichen HEK293T-Zellen zu den Primatenzellen Cos-7 stellt einen Wechsel in einen anderen Organismus dar. Dies kann von Vorteil sein, da in anderen Organismen Regulationsebenen fehlen können, die zum Beispiel im humanen Organismus vorhanden sind. So können komplexe Abläufe und Vorgänge oft durch die Verwendung anderer Systeme analysiert oder aufgeklärt werden. Hierfür wurden die gleichen Plasmide, wie unter 4.2.1 geschildert, verwendet. Cos-7-Zellen wurden mittels Polykationen (3.4.4) transfiziert und am konfokalen Mikroskop die subzelluläre Lokalisation der GFP-fusionierten MLF1-Proteine untersucht.

Wie bereits in HEK293T-Zellen zu beobachtet war, ist das GFP-MLF1-Fusionsprotein auch in Cos-7-Zellen ausschließlich im CP lokalisiert (siehe Abbildung 4.11A). Das C-terminal mit GFP fusionierte humane MLF1-Protein, MLF1-GFP, dagegen liegt in etwa zu gleichen Anteilen im CP und im ZK der Cos-7-Zellen vor (siehe Abbildung 4.11B). In Cos-7-Zellen scheint die Richtung der GFP-Fusion, also N- oder C-terminal, die Lokalisation des MLF1-Fusionsproteins zu beeinflussen. Dieser Effekt war in HEK293T-deutlich schwächer ausgeprägt (Vergleich Abbildung 4.4B).

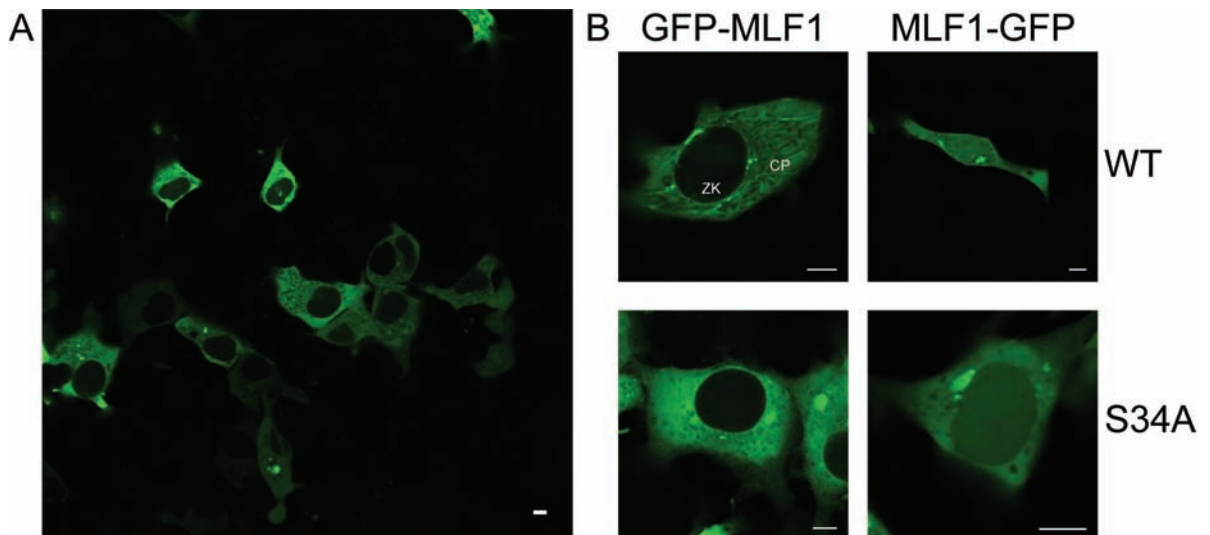


Abbildung 4.11: Lokalisation von GFP-Fusionen des humanen MLF1-Proteins in Cos-7-Zellen. (A) Lokalisation von N-terminal mit GFP fusioniertem MLF1. (B) Vergleich von N- und C-terminal mit GFP fusioniertem MLF1 WT und S34A. Maßstabsleiste = 10 μm .

Auch in den Cos-7-Zellen wurde wie in HEK293T-Zellen die subzelluläre Lokalisation der an der 14-3-3-Bindestelle mutierten S34A-MLF1-Proteine untersucht. Es ist jedoch kein Unterschied in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins zwischen den S34A-Mutanten und dem WT-Protein zu erkennen (siehe Abbildung 4.11B).

Durch die Mutation der NES (L89E, siehe Abbildungen 4.5 und 4.6) wurde auch in Cos-7-Zellen überprüft, ob das an GFP-fusionierte MLF1-Protein in den ZK translozieren kann. Da die L89E-Mutante des GFP-MLF1-Proteins, wie erwartet und wie bei den HEK293T-Zellen bereits beobachtet, auch in Cos-7-Zellen überwiegend im ZK lokalisiert war, kann man davon ausgehen, dass auch in diesen Zellen der Transfer zwischen CP und ZK für die fusionierten MLF1-Protein prinzipiell möglich war (Daten nicht gezeigt). Das wiederum deutet daraufhin, dass die subzelluläre Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in Cos-7-Zellen eher von der Orientierung der GFP-Fusion abhängt als von der Bindung an 14-3-3-Proteine.

Lokalisation des humanen MLF1-Proteins in humanen Lymphoblastenzellen. Bei der K-562-Zelllinie handelt es sich um eine humane AML-Zelllinie. Da bekannt ist, dass MLF1 mit AML assoziiert wird (siehe 1.4.1 und Yoneda-Kato *et al.* (1996); Williams *et al.* (1999)), kann es sein, dass MLF1 in diesen Zellen anders reguliert wird als in HEK293T-Zellen. Dadurch könnte die Mutation der 14-3-3-Bindestelle von MLF1 in diesen Zellen einen deutlicheren Effekt auf dessen subzelluläre Lokalisation haben.

Um dies zu überprüfen, wurden K-562-Zellen, wie unter 3.4.4 beschrieben, mit den gleichen Plasmiden transfiziert wie die HEK293T-Zellen (siehe 4.2.1). Die Zellen wurden wie unter 3.4.4 geschildert auf Objektträger aufgebracht und fixiert, bevor sie konfokalmikroskopisch untersucht wurden. Die Untersuchung am Mikroskop zeigte, dass auch in K-562-Zellen kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisation von GFP-fusioniertem WT-MLF1 und der entsprechenden 14-3-3-Bindemutante (S34A) besteht; beide Proteine (WT und S34A) sind im CP der K-562-Zellen lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

4.3. Untersuchung der S259-vermittelten Bindung von C-RAF an 14-3-3-Proteine

Wie in Abschnitt 1.5.4 geschildert, wurde der Einfluss der 14-3-3-Bindestelle um S259 des C-RAF-Proteins biochemisch und strukturebiologisch bereits intensiv charakterisiert. Daher wird im Folgenden der physiologische Einfluss der 14-3-3-Bindung auf das C-RAF-Protein untersucht.

4.3.1. Lokalisation von endogenem C-RAF in Gegenwart von C-terminal verkürzten 14-3-3-Bindemutanten des C-RAF

Zunächst sollte analysiert werden, welchen Einfluss die für die Lokalisationsexperimente in HEK293-Zellen verwendeten (siehe 1.5.4), C-terminal verkürzten C-RAF-Proteine C-RAF₃₃₀ΔC als WT oder mutiert auf das endogene C-RAF in diesen Zellen haben. Repräsentativ für die neun Mutationen, die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen um S259 gefunden wurden, wurden die Mutationen S259F, T260R und V263A untersucht. Dafür wurden HEK293-Zellen, wie in 3.4.7 erläutert, mit den C-RAF₃₃₀ΔC-pEGFP-C1 Konstrukten und H-RAS-WT DNS co-transfiziert (3.4.4). Die Immunfärbung erfolgte mit einem an das Fluorophor Alexa647 gekoppelten Antikörper (3.4.7) gegen den C-Terminus des C-RAF-Proteins. Dadurch wurde das endogene C-RAF, nicht aber das heterolog exprimierte C-terminal verkürzte C-RAF detektiert.

Abbildung 4.12 zeigt die subzelluläre Lokalisation des endogenen C-RAF-Proteins und der heterolog exprimierten C-terminal verkürzten GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteine. Das endogene C-RAF wurde, wie oben beschrieben, am C-Terminus mit Alexa647-gekoppeltem Antikörper detektiert und ist in rot dargestellt. In allen Zellen ist es überwiegend im CP und zu einem sehr geringen Anteil im ZK zu erkennen. Die heterolog exprimierten C-terminal verkürzten GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteine wurden über die GFP-Fluoreszenz detektiert. Das co-exprimierte H-RAS-Protein ist nicht markiert und daher in der Abbildung nicht sichtbar. Das GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-WT-Protein ist erwartungsgemäß im CP der HEK293-Zellen lokalisiert, während die entsprechenden 14-3-3-Bindemutanten S259F, T260R und V263A an der Plasmamembran (PM) und am Golgi (G) vorliegen. H-RAS ist hauptsächlich an der PM und am G lokalisiert (Chiu *et al.*, 2002; Rocks *et al.*, 2005). Daher kann man annehmen, dass die 14-3-3-Bindemutanten von C-RAF an H-RAS gebunden vorliegen (siehe 1.5.3).

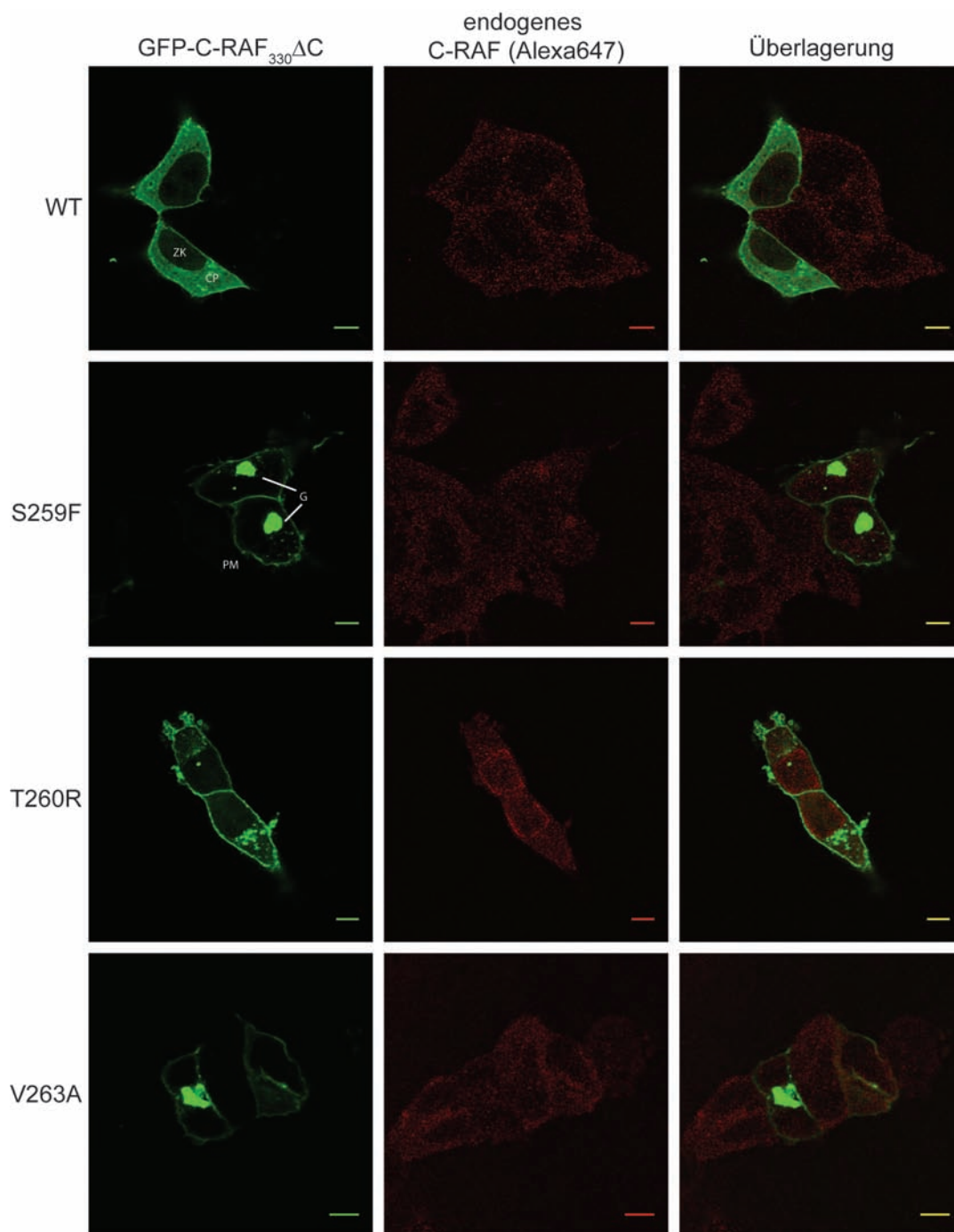


Abbildung 4.12: Immunfärbung von endogenem C-RAF in transfizierten HEK293-Zellen. In HEK293-Zellen wurde GFP-C-RAF₃₃₀ΔC WT, S259F, T260R oder V263A zusammen mit unmarkiertem H-RAS WT heterolog co-exprimiert. Anschließend wurde mit einem Alexa647-gekoppelten Antikörper der C-Terminus des endogenen C-RAF-Proteins detektiert und so dessen Lokalisation sichtbar gemacht. Maßstabsleiste = 10 μm.

Auf die subzelluläre Lokalisation des endogenen C-RAF-Proteins hat die heterologe Co-Expression von GFP-fusionierten, C-terminal verkürzten C-RAF₃₃₀ΔC-Proteinen als WT oder Mutante mit unmarkiertem H-RAS demnach keinen Einfluss.

4.3.2. Physiologischer Effekt der mutierten 14-3-3-Bindestelle um S259 in C-RAF

Wie in der Einleitung bereits erläutert, wird der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg durch ein externes Signal aktiviert (siehe 1.5.3). Die RAF-Kinase kann nach ihrer Aktivierung MEK phosphorylieren. MEK wiederum phosphoryliert ERK, welches daraufhin die Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie phosphoryliert und somit die Transkription von den über diese Transkriptionsfaktoren regulierten Genen aktiviert (Downward, 2003). Ohne extrazellulären Stimulus ist die C-RAF-Kinase an S259 phosphoryliert und wird darüber gebunden im CP gehalten (siehe Abbildung 1.17). Dadurch ist dieser MAPK-Signalweg in unstimulierten Zellen inaktiv (Dumaz und Marais, 2003). Daher kann man die phosphorylierten ERK 1- und 2-Isoformen (ERK1/2) als einen indirekten Indikator für einen aktiven RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg verwenden.

Um zu überprüfen, welchen physiologischen Effekt Mutationen der 14-3-3-Bindestelle um S259 des C-RAF-Proteins in HEK293T-Zellen haben, wurden diese mit der DNS für GFP fusioniertes C-RAF als Vollängen (VL)-Protein entweder als WT oder als 14-3-3-Bindemutanten (S259F, T260R, V263A) mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert und in serumfreiem Medium kultiviert (3.4.4). Anschließend wurde aus den transfizierten Zellen Lysat hergestellt und die Gesamtproteinkonzentration mit dem Bradford Assay bestimmt (3.4.5). Jeweils 45 µg Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE auf einem 12%igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt (3.6.1) und daraufhin auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (3.4.6). Die Detektion der entsprechenden Proteinbanden erfolgte, wie unter 3.4.6 beschrieben, mit primären Antikörpern aus Kaninchen. Dafür wurde die Nitrocellulosemembran wie unter 3.4.6 geschildert mit Antikörpern gegen GFP(1:10000), ERK1/2 (1:1000) und Phospho-ERK1/2 (pERK1/2, 1:1000) in Blocking-Puffer inkubiert (3.1.10 und 3.1.13). Anschließend wurden die primären Antikörper über einen AP-gekoppelten sekundären Antikörper (Antikörper gegen Kaninchen, 1:1000 in Blocking-Puffer) markiert und über die Reaktion von AP mit dem Substrat BCIP/NBT detektiert (3.4.6 und Abbildung A.3).

Um zu überprüfen, ob gleiche Mengen Protein auf die Nitrocellulosemembran transferiert wurden, wurde das ERK1/2-Protein detektiert. Dieses wird von HEK293T-Zellen endogen exprimiert und sollte unabhängig von der heterologen Expression in allen Lysatproben in gleichen Mengen vorkommen. Sofern gleich viel Zelllysate über das Tris-

Tricin-Gel aufgetrennt wurde und die Proteine gleichmäßig auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurden, sollte die Intensität der detektierten ERK1/2-Banden für die verschiedenen Proben gleich hoch sein. Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, sind die ERK1/2-Banden der verschiedenen Proben vergleichbar intensiv gefärbt. Das bedeutet, dass man den Anteil an pERK1/2 der Proben miteinander vergleichen kann.

Der Anteil an pERK1/2 stellt eine Reaktion auf die heterologe Expression der verschiedenen GFP-C-RAF(VL)-Proteine dar. Nur wenn die HEK293T-Zellen die verschiedenen GFP-C-RAF(VL)-Proteine gleich stark exprimieren, ist es sinnvoll den physiologischen Effekt der heterologen Expression dieser Proteine zu vergleichen. Daher ist eine Überprüfung der Höhe der heterologen Expression der verschiedenen GFP-C-RAF(VL)-Proteine in den HEK293T-Zellen notwendig. Dazu wurde der GFP-Antikörper verwendet. Da alle mit GFP-Antikörper markierten Proteinbanden ungefähr gleich intensiv angefärbt sind, kann man davon ausgehen, dass die heterologe Expression der verschiedenen GFP-C-RAF(VL)-Proteine gleich hoch war (siehe Abbildung 4.13).

Über einen pERK1/2-Antikörper wurde der Anteil an pERK1/2 in den unterschiedlich transfizierten Proben verglichen. Für das GFP-C-RAF(VL)WT-Protein ist keine ERK1/2-Phosphorylierung detektierbar. Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden in serumfreiem Medium, also ohne externe Stimuli wie EGF, kultiviert. Daher kann man davon ausgehen, dass der MAPK-Signalweg inaktiv ist. C-RAF liegt daher an der S259-Bindestelle phosphoryliert vor und ist darüber an 14-3-3-Proteine gebunden. Durch die 14-3-3-Bindung ist eine Plasmamembranrekrutierung und eine damit einhergehende Aktivierung der C-RAF-Kinase durch RAS nicht möglich. Es kann daher keine Phosphorylierung von MEK und somit auch keine Phosphorylierung von ERK1/2 stattfinden.

Bei den heterolog exprimierten GFP-C-RAF(VL)-Proteinen, die an der 14-3-3-Bindestelle um S259 mutiert sind, verhält es sich umgekehrt. Da keine Bindung der C-RAF-Kinase an 14-3-3-Proteine mehr stattfinden kann, ist eine Bindung an RAS auch ohne externen Stimulus möglich. Dadurch wird die C-RAF-Kinase aktiviert und phosphoryliert MEK, welches wiederum ERK1/2 phosphoryliert. Der Effekt der Mutationen des C-RAF-Proteins ist unterschiedlich stark. Während die Mutationen S259F und T260R

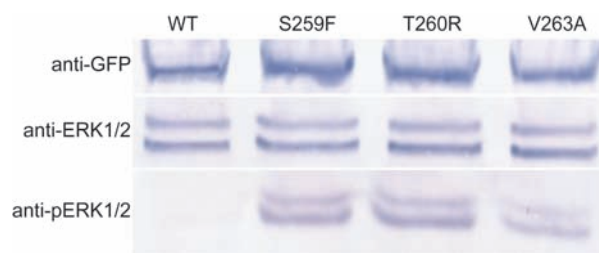


Abbildung 4.13: Immunblot von Zelllysaten aus transfizierten HEK293T-Zellen. In HEK293T-Zellen wurde GFP-C-RAF(VL) als WT oder 14-3-3-Bindestellmutante S259F, T260R oder V263A heterolog exprimiert. Über einen Immunblot wurde mit den entsprechenden Antikörpern der Anteil der Proteine GFP-C-RAF(VL), ERK1/2 und pERK1/2 in den Zelllysaten verglichen.

zu einer starken ERK1/2-Phosphorylierung führen, ist die für die V263A-Mutante detektierte Phosphorylierung eher schwach. Dies in Übereinstimmung mit den strukturellen und biochemischen Daten der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Proteinwechselwirkung (siehe 1.5.4).

4.4. Untersuchung der S233-vermittelten 14-3-3-Bindung von C-RAF

4.4.1. Biochemische Charakterisierung der S233-vermittelten Wechselwirkung von C-RAF und 14-3-3

Zunächst wurde 14-3-3-Protein für die biochemische Charakterisierung der S233-vermittelten Wechselwirkung von C-RAF und 14-3-3 mittels FP und ITC aufgereinigt. Da bekannt ist, dass 14-3-3 ζ mit C-RAF interagiert (Clark *et al.*, 1997), wurde diese 14-3-3-Isoform verwendet. Die Expression und Aufreinigung des 14-3-3 ζ (VL)-Proteins erfolgte wie unter 3.5.1 - 3.5.5 erläutert und das aufgereinigte Protein wurde wie unter 3.5.8 beschrieben gelagert. Das 14-3-3 ζ Protein wurde als VL-Protein verwendet und der

für die Affinitätschromatographische Aufreinigung benötigte His-Tag nicht abgespalten. Daher wird das Protein im Folgenden als His6-14-3-3 ζ (VL) bezeichnet.

Die Konzentration des aufgereinigten His6-14-3-3 ζ (VL) wurde über UV-Spektroskopie und unter Annahme des berechneten Extinktionskoeffizienten von $E = 31860 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ und des berechneten Molekulargewichts von $M = 30985,5 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ bestimmt. Um die Reinheit des aufgereinigten Proteins abschätzen zu können wurden unterschiedliche Mengen mittels SDS-PAGE über ein 12%iges Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt (3.6.1). Abbildung 4.14 zeigt, dass die Reinheit des aufgereinigten

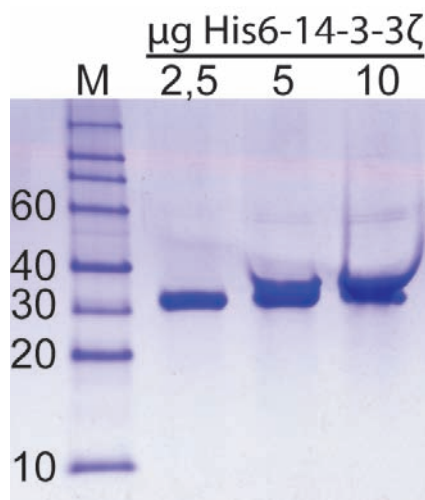


Abbildung 4.14: Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten His6-14-3-3 ζ (VL)-Proteins. Unterschiedliche Mengen His6-14-3-3 ζ (VL) wurden über ein 12%iges Tris-Tricin-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt (2.6.1). Als Größenstandard diente der Roti[®]-Mark 10-150 (M, siehe 2.1.5). Die Laufhöhen für 10, 20, 30, 40 und 60 kDa sind beschriftet.

His6-14-3-3 ζ (VL) auf über 95% geschätzt werden kann.

Im ersten Schritt der biochemischen Charakterisierung der S233-vermittelten Wechselwirkung von C-RAF und 14-3-3 sollten die Bindungskonstanten der S233-Bindestelle und der S259-Bindestelle des C-RAF-Proteins an das His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein bestimmt und miteinander verglichen werden. Ebenso wurde die gleichzeitig von S233- und S259- vermittelte Bindung von C-RAF an das His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Peptide käuflich erworben, die jeweils N-terminal mit einem FAM-Fluorophor markiert waren und zusätzlich an S233, an S259 oder an diesen beiden Serinen phosphoryliert waren (GenScript). Diese Peptide wurden mit dem His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein titriert und die Anisotropie gemessen (siehe 3.7.2).

Abbildung 4.15 zeigt jeweils eine von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es ist zu erkennen, dass für jedes der drei verwendeten Phosphopeptide, das mit His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein titriert wurde, eine Sättigung erreicht werden kann. Das bedeutet, dass für jedes eingesetzte C-RAF-Phosphopeptid auch ein K_D -Wert für die Bindung an das His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein berechnet werden kann. Allerdings zeigen die verschiedenen Dimensionen der X-Achse, dass die Affinitäten sich deutlich voneinander unterscheiden. Je höher die His6-14-3-3 ζ (VL)-Konzentration ist, bei der die Sättigung erreicht wird, desto niedriger ist die Affinität. Die erhaltenen Messpunkte wurden mit nichtlinearer Regression ausgewertet und der K_D -Wert bestimmt (siehe 3.7.2). Die erhaltenen K_D -Werte von je drei voneinander unabhängigen Triplikatmessungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

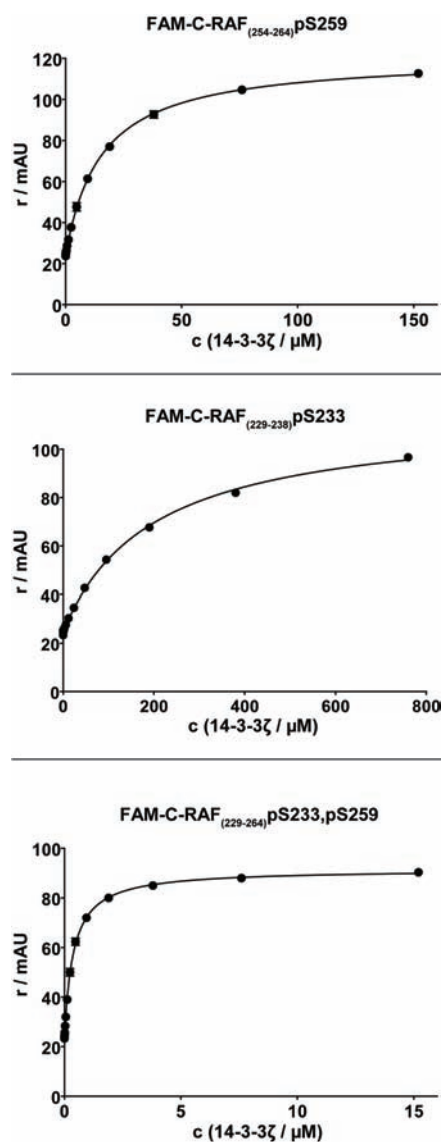


Abbildung 4.15: Affinitätsmessung von unterschiedlichen FAM-markierten C-RAF-Phosphopeptiden und His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mittels FP. Die detektierte Anisotropie r ist in mAU gegen die His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein-Konzentration in μM aufgetragen. Jeder Messpunkt ist der Durchschnitt einer Triplikatmessung inklusive Standardabweichung (Fehlerbalken). Die durchgezogene Linie entspricht der nichtlinearen Regression.

FAM-Peptid	K_D / μM
C-RAF _(229–238) pS233	170,87 ± 24,29
C-RAF _(254–264) pS259	16,67 ± 1,95
C-RAF _(229–264) pS233,pS259	0,35 ± 0,04

Tabelle 10: Ergebnisse der FP-Messung von verschiedenen C-RAF-Phosphopeptiden mit His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein

Diese Tabelle zeigt, dass die berechneten K_D -Werte für die einzelnen gemessenen Peptide jeweils eine Größenordnung auseinander liegen. Das FAM-C-RAF_(254–264)pS259 bindet His6-14-3-3 ζ (VL) mit einem K_D von 16,67 μM , was für die Bindung von kurzen einfach phosphorylierten Phosphopeptiden an 14-3-3-Proteine erwartet werden kann (Rajagopalan *et al.*, 2010). Das FAM-C-RAF_(223–238)pS233 Peptid hingegen bindet mit einem deutlich höheren K_D von 170,87 μM . Die höchste Affinität an His6-14-3-3 ζ (VL) weist das zweifach phosphorylierte FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259 mit einem K_D von 0,35 μM auf. Auch dieser Wert ist vergleichbar mit bereits untersuchten Diphosphopeptiden (Kostecky *et al.*, 2009; Rajagopalan *et al.*, 2010). Die beiden 14-3-3-Bindestellen, S233 und S259, des C-RAF-Proteins wirken synergistisch und erhöhen die Affinität an das 14-3-3-Protein im Vergleich zu den einzelnen Bindestellen.

Für kurze, einfach phosphorylierte Phosphopeptide ist bekannt, dass sie mit einer Stöchiometrie von 1:1 an ein 14-3-3-Monomer, also mit zwei Peptiden pro Dimer, binden (siehe 1.3.3 und Yaffe *et al.* (1997); Rittinger *et al.* (1999)). Bisher wurde erst ein zweifach phosphoryliertes Peptid im Detail auf seine Bindung an 14-3-3-Proteine hin untersucht. Dabei handelt es sich um das 14-3-3-Bindemotiv der epsilon-Isoform der Proteinkinase C (PKC ϵ) (Kostecky *et al.*, 2009). Die proteinkristallographischen Untersuchungen und ITC-Studien ergaben, dass dieses Diphosphopeptid mit einer 1:1-Stöchiometrie an ein 14-3-3 ζ -Dimer bindet. Es liegt also nahe, dass auch das zweifach phosphorylierte C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid mit einer 1:1 Stöchiometrie bezogen auf ein 14-3-3 ζ -Dimer bindet.

Dennoch ist es notwendig, alle Möglichkeiten experimentell zu überprüfen, wie das zweifach phosphorylierte C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid an das His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein binden kann. Zunächst ist es möglich, dass das C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid sich so verhält wie das zweifach phosphorylierte Bindemotiv der PKC ϵ und mit einer Stöchiometrie von einem Peptid zu einem 14-3-3-Dimer bindet (siehe Abbildung 4.16A). Es könnte aber auch sein, dass die unterschiedlichen Affinitäten, der S233- und S259-Bindestelle zur Folge haben, dass in einem 14-3-3-Dimer jeweils zwei

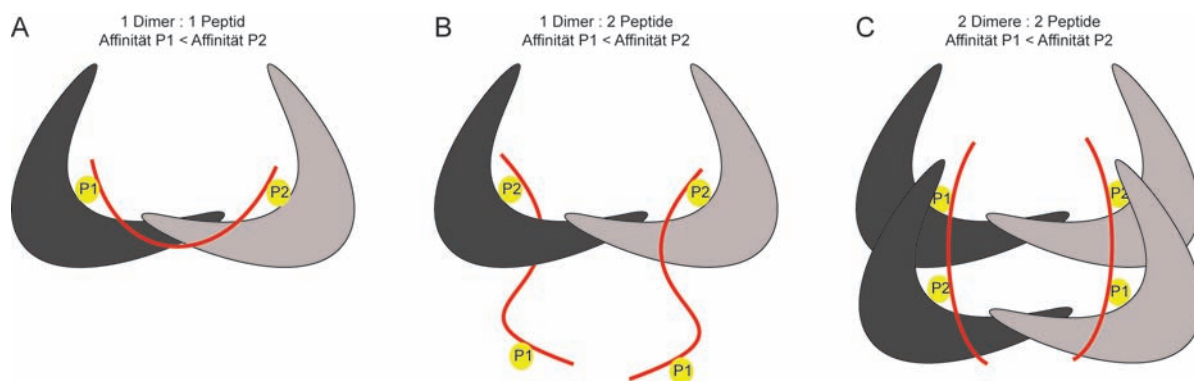


Abbildung 4.16: Verschiedene Möglichkeiten wie das C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid an ein 14-3-3-Dimer binden könnte. Das 14-3-3-Protein ist als W-förmiges Dimer in grau dargestellt, wobei ein Monomer hellgrau, das andere dunkelgrau ist. Das C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid ist als rote Linie dargestellt. Die beiden phosphorylierten Serine S233 und S259 sind als P1 und P2 in gelb hervorgehoben. Für jedes der drei Modelle A-C gilt, dass die S233(P1)-vermittelte Bindung von C-RAF an 14-3-3 schwächer ist als die S259(P2)-vermittelte Bindung.

C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptide binden, da das phosphorylierte S259 durch seine höhere Affinität das phosphorylierte S233 aus der 14-3-3-Bindegrube verdrängt (siehe Abbildung 4.16B). In diesem Fall wäre die Stöchiometrie von Peptid zu 14-3-3-Dimer 2:1. Des Weiteren ist es möglich, dass zwei 14-3-3-Dimere zwei Phosphopeptide in *trans* binden (siehe Abbildung 4.16C). In diesem Fall wäre die Stöchiometrie von Peptid zu Dimer wiederum 1:1.

Wie in 3.7.1 beschrieben, bietet ITC die Möglichkeit, neben der Assoziationskonstante (K_A) und der molaren Bindungsenthalpie (ΔH) auch die molare Bindungsstöchiometrie (N) zu bestimmen. Da diese Methode materialaufwendig ist, wird sie nur bedingt zur ausschließlichen Bestimmung der Bindungskonstanten eingesetzt. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem zweifach phosphorylierten C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid und dem His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein wurde diese Methode eingesetzt, um den über FP ermittelten K_D -Wert zu überprüfen und Information über N zu erhalten.

Dazu wurde His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein in ITC-Puffer mit pH 6,5 bei 30 °C mit 8 μ l-Aliquots des zweifach phosphorylierten C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptids titriert und die Wärmeänderung gemessen. Zudem wurde unter den gleichen Bedingungen einmal His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mit ITC-Puffer mit pH 6,5 und einmal ITC-Puffer mit pH 6,5 mit C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid titriert. Die so erhaltenen Wärmeänderungen, die unspezifischen Prozessen zugeordnet werden können, wurden von den Messwerten abgezogen und aus diesen die gewünschten Parameter bestimmt. Die Messung wurde unabhängig voneinander dreimal durchgeführt und eine dieser Messungen ist repräsentativ in Abbildung 4.17 gezeigt.

Die in Tabelle 11 zusammengefassten Werte zeigen zum Einen, dass die Bestimmung des K_D -Werts durch FP und ITC miteinander vergleichbar sind. Der mit ITC

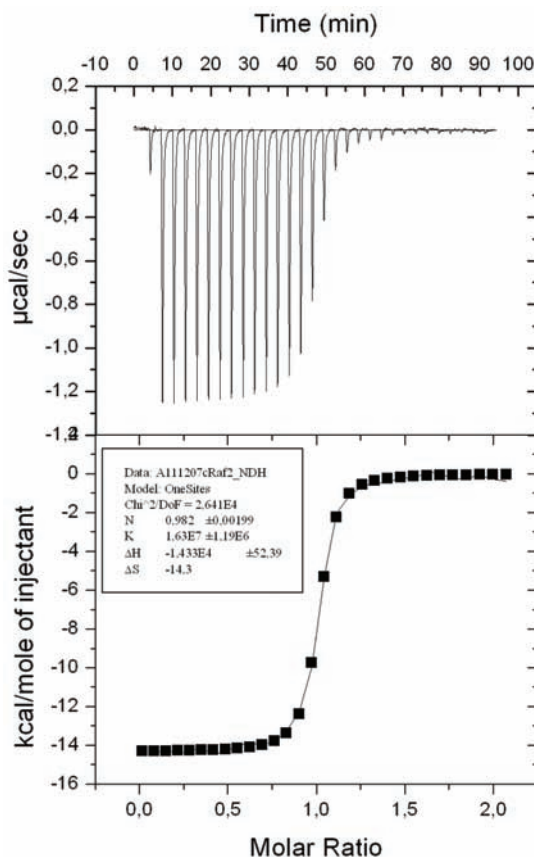


Abbildung 4.17: ITC-Messung von C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid mit His6-14-3-3ζ(VL)-Protein. Diese Messung diente zur Verifizierung des gemessenen K_D -Werts aus der FP-Messung und zur Bestimmung von N.

gemessene K_D -Wert liegt mit 78,08 nM etwa eine Größenordnung unter dem mittels FP bestimmten K_D -Wert von 350 nM. Zum Anderen konnte in allen drei Messungen eine molare Bindungsstöchiometrie von $N \approx 1$ bezogen auf ein His6-14-3-3ζ(VL)-Dimer erhalten werden.

Um diese Messwerte durch eine zweite Methode zu verifizieren wurde mittels FP eine *Active Site Titration* durchgeführt (Bechet *et al.*, 1986; Röglin, 2008). Dabei wird das zweifach phosphorylierte FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid mit einer Konzentration von 3 μM eingesetzt. Im Gegensatz zu den oben durchgeführten K_D -Messungen ist das Verhältnis von $c(\text{Peptid}):K_D$ nun nicht mehr $c(\text{Peptid}):K_D < 0,1$, sondern das Peptid liegt im 10-fachen Überschuss vom K_D vor. Das hat zur Folge, dass das zugegebene 14-3-3-Protein sofort quantitativ an das vorgelegte Peptid bindet. Ein Anstieg der Anisotropie ist damit zunächst direkt

proportional zur Menge an zugegebenen 14-3-3-Protein. Sobald eine Sättigung eintritt, sollte die Anisotropie konstant bleiben. Sowohl der Anstieg der Anisotropie bis zur Sät-

	K_D / nM	Stöchiometrie N
1. Messung	90,90	1,07
2. Messung	61,35	0,98
3. Messung	81,97	0,88
Durchschnitt	$78,07 \pm 15,16$	$0,98 \pm 0,10$

Tabelle 11: Ergebnisse der ITC-Messungen des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptids mit His6-14-3-3ζ(VL)

tigung als auch der Bereich der Sättigung verhalten sich näherungsweise linear. Mit linearer Regression lassen sich für diese beiden Bereiche Geraden bestimmen. Der Schnittpunkt dieser Geraden gibt die Menge an 14-3-3-Protein im Gleichgewicht an. Für eine 1:1-Stöchiometrie bezogen auf ein 14-3-3-Dimer wären es in diesem Fall $3 \mu\text{M}$ und für eine 1:2-Stöchiometrie bezogen auf ein 14-3-3-Dimer, wären es in diesem Fall $1,5 \mu\text{M}$.

In einer Triplikatsmessung wurde das His6-14-3-3 ζ (VL)-Dimer von zwei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen ausgehend in einer 1:1-Verdünnungsreihe auf das zweifach phosphorylierte FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid ($3 \mu\text{M}$) titriert und die Anisotropie-Messung, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, durchgeführt.

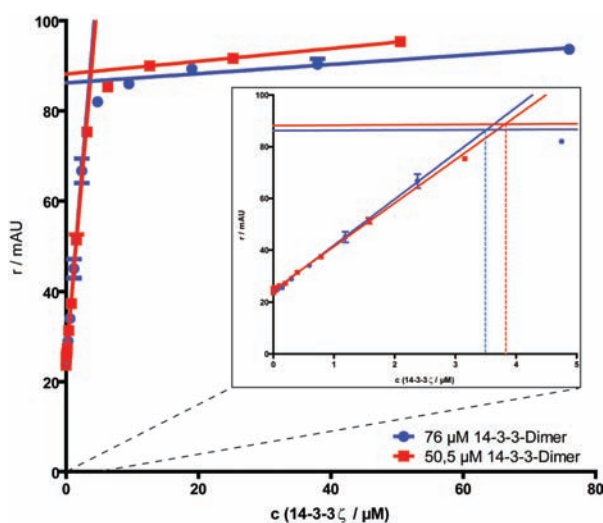


Abbildung 4.18: Bestimmung der Bindungsstöchiometrie mittels FP. $3 \mu\text{M}$ zweifach phosphoryliertes FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259 wurden mit His6-14-3-3 ζ (VL) von zwei verschiedenen Konzentrationen ausgehend als Triplikat titriert. Durch lineare Regression wurden aus den beiden linearen Teilen der Kurven jeweils eine Gerade berechnet. Der Schnittpunkt der Geraden gibt die Konzentration des 14-3-3-Dimers im Gleichgewicht an. Zur besseren Übersicht ist eine Vergrößerung des Schnittpunkts eingefügt.

Abbildung 4.18 zeigt die Ergebnisse der Messung. Wie zu erkennen ist, unterscheidet sich der Kurvenverlauf für die beiden unterschiedlichen Titrations kaum voneinander. Die Schnittpunkte der jeweiligen Geraden der linearen Regression liegen bei $3,5$ und $3,8 \mu\text{M}$, was im Durchschnitt $3,65 \mu\text{M}$ ergibt. Damit liegt der Wert näher an $3 \mu\text{M}$ als an $1,5 \mu\text{M}$. Somit zeigt auch diese Messung, dass der 14-3-3/C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Bindung vermutlich eine 1:1-Stöchiometrie bezogen auf ein 14-3-3-Dimer zu Grunde liegt, wie es in Abbildung 4.16A und C postuliert wird.

Fasst man die Ergebnisse der ITC- und FP-Messungen zur Bestimmung der Bindungsstöchiometrie zusammen, kann man praktisch ausschließen, dass das zweifach phosphorylierte C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid mit einer 1:2 Stöchiometrie bezogen auf ein His6-14-3-3 ζ (VL)-Dimer bindet (siehe Abbildung 4.16B). Ob die Bindung aber wie in 4.16A oder C dargestellt stattfindet, kann mit diesen Methoden nicht ausreichend geklärt werden. Dazu ist es notwendig, den Komplex mit strukturellen Methoden zu untersuchen.

4.4.2. Strukturbiologische Untersuchung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung

Für die Kristallisation des C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptids im Komplex mit 14-3-3 wurde 14-3-3 $\zeta\Delta$ C exprimiert und aufgereinigt wie in 3.5.1 -3.5.4 beschrieben.

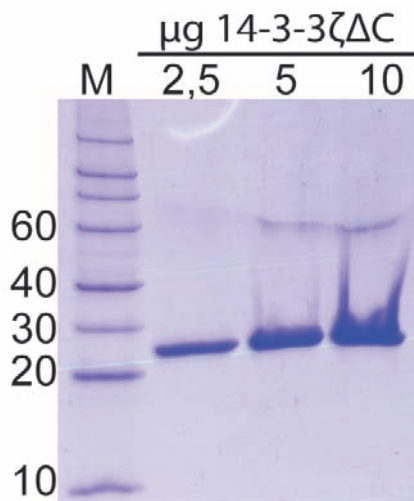


Abbildung 4.19: Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten 14-3-3 $\zeta\Delta$ C-Proteins. Unterschiedliche Mengen 14-3-3 $\zeta\Delta$ C wurden über ein 12%iges Tris-Tricin-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt (3.6.1). Als Größenstandard diente der Roti[®]-Mark 10-150 (M, siehe 3.1.6). Die Laufhöhen für 10, 20, 30, 40 und 60 kDa sind beschriftet.

Verhältnis von 0,5:1,0 bezogen auf ein 14-3-3-Monomer in Komplettierungspuffer gemischt und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die 14-3-3 $\zeta\Delta$ C-Konzentration betrug dabei 10 mg \times ml⁻¹ und das C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid hatte eine Konzentration von 0,2 mM im Komplettierungsansatz. Wie unter 3.8.1 geschildert, wurden 100 nl der Proteinklösung 1:1 mit Reservoirlösung („JCSG Core Suites I-IV“) gemischt, bei 4°C mit der Methode der sitzenden Tropfens inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf Kristallwachstum überprüft. In Abbildung 4.20 sind zwei Bedingungen gezeigt, bei denen sich nach etwa 14 Tagen initial Kristalle gebildet hatten. Obwohl die chemische Zusammensetzung der Bedingungen unterschiedlich ist, haben die Kristalle die gleiche Morphologie.

Der Versuch, die Kristalle mit der Methode des hängenden Tropfens zu reproduzieren, war nicht erfolgreich. Daher wurden die Kristalle im sitzenden Tropfen reproduziert (3.8.1, 3.8.2 und Abbildung 3.8). Hierfür wurde die Proteinkonzentration von 16-20 mg \times ml⁻¹ variiert, wobei das Verhältnis von 14-3-3 $\zeta\Delta$ C zu C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid unverändert blieb. Die optimierten Bedingungen, bei denen Kristalle erhalten wurden sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Nach der Ultrafiltration wurde der His-Tag durch Zugabe von TEV-Protease abgespalten und das Protein über preparative Gelfiltration in Dialyse-Puffer aufgereinigt (3.1.13, 3.5.6 und 3.5.7). Die Konzentration des aufgereinigten 14-3-3 $\zeta\Delta$ C wurde UV-spektroskopisch bestimmt (3.6.2). Dafür wurden die berechneten Parameter $M = 26688,2 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ und $E = 27515 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ eingesetzt. Über SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 wurde die Reinheit auf über 95% geschätzt (3.6.1 und siehe Abbildung 4.19).

Für die Kristallisation des Komplexes wurden C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid und 14-3-3 $\zeta\Delta$ C in einem molaren

Bezeichnung	chemische Zusammensetzung	
	initial	optimiert
JCSG CoreIV A2	0,1 M Glycin pH 10,5 0,2 M M LiSO ₄ 1,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,8 M K ₂ HPO ₄ 10 mg × ml ⁻¹ 14-3-3ζΔC	0,1 M Glycin pH 11,5-12,5 0,2 M M LiSO ₄ 1,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,8 M K ₂ HPO ₄ 20 mg × ml ⁻¹ 14-3-3ζΔC
JCSG CoreIV H6	0,1 M Na-Acetat pH4,5 0,8 M NaH ₂ PO ₄ 1,2 M K ₂ HPO ₄ 10 mg × ml ⁻¹ 14-3-3ζΔC	0,1 M Na-Acetat pH 5,5-7,5 0,8 M NaH ₂ PO ₄ 1,2 M K ₂ HPO ₄ 16 mg × ml ⁻¹ 14-3-3ζΔC

Tabelle 12: Initiale und optimierte Kristallisationsbedingungen des Komplexes aus C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid und 14-3-3ζΔC.

Die reproduzierten Kristalle wiesen die gleiche Morphologie wie die initialen Kristalle auf (nicht gezeigt). Kristalle, die ausgehend von der JCSG CoreIV H6-Bedingung (siehe Abbildung 4.20B) mit 16 mg × ml⁻¹ Protein und 0,1 M Na-Acetat pH 7,0 entstanden, wurden durch Zugabe von Saccharose kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff eingefroren (3.8.3). Mit Synchrotron-Strahlung wurde ein Datensatz bis 1,95 Å aufgenommen und mit der Software *XDS* ausgewertet (3.8.5).

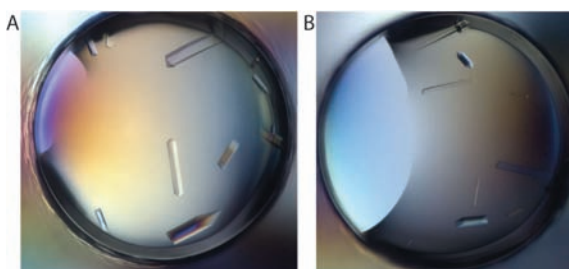


Abbildung 4.20: Initiale Kristalle des Komplexes aus 14-3-3ζΔC und C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259. Die Kristalle entstanden bei zwei chemisch unterschiedlichen Bedingungen, wiesen aber die gleiche Morphologie auf. (A) JCSG CoreIV A2. (B) JCSG CoreIV H6.

Über molekularen Ersatz mit dem bekannten Strukturmodell des 14-3-3ζ-Proteins in Komplex mit einem C-RAF-Phosphopeptid (PDB ID: 3NKX) und der Software *Phaser* konnten Phaseninformationen für das neue Modell berechnet werden (3.8.5). Die Verfeinerung des erhaltenen Modells erfolgte wie unter 2.8.5 beschrieben mit der Software *REFMAC* und der Software *Coot*. Die Verteilung der Diederwinkel Φ und Ψ des finalen Strukturmodells ist in Abbildung A.4 im Anhang in einem Ramachandran-Diagramm zusammengefasst (Ramachandran *et al.*, 1963). Tabelle 19 im Anhang fasst die Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung zusammen.

Abbildung 4.21 zeigt das finale Strukturmodell. Das 14-3-3ζ-Dimer zeigt die typische W-förmige Struktur, die sich aus zwei α -helikalen Monomeren zusammensetzt. Ein

Monomer beinhaltet in seiner Bindegroble die S233-vermittelte Bindestelle des C-RAF-Peptids und das andere die S259-vermittelte in einer elongierten Konformation (Abbildung 4.21A und B). Die AS, die die beiden S233- und S259-Bindestellen verbinden (AS

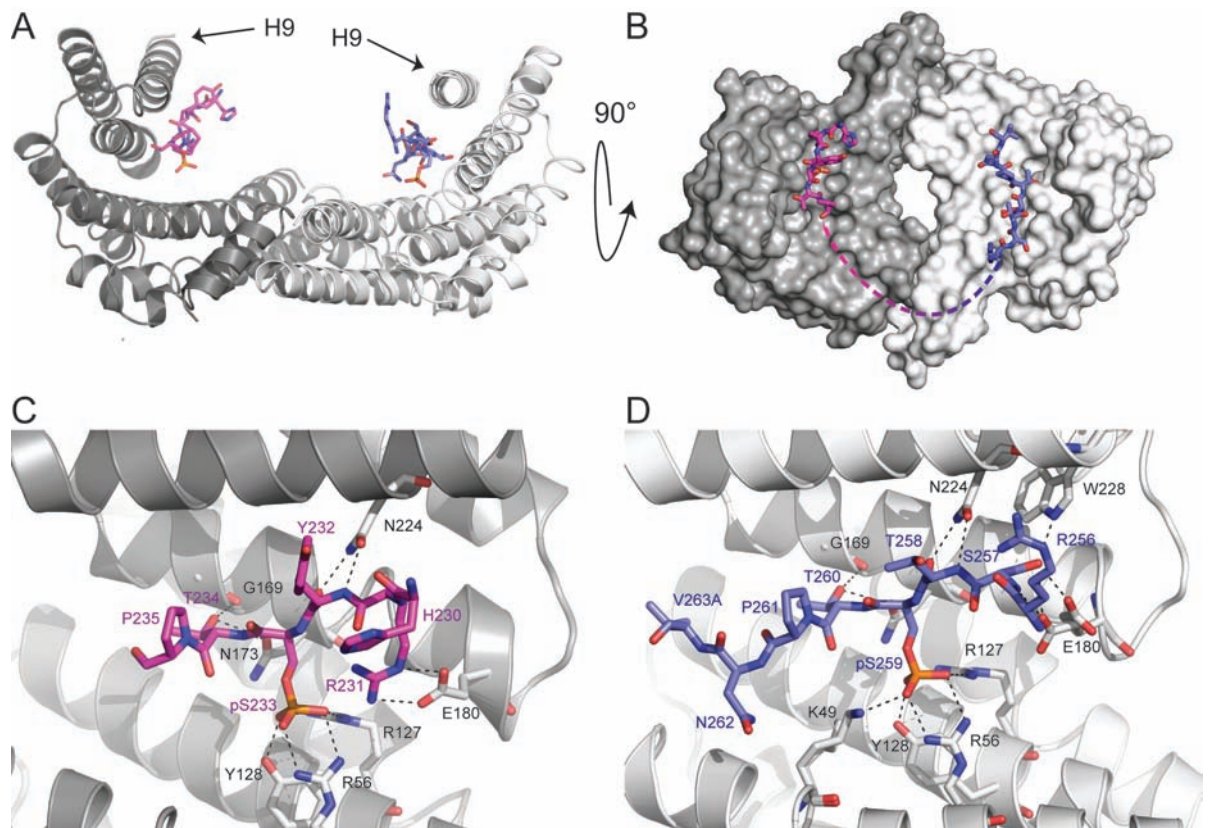


Abbildung 4.21: Strukturmodell des Komplexes von C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 mit 14-3-3ζ. (A) Das 14-3-3ζ-Dimer ist als Bändermodell mit einem Monomer in hellgrau und einem in dunkelgrau gezeigt. Die Bindegroble des dunkelgrauen Monomers beinhaltet die pS233-Bindestelle des C-RAF-Peptids (magenta), die des hellgrauen Monomers die pS259-Bindestelle (blau). Das C-RAF-Peptid ist als Stäbchenmodell gezeigt. (B) Blick von oben auf das um 90° gedrehte Strukturmodell. Die Helices 9 (H9, siehe Pfeil) sind gelöscht, um bessere Sicht zu erhalten. 14-3-3ζ ist in einer Oberflächendarstellung gezeigt und die einzelnen Monomere wie in (A) gefärbt. Das C-RAF-Peptid ist in elongierter Konformation in den Bindegroblen gebunden (magenta und blau). Die in dem Modell nicht sichtbare Verbindung der S233- und S259-Bindestellen ist in der Abbildung als gestrichelte Linie angedeutet, die vom C-Terminus der pS233-Bindestelle (magenta) zum N-Terminus der pS259-Bindestelle (blau) verläuft. Die polaren Kontakte der einzelnen AS der pS233- (magenta) und pS259 (blau)-Bindestelle des C-RAF-Peptids zum 14-3-3ζ-Protein sind jeweils in (C) und (D) im Detail abgebildet.

236 bis 255), sind in dem Strukturmodell nicht sichtbar und sind schematisch als gestrichelte Linie dargestellt, die den C-Terminus der S233-Bindestelle mit dem N-Terminus der S259-Bindestelle verbindet. Abbildungen 4.21C und D zeigen die S233- und S259-vermittelten Bindestellen in dem 14-3-3ζ-Protein jeweils im Detail. Jede Bindestelle wird jeweils über das pS koordiniert und in der 14-3-3-Bindegroble orientiert. Dies geschieht

über die Seitenketten der konservierten AS R56, R127 und Y128 des 14-3-3 ζ (siehe Abschnitt 1.3.3). Im Fall der S259-vermittelten Bindung ist zusätzlich K49 an der Bindung des pS beteiligt. Dieses wurde jedoch in einer doppelten Konformation gefunden, was darauf hinweist, dass diese Seitenkette recht flexibel ist und nur wenig zur Bindung des pS259 beiträgt. Je nach Aminosäuresequenz vermitteln weitere Seitenketten polare Kontakte zum 14-3-3-Protein.

Um das pS233 konnten N-terminal drei und C-terminal zwei AS in die Elektronendichte eingebaut werden. Für die pS259-Bindestelle war Elektronendichte ebenfalls für drei AS N-terminal und für vier AS C-terminal vom S259 aus gesehen sichtbar. Je weniger definiert die Elektronendichte an einem bestimmten Ort im Proteinkristall ist, desto flexibler sind die dort lokalisierten Atome. Das deutet daraufhin, dass die C-terminalen AS der S233-Bindestellen flexibel sind. Diese Tatsache steht im Einklang mit den biochemisch erhaltenen Bindungsdaten, die zeigten, dass die S233-vermittelte Bindung von C-RAF an das 14-3-3 ζ -Protein etwa eine Größenordnung schwächer ist als die S259-vermittelte Bindung (siehe Abschnitt 4.4.1 und Tabelle 10).

Wie bereits erwähnt, sind die AS, die zwischen den beiden pS233- und pS259-Bindestellen liegen, in dem Strukturmodell nicht sichtbar, da sie keine definierte Elektronendichte liefern. Das deutet darauf hin, dass sie flexibel sind. Diese Flexibilität liegt vermutlich darin begründet, dass sie nicht an das 14-3-3 ζ -Protein binden. Die Frage, in welcher Form das zweifach phosphorylierte C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid an das 14-3-3 ζ -Dimer bindet (siehe Abschnitt 4.4.1 und Abbildung 4.16), kann daher nicht direkt beantwortet werden.

Es ist notwendig, die symmetrieverwandten Moleküle im Kristall zu betrachten. Abbildungen 4.22A und B zeigen die relative Lage der 14-3-3 ζ -Dimere im Kristall zueinander in zwei unterschiedlichen Perspektiven. In den Abbildungen 4.22C und D ist zur Verdeutlichung schematisch die Lage der 14-3-3 ζ -Dimere zueinander dargestellt, wie sie jeweils in den Abbildungen 4.22A und B gezeigt sind. Außerdem sind jeweils die Abstände von der letzten in der Kristallstruktur sichtbaren AS der S233-Bindestelle (P235) bis zur ersten sichtbaren AS der S259-Bindestelle (R256) in den drei möglichen *trans*-Orientierungen eingezeichnet. Auch der Abstand der *cis*-Orientierung ist markiert. Für alle drei denkbaren *trans*-Orientierungen verläuft die direkte Messung dabei durch die 14-3-3-Proteine. Das bedeutet, dass diese Abstandsmessung nur eine Näherung sein kann, weil die Peptidkette der 19 nicht sichtbaren AS nicht in der elongierten Konformation verlaufen könnte um das P235 mit dem R256 zu verbinden.

Wenn man von den durchschnittlichen Atomabständen von C_{α} -C $\approx 1,5 \text{ \AA}$, C-N $\approx 1,4 \text{ \AA}$ und N- C_{α} $\approx 1,4 \text{ \AA}$ in einer Peptidbindung ausgeht, könnte ein 19mer Peptid in elongierter Konformation eine Distanz von etwa 49 \AA überbrücken. Somit kann eine *trans*-Bindung des Peptids wie in in Abbildung 4.22B und D, bei der der Abstand $53,1 \text{ \AA}$ beträgt, ausgeschlossen werden.

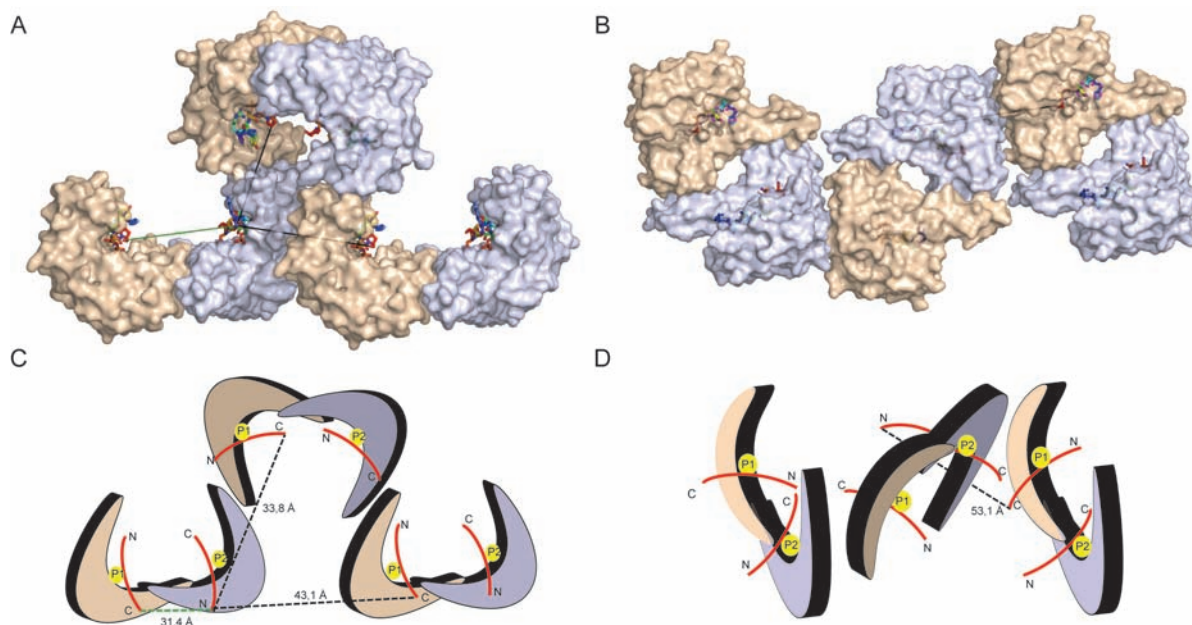


Abbildung 4.22: Symmetrieverwandte C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS255/14-3-3 ζ -Komplexe im Proteinkristall. Gezeigt sind zwei unterschiedliche Perspektiven (A) und (B) der Komplexe als Oberflächendarstellung. 14-3-3 ζ -Monomere, die die S233-Bindestelle beinhalten, sind jeweils beige und 14-3-3 ζ -Monomere, die die S259-Bindestelle beinhalten, jeweils hellblau gefärbt. Die C-RAF-Peptide sind jeweils mit einem Spektrum gefärbt, das vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot) verläuft. In (C) und (D) ist die Lage der C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS255/14-3-3 ζ -Komplexe im Proteinkristall wie in (A) und (B) schematisch dargestellt. Die 14-3-3 ζ -Monomere sind wie in (A) und (B) gefärbt und P1 und P2 entsprechen jeweils den phosphorylierten Serinen S233 und S259. Die Orientierung der gebundenen Peptide ist durch Markierung des N- und C-Terminus hervorgehoben. Abstände der drei möglichen *trans*-Orientierungen des Peptids sind in schwarz und die *cis*-Orientierung in grün markiert.

Ob die Bindung wie in Abbildung 4.22A und C mit $33,8 \text{ \AA}$ und $43,1 \text{ \AA}$ möglicherweise in *trans* verlaufen könnten, bleibt dagegen Spekulation. Jedoch ist zu beachten, dass die Bindung in *cis* keine sterischen Konflikte aufweist. Zudem ist der direkt gemessene Abstand mit $31,4 \text{ \AA}$ so kurz, dass die 19 AS in nicht elongierter Konformation flexibel bleiben könnten. Das würde die fehlende Elektronendichte der Kristallstruktur an dieser Stelle erklären.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Diphosphopeptid so an das 14-3-3 ζ -Dimer bindet, wie es in Abbildung 4.16A gezeigt wird, obwohl die 19 AS, die das P235 und R256 miteinander verbinden, in dem Strukturmodell nicht sichtbar

sind. Eine mögliche Bindung in *trans* wie in Abbildung 4.16C kann aber nicht vollends ausgeschlossen werden.

4.4.3. Zellbiologische Untersuchung

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, dass das C-RAF-Protein sowohl über die S233- als auch über die S259-Bindestelle an das 14-3-3 ζ -Protein binden kann, sollte im Folgenden untersucht werden, welche Bedeutung die S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung im zellulären Kontext hat.

Dazu wurde zunächst der Einfluss der S233-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung auf die Lokalisation des C-RAF-Proteins in HEK293T-Zellen analog zu den Versuchen für die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung untersucht (siehe Abschnitt 1.5.4). Dafür wurden HEK293T-Zellen auf 8-Kammer-Deckgläser ausgesät und mit kationischen Lipiden mittels dem FuGENE[®]-Transfektionsreagenz mit WT oder mutiertem GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C transfiziert (3.4.4). Anschließend wurde die Lokalisation des GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C-Fusionsproteins als WT oder Mutante konfokalmikroskopisch untersucht (3.4.8).

Abbildung 4.23A zeigt, dass die Mutation S233A, einen bedeutenden Einfluss auf die Lokalisation des GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C-Proteins hat. Im Gegensatz zum GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C-WT-Protein, das hauptsächlich im CP lokalisiert ist, da es an 14-3-3 gebunden vorliegt, ist die 14-3-3-Bindemutante GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C-S233A überwiegend im ZK lokalisiert. Ebenso verhält sich die S259A-Mutante. Das bedeutet, dass in serumfrei kultivierten HEK293T-Zellen C-RAF offensichtlich sowohl am S233 als auch am S259 phosphoryliert vorliegt und somit wahrscheinlich über beide 14-3-3-Bindestellen an 14-3-3-Dimere binden kann, wie in den Abbildungen 4.16A und 4.21B gezeigt ist.

Bei genauerer Betrachtung fällt weiterhin auf, dass die S233A-Mutante eine etwas andere subzelluläre Verteilung aufweist als die S259A-Mutante. Um diesen qualitativen Eindruck zu überprüfen, wurden die GFP-Intensitäten in den konfokalmikroskopisch aufgenommenen Bildern die Software *ImageJ* quantifiziert. Die Intensität des Hintergrunds wurde von den Intensitäten im CP und ZK abgezogen und aus diesen der Quotient ZK/CP gebildet. Dafür wurden mindestens 28 Zellen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten analysiert. Aus den erhaltenen Quotienten wurde der Median gebildet und dessen Abweichung (MAD) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.23B gezeigt.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass der Unterschied zwischen den 14-3-3 Bindemutanten zu dem GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C-WT, das ein Verhältnis von CP/ZK von $0,34 \pm 0,07$ aufweist, erwartungsgemäß signifikant ist. Weiterhin zeigt sich jedoch, dass auch ein si-

gnifikanter Unterschied zwischen der S233A 14-3-3-Bindemutante des und der S259A 14-3-3-Bindemutante besteht. Das Verhältnis ZK/CP ist für das an S259 mutierte Pro-

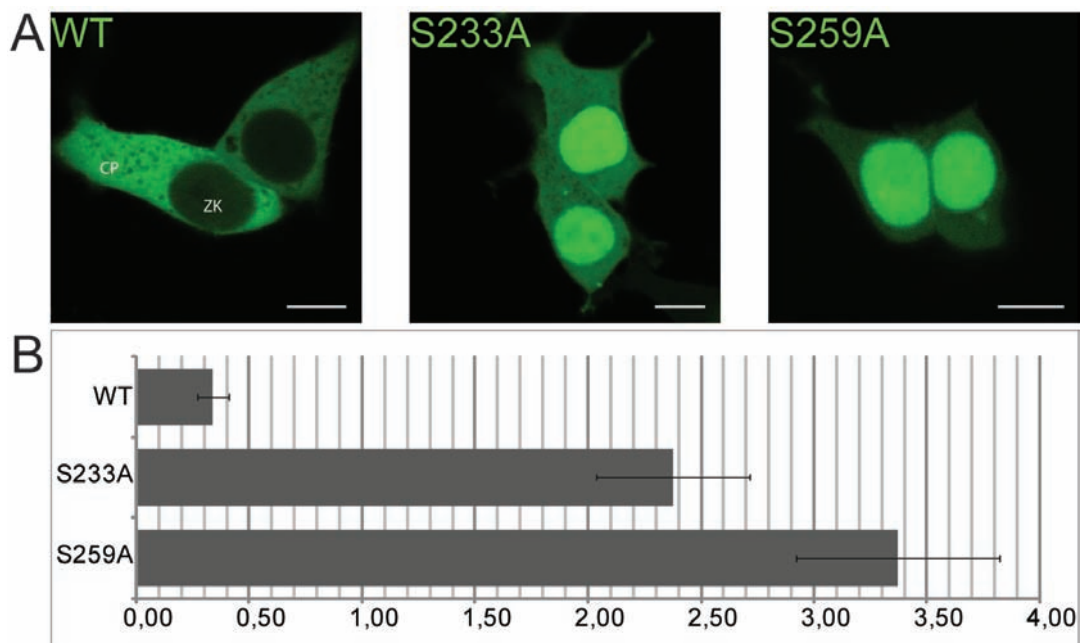


Abbildung 4.23: Lokalisation von GFP-C-RAF₃₃₀ΔC in HEK293T-Zellen. (A) Das N-terminal mit GFP fusionierte und C-terminal verkürzte C-RAF₃₃₀ΔC ist als WT überwiegend im CP lokalisiert. Die 14-3-3-Bindemutanten GFP-C-RAF₃₃₀ΔC S233A und S259A dagegen zeigen eine überwiegende Lokalisation im ZK. (B) Die Quantifizierung der GFP-Intensitäten erfolgte durch die Software *ImageJ*. Das Verhältnis der Intensitäten von ZK zu CP ist signifikant unterschiedlich sowohl für das GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-WT und die 14-3-3-Bindemutanten als auch für die GFP-C-RAF₃₃₀ΔC Mutanten untereinander. Es wurde der Median der ZK/CP-Quotienten ermittelt und aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die absolute Abweichung vom Median (MAD) dar. Maßstabsleiste = 10 μm.

tein mit $3,37 \pm 0,45$ deutlicher höher als für das an S233 mutierte Protein, das einen ZK/CP-Quotienten von $2,38 \pm 0,34$ aufweist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutation der S233-Bindestelle des C-RAF-Proteins zwar einen deutlichen Einfluss auf die Lokalisation des GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins hat, der aber nicht so groß ist wie die Mutation der S259-Bindestelle, da weniger Protein in den ZK transloziert. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass, auch wenn die S233-Bindestelle mutiert ist, noch C-RAF-Protein im CP vorliegt. Dieses ist vermutlich über die S259-Bindestelle an 14-3-3-Proteine gebunden. Zusammenfassend scheint die S259-Bindestelle des C-RAF Proteins für dessen Lokalisation im CP wichtiger zu sein. Diese Daten stehen im Einklang mit den erhaltenen biochemischen und strukturbiologischen Daten, die belegen, dass die Bindung über die S233-Bindestelle an das 14-3-3-Protein eine Größenordnung schwächer ist als die über

die S259-vermittelte Bindung. Die S233-Bindestelle stellt somit eine zusätzliche aber weniger bedeutsame 14-3-3-Bindestelle dar.

Da die Mutation der S233A-Bindestelle aber zu einer signifikant unterschiedlichen Lokalisation des GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins in HEK293T-Zellen verglichen mit dem WT-Protein führt, wurde als nächstes überprüft, ob für dieses Protein ebenso wie für das am S259-mutierte eine Co-Lokalisation mit dem H-RAS Protein beobachtet werden kann. Dies würde darauf hindeuten, dass auch das am S233-mutierte C-RAF₃₃₀ΔC-Protein in der Lage ist, ohne externen Stimulus mit RAS zu interagieren, wie es für das am S259-mutierte Protein bereits gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 1.5.4, 4.3.1 und Abbildung 4.12). Dafür wurden HEK293T-Zellen auf 8-Kammer-Deckgläser ausgesät und mit dem FuGENE®-Transfektionsreagenz mit GFP-C-RAF₃₃₀ΔC als WT oder 14-3-3-Bindemutante (S233A oder S259A) und mCherry-H-RAS co-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend konfokalmikroskopisch auf die Lokalisation des GFP-C-RAF₃₃₀ΔC- und des mCherry-H-RAS-Proteins hin untersucht.

Abbildung 4.24 zeigt, dass im Gegensatz zum WT-Protein GFP-C-RAF₃₃₀ΔC, das überwiegend im CP lokalisiert ist, die 14-3-3-Bindemutanten (S233A und S259A) eine Co-Lokalisation mit mCherry-H-RAS-WT aufweisen, wenn sie zusammen mit diesem heterolog exprimiert werden. Das verdeutlicht, dass auch die Mutation am S233A ausreicht, das GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Protein aus dem CP heraus an die Plasmamembran zu bringen, wo es mit H-RAS interagieren kann. Die S233-vermittelte Wechselwirkung von C-RAF an 14-3-3-Proteine ist zwar schwächer als die S259-vermittelte (siehe Abschnitt 4.4.1, Abbildung 4.15 und Tabelle 10) und eine Mutation der S233-Bindestelle hat signifikant schwächere Auswirkungen auf die Lokalisation des GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Protein in HEK293T-Zellen als eine Mutation der S259-Bindestelle (siehe Abbildung 4.23). Dennoch reicht diese Mutation aus, um das GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Protein ohne externen Stimulus an die Plasmamembran translozieren zu lassen, wo es mit RAS interagieren kann. Das lässt vermuten, dass eine Mutation der S233-Bindestelle in dem Volllänge-C-RAF-Protein eine Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs zur Folge haben könnte. Dieser wird, wie zuvor erwähnt, durch die Rekrutierung von RAF an die Plasmamembran initiiert und eine derartige Aktivierung konnte für C-RAF-Proteine, die an der S259-Bindestelle mutiert sind, bereits gezeigt werden (siehe 4.3.2 und Abbildung 4.13).

Daher wurde als nächstes der physiologische Effekt der S233A-Mutation des GFP-C-RAF-Proteins in HEK293T-Zellen untersucht und mit dem Effekt der S259A-Mutation verglichen. Dafür wurde wie in Kapitel 4.3.2 der Einfluss von 14-3-3-Bindemutanten des GFP-C-RAF-Proteins auf den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg betrachtet. Dies wur-

de, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, über den Vergleich der ERK1/2-Phosphorylierung durchgeführt (siehe Abbildung 4.13).

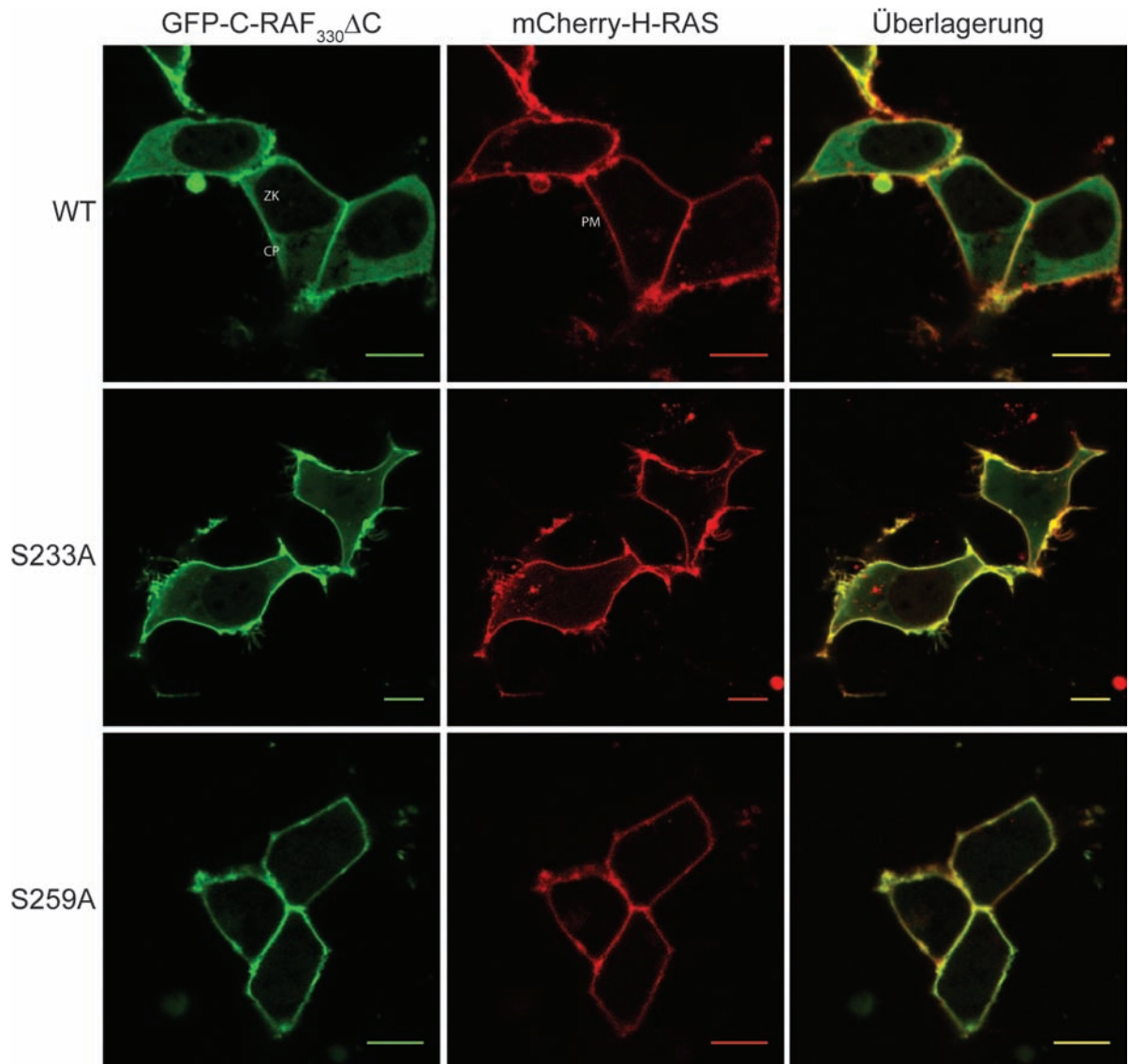


Abbildung 4.24: Co-Expression von GFP-C-RAF_{330ΔC} und mCherry-H-RAS in HEK293T-Zellen. In HEK293T-Zellen wurde GFP-C-RAF_{330ΔC} als WT oder 14-3-3-Bindemutante (S233A oder S259A) zusammen mit mCherry-H-RAS-WT heterolog co-exprimiert. PM = Plasmamembran. Maßstabsleiste = 10 μm.

Dafür wurden HEK293T-Zellen mit dem FuGENE®-Transfektionsreagenz mit GFP-C-RAF(VL) als WT oder 14-3-3-Bindemutante (S233A oder S259A) transfiziert. Nach einem Mediumwechsel in serumfreies Medium wurden die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert, bevor Zelllysate aus den einzelnen Proben hergestellt wurde (3.4.4 und 3.4.5). Je Probe wurden 20 μl des Zelllysats über SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt

und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (3.6.1 und 3.4.6). Anschließend wurden die Nitrocellulosemembranen mit Antikörpern gegen GFP, ERK1/2 und pERK1/2 mit den gleichen Konzentration und unter den gleichen Bedingungen, wie unter 3.4.6 und 4.3.2 beschrieben, behandelt. Der so entstandene Immunblot ist in Abbildung 4.25A gezeigt.

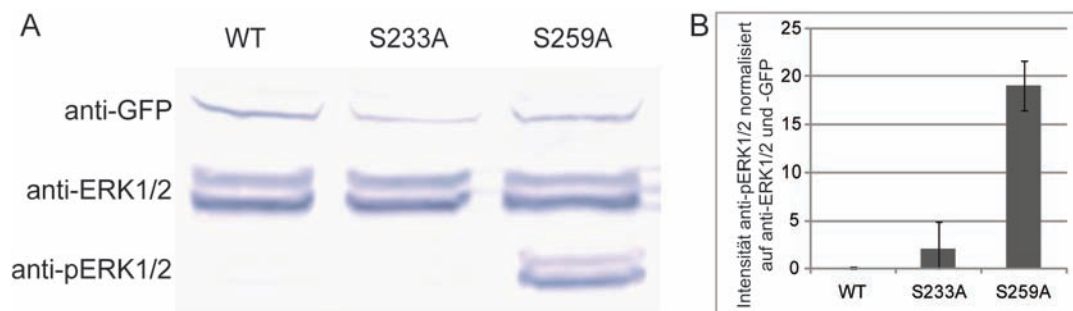


Abbildung 4.25: Immunblot von Zelllysate aus transfizierten HEK293T-Zellen. (A) HEK293T-Zellen wurden mit DNS, die entweder für GFP-C-RAF(VL) als WT oder 14-3-3-Bindemutante S233A oder S259A codierte, transfiziert und anschließend lysiert. Mit den entsprechenden Antikörpern kann der Anteil der Proteine GFP-C-RAF(VL), ERK1/2 und pERK1/2 in den Zelllysateproben verglichen werden. (B) Die Intensität der mit BCIP/NBT angefärbten Banden wurde mit der Software *ImageJ* ermittelt und der Anteil an pERK1/2 so auf den Gesamt-ERK1/2-Anteil und die transfizierten Zellen (GFP) normalisiert.

Wie auf dem Immunblot zu erkennen ist, sind die mit dem GFP-Antikörper detektierten Proteinbanden nicht gleich intensiv gefärbt. Um trotzdem den Anteil an phosphoryliertem ERK1/2 in den einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wurde in einem nächsten Schritt die Intensität der angefärbten Banden mit der Software *ImageJ* quantifiziert. Die Intensität der pERK1/2-Banden wurde auf die Intensität der ERK1/2- und GFP-Banden normalisiert und zur besseren Veranschaulichung mit 10^4 multipliziert. Das Ergebnis dieser quantitativen Auswertung ist in Abbildung 4.25B gezeigt.

Die quantitative Auswertung des Immunblots ergab, dass die S233A-Mutation des C-RAF(VL)-Proteins nicht zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führt, sich also so verhält wie das GFP-C-RAF(VL) WT-Protein. Im Gegensatz zu der S259A-Mutation scheint die S233A-Mutation des GFP-C-RAF(VL)-Proteins also nicht zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu führen. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung im zellulären Kontext offensichtlich weniger bedeutsam ist als die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung.

4.5. Stabilisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung durch Cotylenin A

4.5.1. Mögliche Stabilisierung der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung über die phosphorylierten Serine S233 und S259 vermittelt wird und eine Störung dieser Wechselwirkung eine Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs zur Folge hat. Eine Aktivierung dieses MAPK-Signalwegs wird häufig in Krebs beobachtet (Downward, 2003). Daher könnte die Stabilisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung ein sinnvoller therapeutischer Ansatz sein.

Zunächst muss jedoch untersucht werden, ob die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung für einen Stabilisator potenziell adressierbar ist. Ein bekannter Stabilisator einer 14-3-3-Wechselwirkung ist das Pflanzentoxin Fusicoccin A (FCA, siehe Abschnitt 1.2.2 und Ottmann *et al.* (2007a)). Dieses stabilisiert in Pflanzen einen Komplex aus einem 14-3-3-Protein und dem C-Terminus der Plasmamembran-H⁺-ATPase 2 (PMA2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde FCA eingesetzt, um zu überprüfen, ob es an Komplexe aus 14-3-3 und unterschiedlich langen C-RAF-Peptiden binden kann. Dafür wurden zwei C-RAF-Phosphopeptide verwendet: C-RAF_(255–264)pS259 und C-RAF_(255–260)pS259. Letzteres repräsentiert ein *mode* III-Bindemotiv, wie es die PMA2 aufweist, da es nach der +1-AS endet (siehe Abschnitt 1.2.2 und 1.3.3). Zunächst wurde durch ITC-Messungen die Affinität dieser beiden Phosphopeptide an 14-3-3 ζ bestimmt und miteinander verglichen. Dazu wurde das gleiche aufgereinigte His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein verwendet wie für die Versuche in Kapitel 4.4.1 (siehe Abbildung 4.14). Dieses wurde gegen ITC-Puffer mit pH 6,5 dialysiert und anschließend in diesem Puffer bei 30 °C mit 8 μ l-Aliquots

Titration	$K_D / \mu\text{M}$
His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF _(255–260) pS259	17,11 \pm 1,66
His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF _(255–264) pS259	11,68 \pm 2,57
His6-14-3-3 ζ (VL)/C-RAF _(255–260) pS259 mit FCA	2,60 \pm 0,36
His6-14-3-3 ζ (VL)/C-RAF _(255–264) pS259 mit FCA	n.m.

Tabelle 13: Ergebnisse der ITC-Messungen von His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF-Phosphopeptid beziehungsweise des His6-14-3-3 ζ (VL)/C-RAF-Komplexes mit FCA.

der jeweiligen C-RAF-Peptide titriert. Die Wärmeänderung wurde gemessen, wie unter 3.7.1 erläutert. Zudem wurde unter den gleichen Bedingungen einmal ITC-Puffer mit pH 6,5 auf das His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein titriert und die so erhaltenen Wärmeänderungen von den eigentlichen Messwerten abgezogen. Aus diesen wurden mittels der Software *Origin7* die gewünschten Parameter bestimmt. Die Messungen wurden unabhängig voneinander jeweils dreimal durchgeführt.

Abbildungen 4.26A und B zeigen die Ergebnisse der Messungen. Für beide Titrationen wurden Wärmeänderungen gemessen, die für eine exotherme Reaktion sprechen. Aus den Messdaten wurden die Bindungskonstanten für die jeweilige Reaktion bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Für die beiden unterschiedlich langen C-RAF-Phosphopeptide wurden ähnliche Bindungskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich bestimmt. Dies ist in guter Übereinstimmung zu dem zuvor durch FP-Messungen bestimmten K_D -Wert für die Bindung des FAM-C-RAF_(254–264)pS259-Peptids an His6-14-3-3 ζ (VL) von $16,67 \pm 1,95 \mu\text{M}$ (siehe Abschnitt 4.4.1 und Tabelle 10). Der gemessene K_D -Wert für das längere C-RAF_(255–264)pS259-Peptid liegt mit $11,68 \pm 2,57 \mu\text{M}$ etwas unter dem für das kürzere C-RAF_(255–260)pS259-Peptid gemessenen Wert von $17,11 \pm 1,66 \mu\text{M}$. Dieses Ergebnis wiederum passt gut zu den strukturbiologischen Daten, die zeigen, dass auch die AS C-terminal vom pS259 des C-RAF-Peptids polare Kontakte zum 14-3-3 ζ -Protein ausbilden und somit zur Bindung beitragen (siehe Abbildung 4.21D).

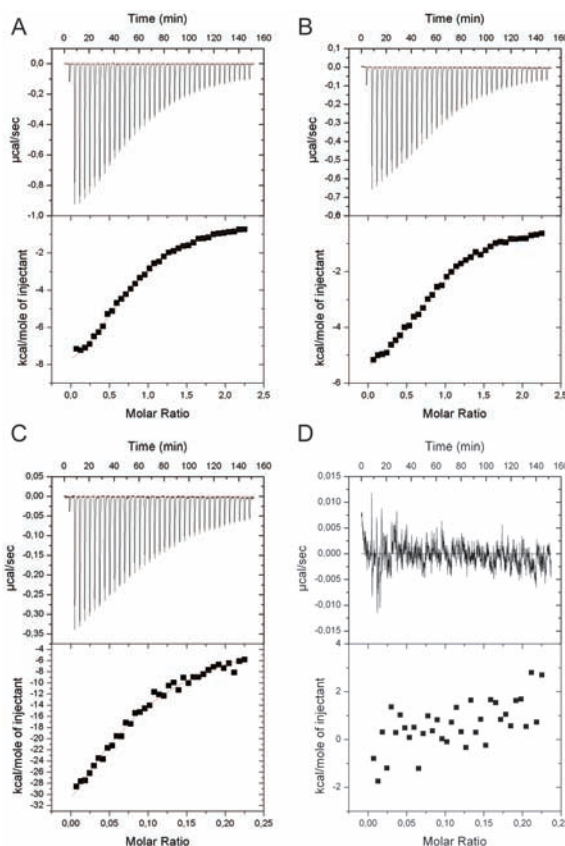


Abbildung 4.26: ITC-Messung von His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF-Peptiden ohne und mit FCA. Zunächst wurde His6-14-3-3 ζ (VL) mit C-RAF_(255–260)pS259 (A) oder C-RAF_(255–264)pS259 (B) titriert und aus der gemessenen Wärmeänderung die Bindungskonstante bestimmt. Anschließend wurde FCA auf einen Komplex aus His6-14-3-3 ζ (VL) und C-RAF_(255–260)pS259 (C) oder C-RAF_(255–264)pS259 (D) titriert und aus der gemessenen Wärmeänderung die Bindungskonstante für FCA an den Komplex bestimmt. Für den Komplex aus His6-14-3-3 ζ (VL) und C-RAF_(255–264)pS259 (D) war für die Titration mit FCA keine Wärmeänderung zu beobachten.

Als nächstes wurden 8 μl -Aliquots einer 50 μM -FCA-Lösung auf einen Komplex aus 500 μM C-RAF_(255–260)pS259- beziehungsweise C-RAF_(255–264)pS259-Peptid und 50 μM His6-14-3-3 ζ (VL) titriert und die Wärmeänderung gemessen (siehe 3.7.1). Die Ergebnisse

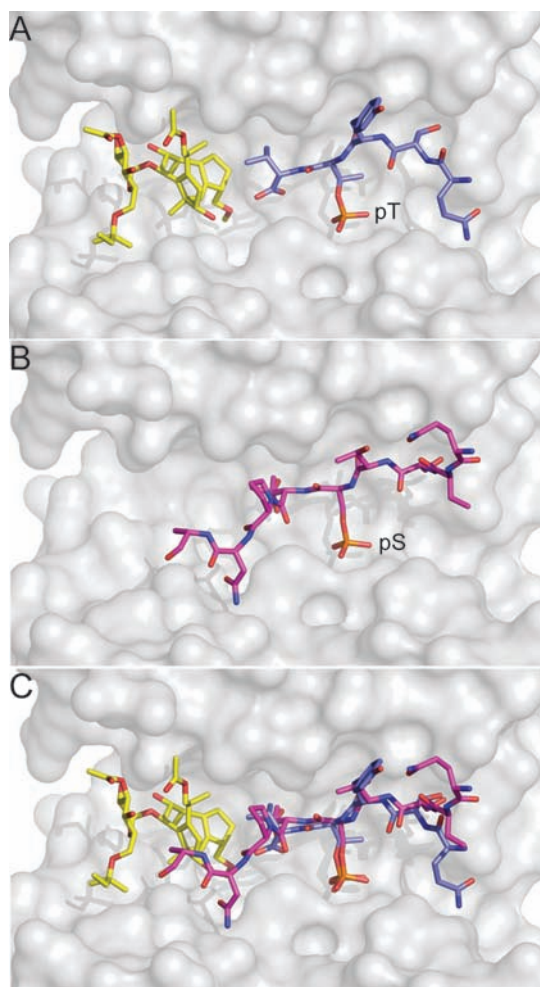


Abbildung 4.27: Vergleich der Bindegruben für einen möglichen Stabilisator. (A) Ternärer Komplex aus 14-3-3c (graue Oberfläche), einem *mode* III-Phosphopeptid der PMA2 (blau, Stäbchenmodell, pT beschriftet) und FCA (gelb, Stäbchenmodell) (PDB ID: 1O9F). (B) Binärer Komplex aus 14-3-3 ζ (graue Oberfläche) und dem *mode* I-Phosphopeptid der S259-Bindestelle aus C-RAF (magenta, Stäbchenmodell, pS beschriftet) (siehe Abschnitt 4.4.2). (C) Überlagerung der Strukturmodelle aus (A) und (B).

der Titrationsen sind in Abbildungen 4.26C und D dargestellt. Während bei der Titration von FCA auf den Komplex aus His6-14-3-3 ζ (VL) und C-RAF_(255–260)pS259 (Abbildung 4.26C) eine deutliche Wärmeänderung stattfindet, die für eine exotherme Reaktion spricht, ist bei der Titration von FCA auf den Komplex aus His6-14-3-3 ζ (VL) und C-RAF_(255–264)pS259 keine Wärmeänderung zu beobachten (Abbildung 4.26D). Dies spricht dafür, dass FCA an den Komplex aus His6-14-3-3 ζ (VL) und dem (verkürzten) C-RAF_(255–260)pS259-*mode* III-Peptid mit einem K_D -Wert von $2,60 \pm 0,36 \mu\text{M}$ binden kann (siehe Tabelle 13). Eine Bindung an den Komplex aus dem His6-14-3-3 ζ (VL) und dem längeren *mode* I-Peptid C-RAF_(255–264)pS259 ist anscheinend nicht möglich. Es scheint also in dem 14-3-3/C-RAF_(255–260)pS259-Komplex eine für FCA adressierbare Bindegrube zu geben, die in dem Komplex aus

14-3-3 und C-RAF_(255–264)pS259 so verändert ist, dass FCA nicht mehr binden kann.

Diese Beobachtung lässt sich durch strukturbiologische Daten erklären (siehe Abbildung 4.27). In dem Komplex aus PMA2 und 14-3-3c (siehe Abschnitt 1.2.2 und Abbildung 4.27A) ist ausreichend Platz für den Stabilisator FCA, da das *mode* III-PMA2-Peptid nach der +1-AS endet. Betrachtet man aber den Komplex aus 14-3-3 ζ und der *mode* I-S259-Bindestelle

aus C-RAF, ist diese Bindegroße zum Teil bereits von den C-terminal auf die +1-AS folgenden AS des C-RAF-Peptids eingenommen und daher deutlich kleiner (siehe Abbildung 4.27B). Dies wird insbesondere durch die Überlagerung der beiden Strukturmodelle deutlich (siehe Abbildung 4.27C).

Vermutlich kann FCA die natürlich vorkommende S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung deswegen auch nicht stabilisieren. Um dies zu überprüfen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Dafür wurden 100 nM FAM-C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 und 0,25 μ M His6-14-3-3 ζ (VL) mit FCA von 1 mM aus in einer 1:1-Verdünnungsreihe titriert. Die Lösung wurde 16 Stunden bei 4 °C inkubiert und anschließend die Anisotropie gemessen. Dabei war kein Anstieg der Anisotropie zu beobachten und es konnte kein EC₅₀ für eine mögliche Stabilisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung durch FCA bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). FCA kommt daher als möglicher Stabilisator für die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung nicht in Frage.

4.5.2. Stabilisierung des C-RAF/14-3-3-Komplexes durch Cotylenin A

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung prinzipiell für einen Stabilisator adressierbar zu sein scheint. Jedoch kommt der einzige bisher bekannte Stabilisator von 14-3-3-Protein-Protein-Wechselwirkungen, FCA, dafür aus sterischen Gründen nicht in Frage. Daher wurde zunächst über einen rationalen Ansatz ein möglicher Stabilisator gesucht. Zusätzlich wurde veröffentlicht, dass das dem FCA sehr ähnliche Molekül Cotylenin A (CNA) an einen Komplex aus pflanzlichem 14-3-3c (aus *N.tabacum*) und C-RAF₍₂₅₅₋₂₆₅₎pS259,M265A-Peptid binden kann (Ottmann *et al.*, 2009).

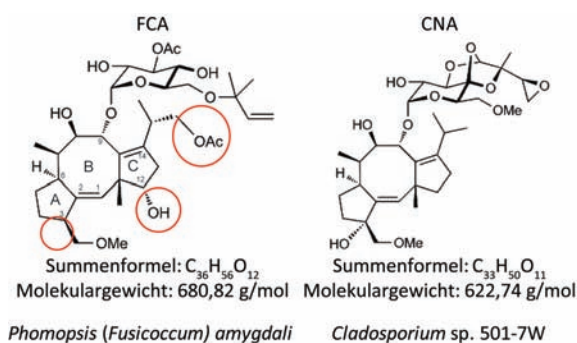


Abbildung 4.28: Die Naturstoffe Fusicoccin A (FCA) und Cotylenin A (CNA). Die Stoffwechselprodukte aus verschiedenen Pilzen sind als Strukturformel dargestellt und die wichtigsten Unterschiede der Substituenten am 5-8-5-Ring-System von FCA durch rote Kreise hervorgehoben.

In Abbildung 4.28 sind die Strukturformeln der beiden Moleküle dargestellt. Diese bestehen jeweils aus einem 5-8-5-Ringsystem, das am 8-Ring ein Zuckermolekül trägt. Beide Naturstoffe stellen Stoffwechselprodukte zweier verschiedener Pilze dar. Sie unterscheiden sich sowohl in der Art des Zuckermoleküls als auch in den Substituenten des 5-8-5-Ringsystems. Während FCA am C3 des 5-Rings A lediglich einfach substituiert ist,

weist das CNA an dieser Stelle eine zweifache Substitution auf. Zusätzlich zu der Ethylmethoxygruppe trägt das CNA dort noch eine Hydroxygruppe. Weiterhin ist das FCA am C12 des 5-Rings C durch eine Hydroxygruppe substituiert, die an gleicher Position im CNA-Molekül fehlt. An der C14-Position des 5-Rings C sind beide Moleküle einfach substituiert, wobei der Substituent im FCA-Molekül größer ist als im CNA-Molekül.

Vermutlich ist die Hydroxygruppe am C12 des 5-Rings C im FCA nicht kompatibel mit einer gleichzeitigen Bindung eines nicht-*mode* III-14-3-3-Bindemotivs, das also über die +1-AS vom pS oder pT aus betrachtet C-terminal hinausgeht. Diese im CNA-Molekül fehlende Hydroxygruppe ermöglicht vermutlich die Bindung des CNA-Moleküls an den C-RAF/14-3-3-Komplex (Ottmann *et al.*, 2009).

Strukturbiologische Untersuchung. Um zu überprüfen, ob CNA an beide in dieser Arbeit untersuchten 14-3-3-Bindestellen des C-RAF-Proteins (S233 und S259) in Komplex mit 14-3-3-Protein binden kann, wurden Proteinkristalle des Komplexes aus 14-3-3 $\zeta\Delta$ C und C-RAF_(229–264)pS233,pS259, die, wie unter 4.4.2 beschrieben, hergestellt wurden, mit einer CNA-haltigen Lösung getränkt. Dafür wurden 2 μ l 10 mM CNA-Ethanol-Lösung getrocknet und die Proteinkristalle samt Mutterlauge darauf pipettiert. Die Kristalle wurden 24 Stunden in der CNA-haltigen Lösung inkubiert und anschließend durch Zugabe von Saccharose kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff eingefroren (3.8.3). Mit Synchrotron-Strahlung wurde ein Datensatz bis 2,2 Å aufgenommen und mit der Software *XDS* ausgewertet (3.8.5).

Über molekularen Ersatz mit dem Strukturmodell des 14-3-3 ζ -Proteins in Komplex mit dem zweifach phosphorylierten C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid (siehe 4.4.2 und Abbildung 4.21) und der Software *Phaser* konnte initiale Phaseninformation für das neue Modell berechnet werden (3.8.5). Die Verfeinerung des erhaltenen Modells erfolgte, wie unter 3.8.5 beschrieben, mit der Software *REFMAC* und der Software *Coot*. Die Verteilung der Diederwinkel Φ und Ψ des finalen Strukturmodells ist in Abbildung A.5 im Anhang in einem Ramachandran-Diagramm zusammengefasst (Ramachandran *et al.*, 1963). Tabelle 20 im Anhang fasst die Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung zusammen. Abbildung 4.29 zeigt das erhaltene Strukturmodell. Wie erwartet, entspricht dieses Strukturmodell dem des binären 14-3-3 ζ /C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Komplexes (siehe Abbildung 4.21). Das 14-3-3-Protein weist die typische W-förmige Struktur auf und die Bindegruben der einzelnen Monomere beinhalten jeweils die S233- oder die S259-Bindestelle des C-RAF-Proteins. Die AS, die diese beiden Bindestellen miteinander verbinden, sind auch in dieser Struktur nicht sichtbar. Zudem ist jedoch in jeder Binde-

grube ein CNA-Molekül gebunden. In beiden Monomeren nimmt das CNA-Molekül eine Tasche am C-Terminus der jeweiligen C-RAF-Bindestelle ein und bildet Kontakte zum 14-3-3-Protein und zum C-RAF-Peptid aus. Das CNA-Molekül ist so orientiert, dass das 5-8-5-Ringsystem tief in der durch das 14-3-3-Protein und Peptid gebildeten Tasche liegt, während der Zucker dem Lösungsmittel exponiert ist und aus der Tasche herausragt. Weiterhin sind in diesem Modell die AS H236 und A237 C-terminal vom pS233

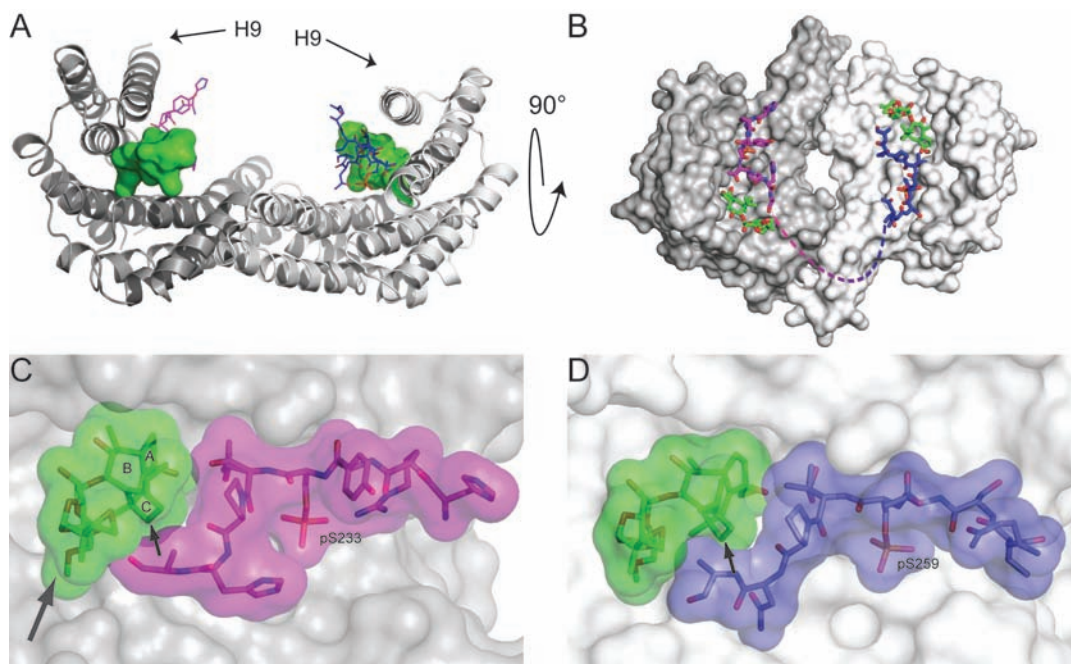


Abbildung 4.29: Strukturmodell des ternären Komplexes aus 14-3-3 ζ , C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 und CNA. (A) Das 14-3-3 ζ -Dimer ist als Bändermodell mit einem Monomer in hellgrau und dem anderen in dunkelgrau gezeigt. Beide Bindegroben beinhalten neben dem C-RAF-Peptid (Stäbchenmodell, S233 magenta und S259 blau) jeweils ein CNA-Molekül, das in grün als Oberflächendarstellung gezeigt ist. (B) Um bessere Sicht zu erhalten, wurde das Modell um 90° nach vorne gedreht, die Helices H9 (siehe Pfeil) gelöscht und das 14-3-3 ζ -Dimer in einer Oberflächendarstellung gefärbt, wie in (A) gezeigt. CNA-Moleküle sind grün und das C-RAF-Peptid in magenta (S233) und blau (S259) als Stäbchenmodell dargestellt. Die Verbindung der S233- und S259-Bindestellen ist als gestrichelte Linie angedeutet. In (C) und (D) ist das 14-3-3-Protein als graue Oberflächendarstellung sichtbar. Die beiden C-RAF-Bindestellen S233 (C) und S259 (D) sind jeweils in magenta und blau und die CNA-Moleküle jeweils in grün als Stäbchenmodelle mit halb transparenter Oberfläche dargestellt. Das 5-8-5-Ringsystem ist wie in Abbildung 4.28 mit A, B, und C beschriftet, die C12-Position mit einem kleinen und der Zucker mit einem großen Pfeil markiert.

sichtbar. Das deutet daraufhin, dass sie in diesem ternären Komplex fester gebunden sind als in dem binären Komplex und dadurch eine interpretierbare Elektronendichte liefern. Das wiederum könnte bedeuten, dass CNA einen stabilisierenden Einfluss auf die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung hat.

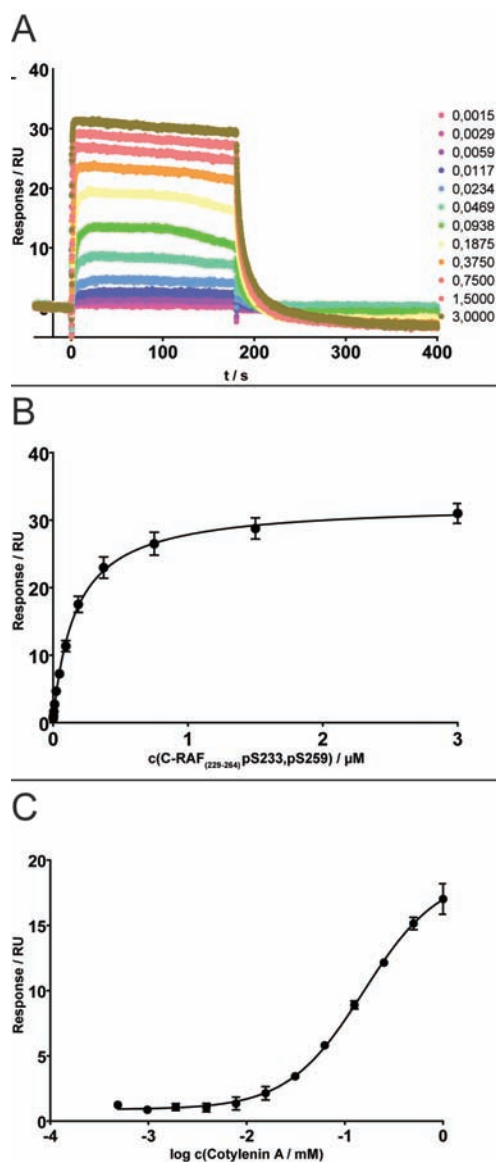


Abbildung 4.30: Untersuchung des Einflusses von CNA auf die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung mittels SPR. (A) C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid wurde in einer 1:1-Verdünnungsreihe auf immobilisiertes His6-14-3-3 ζ (VL) titriert. (B) Die RU-Werte einer Peptidkonzentration im Gleichgewicht wurden gegen diese aufgetragen. Mit nichtlinearer Regression wurde der K_D -Wert ermittelt. (C) CNA wurde in einer 1:1-Verdünnungsreihe in Anwesenheit von 250 nM C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid titriert. Der Gleichgewichts-RU-Wert einer bestimmten CNA-Konzentration wurde gegen diese auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Über nichtlineare Regression wurde der EC_{50} bestimmt.

Untersuchung mit SPR. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden SPR-Experimente mit den drei Komponenten des Komplexes durchgeführt. Die Durchführung des SPR-Experiments erfolgte durch Malgorzata Skwarczynska. His6-14-3-3 ζ (VL) (siehe 4.4.1 und Abbildung 4.14) wurde auf einem CM5-Chip immobilisiert und das zweifach phosphorylierte C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid in einer 1:1-Verdünnungsreihe von 3 μM ausgehend titriert, wie unter 3.7.3 geschildert. Aus den erhaltenen Sensogrammen (siehe Abbildung 4.30A) wurde der jeweilige RU-Wert für eine bestimmte Peptidkonzentration im Gleichgewicht ermittelt und anschließend die Peptidkonzentration gegen den RU-Wert aufgetragen (siehe Abbildung 4.30B). Aus diesen Werten wurde durch nichtlineare Regression der K_D -Wert für das zweifach phosphorylierte C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid an das immobilisierte His6-14-3-3 ζ (VL) bestimmt. Diese Messung wurde dreimal durchgeführt und ein K_D von 170 ± 16 nM ermittelt. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung zu den durch FP- und ITC-Messung ermittelten Werten, die sich ebenfalls im nanomolaren Bereich befinden (siehe 4.4.1, Abbildungen 4.15 und 4.17, sowie Tabellen 10 und 11).

Anschließend wurde Cotylenin A in einer 1:1-Verdünnungsreihe von 1 mM ausgehend in Anwesenheit von jeweils 250 nM C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid titriert.

Dabei wurden, wie oben beschrieben, Sensogramme aufgenommen und den jeweiligen CNA-Konzentrationen die RU-Werte für das Gleichgewicht zugeordnet. Die RU-Werte wurden gegen die CNA-Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen und mittels nichtlinearer Regression der EC_{50} bestimmt (siehe Abbildung 4.30C). Diese Messung wurde dreimal durchgeführt und ein durchschnittlicher EC_{50} von $156 \mu\text{M}$ erhalten.

Untersuchung mit FP. Nach diesem ersten Hinweis darauf, dass CNA tatsächlich die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung stabilisieren kann, wurde in einem nächsten Experiment der Einfluss von CNA auf die einzelnen C-RAF-Bindestellen untersucht. Dafür wurden die FAM-markierten C-RAF-Phosphopeptide wie unter 4.4.1 verwendet. Bei verschiedenen His6-14-3-3 ζ (VL)-Konzentrationen wurde CNA auf die FAM-C-RAF-Phosphopeptide titriert, 16 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend die Anisotropie gemessen (siehe 3.7.2). Die erhaltenen Werte wurden auf den jeweils niedrigsten Wert der Messung und auf den höchsten Wert der Affinitätsmessung (siehe Abbildung 4.15) normalisiert und gegen die CNA-Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen (siehe Abbildung 4.31). Mit nichtlinearer Regression unter Anwendung der Gleichung 15

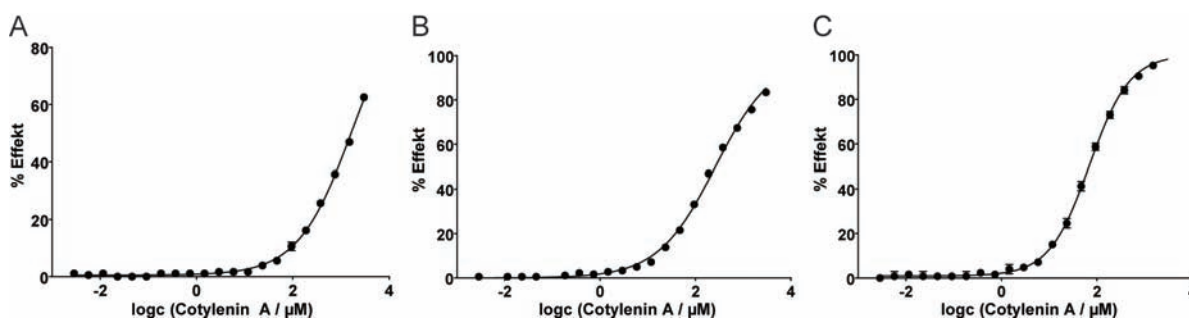


Abbildung 4.31: EC_{50} -Bestimmung von CNA mittels FP. CNA wurde jeweils als Triplikat in Anwesenheit verschiedener His6-14-3-3 ζ (VL)-Konzentrationen auf die unterschiedlichen FAM-markierten C-RAF-Phosphopeptide titriert. Die Anisotropie wurde gemessen, die erhaltenen Werte normalisiert und gegen die CNA-Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. (A) FAM-C-RAF₍₂₂₉₋₂₃₈₎pS233 und $76 \mu\text{M}$ His6-14-3-3 ζ (VL). (B) FAM-C-RAF₍₂₅₄₋₂₆₄₎pS259 und $8 \mu\text{M}$ His6-14-3-3 ζ (VL). (C) FAM-C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 und $0,25 \mu\text{M}$ His6-14-3-3 ζ (VL).

wurde der EC_{50} von CNA für die einzelnen Messungen ermittelt. Der Versuch wurde jeweils dreimal durchgeführt und die erhaltenen EC_{50} -Werte gemittelt. Die gemittelten Werte sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Diese Werte verdeutlichen, dass CNA sowohl die Wechselwirkung der einzelnen C-RAF-Bindestellen (S233 und S259) mit 14-3-3 als auch die Wechselwirkung beider Bindestellen gleichzeitig mit 14-3-3 stabilisieren kann. Die ermittelten relativen EC_{50} -Werte unterscheiden sich jeweils um eine Größenordnung, wie es auch schon für die ermittel-

FAM-Peptid	His6-14-3-3 ζ (VL)	EC ₅₀ / μ M
C-RAF _(229–238) pS233	76,00 μ M	1760,33 \pm 98,46
C-RAF _(254–264) pS259	8,00 μ M	256,77 \pm 9,13
C-RAF _(229–264) pS233,pS259	0,25 μ M	65,44 \pm 7,86

Tabelle 14: Ergebnisse der EC₅₀-Messungen von CNA mit FAM-C-RAF-Peptiden und His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mittels FP.

ten Affinitäten der einzelnen Peptide an das 14-3-3-Protein der Fall war (siehe Tabelle 10). Wenn man jedoch davon ausgeht, dass in Zellen das C-RAF-Protein an beiden 14-3-3-Bindestellen phosphoryliert ist, wie es in Kapitel 4.4.3 gezeigt werden konnte, so ist nur die Betrachtung des EC₅₀ von CNA an das zweifach phosphorylierte FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid und His6-14-3-3 ζ (VL) von physiologischer Relevanz.

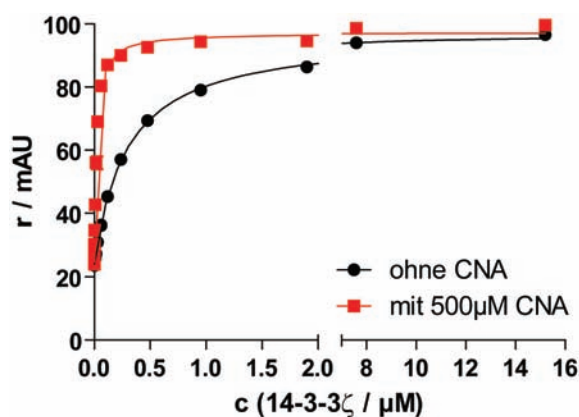


Abbildung 4.32: Bestimmung des K_D der His6-14-3-3 ζ (VL)/FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid-Wechselwirkung in Anwesenheit von 500 μ M CNA mittels FP.

Daher wurden in einem nächsten Experiment der K_D -Wert von His6-14-3-3 ζ (VL) an FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid in Anwesenheit von CNA bestimmt. Dafür wurde His6-14-3-3 ζ (VL) mit 20 nM FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptid in Anwesenheit von 500 μ M CNA titriert und die Anisotropie gemessen (siehe 3.7.2). Die Messung wurde als Triplikat durchgeführt und die erhaltenen Anisotropiewerte gegen die His6-14-3-3 ζ (VL)-Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 4.31). Mit nichtlinearer Regression wurde ein K_D von 20,11 nM ermittelt. Im Vergleich zum K_D

von 346 ± 37 nM, der mit der gleichen Methode für die Wechselwirkung in Abwesenheit von CNA bestimmt wurde (siehe 4.4.1, Abbildung 4.15 und Tabelle 10), ist der K_D dieser Wechselwirkung in Anwesenheit von CNA etwa 17-fach verringert.

4.5.3. Einfluss von Cotylenin A auf die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung

Die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung wird als aktivierend bezogen auf die Raf-Kinaseaktivität beschrieben (siehe Abschnitt 1.5.4 und Hekman *et al.* (2004)). Sie wirkt also dem Effekt der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwir-

kung entgegen. Therapeutisch betrachtet wäre eine gleichzeitige Stabilisierung der S233-, S259- und S621-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung daher nicht sinnvoll, da sie netto keinen Effekt haben könnte. Daher wird im Folgenden die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung untersucht und insbesondere der Einfluss von CNA auf diese Wechselwirkung genauer betrachtet.

Die S621-Bindestelle des C-RAF-Proteins unterscheidet sich besonders in der AS an Position +1 C-terminal vom pS von der S259-Bindestelle. Während in der S259-Bindestelle ein T auf das pS folgt, das keine Ladung aufweist und eine vergleichsweise kleine Seitenkette besitzt, befindet sich an der +1-Position in der S621-Bindestelle ein E. Dieses ist bei physiologischem pH positiv geladen und im Vergleich zu T weist diese AS eine große Seitenkette auf.

Zunächst wurden die Affinitäten der S259- und S621-Bindestellen an das His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein miteinander verglichen. Dazu wurden verschiedene FAM-markierte C-RAF-Phosphopeptide (siehe Tabelle 15) mit His6-14-3-3 ζ (VL) titriert und die Anisotropie gemessen (siehe 3.7.2). Zusätzlich zu den beiden FAM-markierten C-RAF-Phosphopeptiden, die die S259- und S621-Bindestelle beinhalteten, wurde ein FAM-markiertes C-RAF-Phosphopeptid verwendet, das die S259-Bindestelle, aber an der +1-Position ein E statt des Ts enthielt (FAM-C-RAF₍₂₅₂₋₂₆₄₎pS259,T260E). Die gemessenen Werte wurden gegen die His6-14-3-3 ζ (VL)-Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 4.33).

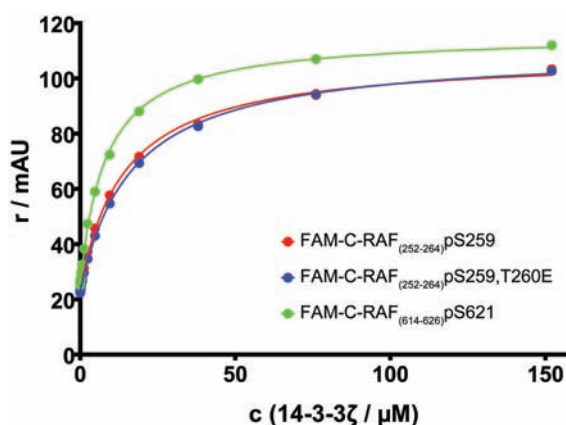


Abbildung 4.33: Vergleich der Affinitäten der C-RAF-S259- und C-RAF-S621-Bindestellen an His6-14-3-3 ζ (VL) mittels FP. FAM-markierte C-RAF-Phosphopeptide wurden mit His6-14-3-3 ζ (VL) titriert und die gemessenen Anisotropiewerte gegen die His6-14-3-3 ζ (VL)-Konzentration aufgetragen.

FAM-Peptid	Sequenz	$K_D / \mu\text{M}$
C-RAF ₍₂₅₂₋₂₆₄₎ pS259	SQRQRST-pS-TPNVH	15,56 \pm 2,32
C-RAF ₍₂₅₂₋₂₆₄₎ pS259,T260E	SQRQRST-pS-EPNVH	15,70 \pm 1,15
C-RAF ₍₆₁₄₋₆₂₆₎ pS621	PKINRSA-pS-EPSLH	7,54 \pm 0,91

Tabelle 15: Ergebnisse der K_D -Messungen verschiedener FAM-C-RAF-Peptide und His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein mittels FP.

Über nichtlineare Regression wurde der K_D -Wert für die jeweilige Wechselwirkung bestimmt. Die Messung wurde dreimal als Triplikat durchgeführt. Die daraus gemittelten K_D -Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Aus diesen Messungen wird deutlich, dass sich die Affinitäten der einzelnen Bindestellen zum His6-14-3-3 ζ (VL) kaum unterscheiden. Alle gemessenen K_D -Werte liegen im niedrigen mikromolaren Bereich. Auch der Austausch T260E hat keinen Einfluss auf die Affinität des C-RAF-Phosphopeptids zum His6-14-3-3 ζ (VL)-Protein.

Daher wurde in einem nächsten Experiment der Einfluss von CNA auf die

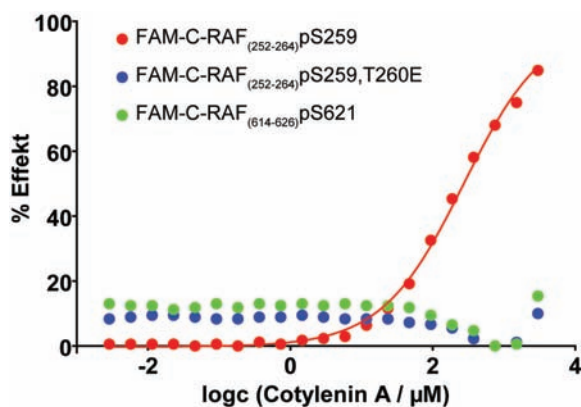


Abbildung 4.34: Vergleich des Einflusses von CNA auf die S259- und S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung mittels FP. Zur Bestimmung des EC_{50} wurde CNA in Anwesenheit von $4\mu\text{M}$ beziehungsweise $8\mu\text{M}$ His6-14-3-3 ζ (VL) auf die FAM-markierten C-RAF-Phosphopeptide titriert. Die gemessenen Anisotropiewerte wurden normalisiert und gegen die CNA-Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen.

Skala aufgetragen (siehe Abbildung 4.34). Über nichtlineare Regression wurde der EC_{50} von CNA für die einzelnen Messungen ermittelt. Die Messungen wurden dreimal als Triplikat durchgeführt.

Abbildung 4.34 zeigt, dass CNA keinen Einfluss auf die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung hat. Im Gegensatz zu der S259-Bindestelle ist kein Anstieg der Anisotropie bei Zugabe von CNA zu beobachten. Das bedeutet, dass CNA diese Wechselwirkung nicht stabilisiert. Weiterhin zeigt sich, dass bereits der Austausch der +1-AS (T260E) bewirkt, dass CNA die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung nicht mehr stabilisieren kann. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der 3D-Struktur der +1-AS.

Um die Tatsache, dass CNA C-RAF/14-3-3-Komplexe, die an der +1-Position ein E aufweisen, nicht mehr stabilisieren kann, weiter zu untersuchen, wurde die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung strukturbiologisch untersucht. Da in der Arbeitsgruppe bereits eine Kristallisationsbedingung für gut streuende Proteinkristalle von 14-3-3 σ /Phosphopeptid-Komplexen gefunden wurde, wurde für diese strukturbiologische Untersuchung die σ -Isoform der 14-3-3-Proteine verwendet. Dafür wurde 14-3-3 $\sigma\Delta$ C exprimiert und aufgereinigt, wie in 3.5.1 - 3.5.4 beschrieben. Nach der Ultrafiltration wurde der His-*Tag* durch TEV-Protease abgespalten und das Protein über präparative Gelfiltration in Dialyse-Puffer aufgereinigt (3.1.13, 3.5.6 und 3.5.7). Die Konzentration des aufgereinigten 14-3-3 $\sigma\Delta$ C wurde UV-spektroskopisch bestimmt (3.6.2). Dafür wurden die berechneten Parameter $M = 26509,9 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ und $E = 26025 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ eingesetzt. Über SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 wurde die Reinheit auf über 95 % geschätzt (3.6.1 und siehe Abbildung 4.35).

Die Kristallisation wurde von Benjamin Schumacher durchgeführt. 14-3-3 $\sigma\Delta$ C und C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621-Peptid wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1,5 bezogen auf ein 14-3-3-Monomer in Kristallisationspuffer gemischt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die 14-3-3 $\sigma\Delta$ C-Konzentration betrug dabei $10 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ und die des C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621-Peptids 0,6 mM im Komplexierungsansatz. Da die Kristallisationsbedingung bekannt war, wurde nicht

mehr nach initialen Kristallisationsbedingungen gesucht. Stattdessen wurde 1 μl der Proteinlösung mit 1 μl Reservoirlösung gemischt und die Methode des hängenden Tropfens zur Kristallisation bei 4 °C angewendet (siehe 3.8.1 und Abbildung 3.8). Die Reservoirlösung enthielt 95 mM Na-HEPES pH 7,4 sowie 25,6 % PEG 400, 190 mM CaCl₂ and 5 % Glycerin. Das Kristallwachstum dauerte etwa eine Woche und die Kristalle waren etwa $400 \times 100 \times 100 \text{ nm}$ groß (nicht gezeigt). Da die Kristallisationsbedingung bereits kryogen war, war eine zusätzliche Kryokonservierung der Kristalle nicht notwendig. Diese

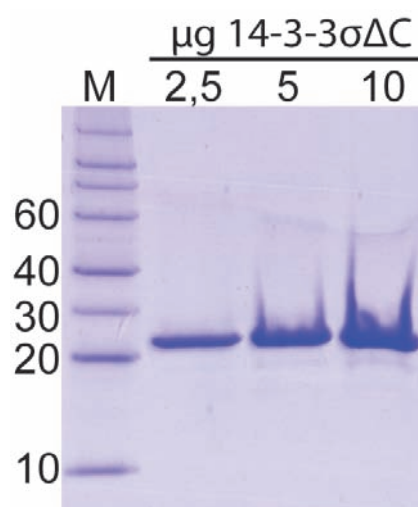


Abbildung 4.35: Tris-Tricin-Gel des aufgereinigten His6-14-3-3 $\sigma\Delta$ C-Proteins. Unterschiedliche Mengen His6-14-3-3 $\sigma\Delta$ C wurden über ein 12 %iges TrisTricin-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau R250 angefärbt (3.6.1). Als Größenstandard diente der Roti[®]-Mark 10-150 (M, siehe 3.1.6). Die Laufhöhen für 10, 20, 30, 40 und 60 kDa sind beschriftet.

wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren (3.8.3). Als Röntgenquelle diente eine rotierende Cu-K α -Anode mit einer Wellenlänge von 1,5418 Å (3.8.4). Es wurde ein Datensatz bis 1,70 Å aufgenommen und mit der Software *XDS* ausgewertet (3.8.4).

Über molekularen Ersatz mit dem bekannten Strukturmodell des 14-3-3 σ -Proteins (PDB ID: 1YWT) und der Software *Phaser* konnte initiale Phaseninformation für das neue Modell berechnet werden (3.8.5). Die Verfeinerung des erhaltenen Modells erfolgte, wie unter 3.8.5 beschrieben, mit der Software *REFMAC* und der Software *Coot*.

Die Verteilung der Diederwinkel Φ und Ψ des finalen Strukturmodells ist in Abbildung A.6 im Anhang in einem Ramachandran-Diagramm zusammengefasst (Ramachandran *et al.*, 1963). Tabelle 21 im Anhang fasst die Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung zusammen. Abbildung 4.36 zeigt das erhaltene Strukturmodell. Der Komplex ist

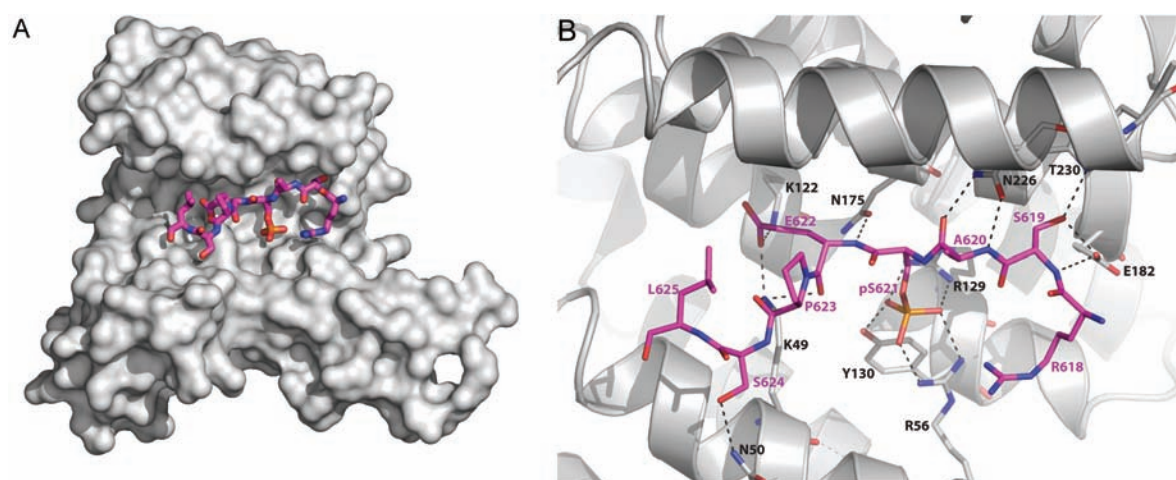


Abbildung 4.36: Strukturmodell der S621-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung. (A) Ein 14-3-3 σ -Monomer ist als graue Oberfläche und das C-RAF-Peptid in magenta als Stäbchenmodell dargestellt. (B) Detaillierte Ansicht der polaren Wechselwirkungen zwischen dem C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621-Peptid (magenta, Stäbchenmodell) und dem 14-3-3 σ (grau, Bändermodell, einzelne AS als Stäbchenmodell). Die beteiligten AS sind beschriftet (C-RAF magenta und 14-3-3 schwarz) und polare Kontakte als schwarz gestrichelte Linie hervorgehoben.

mit einer anderen Symmetrie kristallisiert als der zuvor gezeigte Komplex aus 14-3-3 ζ und C-RAF₂₂₉₋₂₆₄pS233,pS259. Pro Einheitszelle ist nur ein 14-3-3 σ -Monomer mit gebundenem C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621-Peptid vorhanden. Dieses ist über das pS621 in einer elongierten Konformation in der Bindegroße orientiert. Neben dem pS621, das durch die Seitenketten der AS R56, R129 und Y130 des 14-3-3-Proteins koordiniert wird, bilden auch die Seitenketten der AS S619, E622 und S624 polare Kontakte zum 14-3-3-Protein aus. Außerdem bilden die Seitenketten der AS E182, N226, N175, K122 und K49 des 14-3-3-Proteins polare Kontakte zum Peptidrückgrat des C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621-Peptids. Auffällig ist weiterhin, dass die +1-AS E622 in den Raum hereinragt, der

lösungsmittel exponiert ist und der in der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung von CNA eingenommen werden kann. Zur Verdeutlichung wurden die beiden Strukturmodelle des ternären C-RAF_(229–264)pS233,pS259/14-3-3 ζ /CNA und des binären C-RAF_(618–626)pS621/14-3-3 σ -Komplexes überlagert (siehe Abbildung 4.37). Die

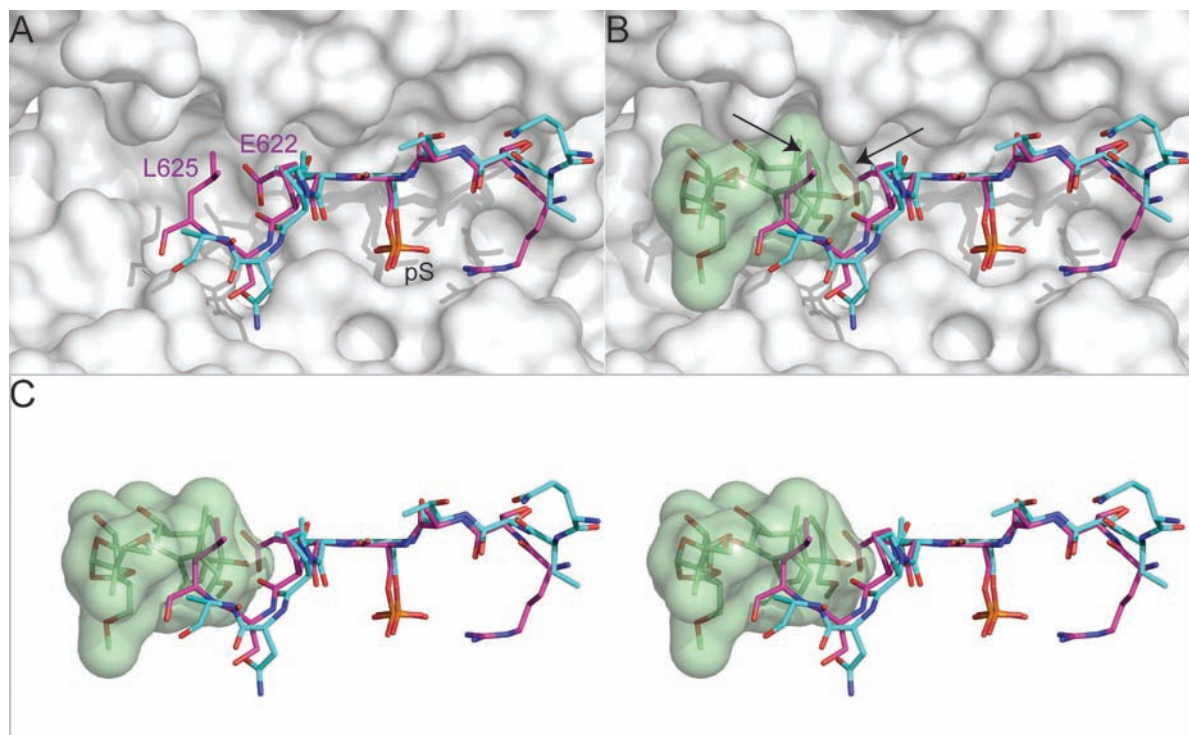


Abbildung 4.37: Überlagerung der Strukturmodelle des binären C-RAF_(618–626)pS621/14-3-3 σ -Komplexes und des ternären C-RAF_(229–264)pS233,pS259/14-3-3 ζ /CNA-Komplexes. (A) Die 14-3-3-Bindegrube ist als graue Oberfläche gezeigt. Das C-RAF_(618–626)pS621-Peptid ist in magenta (E622 und L625 beschriftet) und die S259-Bindestelle des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptids in türkis als Stäbchenmodell dargestellt. Das pS ist markiert. (B) Zusätzlich zu der Darstellung in (A) ist CNA als grünes Stäbchenmodell mit halb transparenter Oberfläche gezeigt. Pfeile markieren die sterischen Konflikte der AS des C-RAF_(618–626)pS621-Peptids mit dem CNA-Molekül. (C) Stereoansicht der Darstellung aus (B) ohne 14-3-3-Protein.

Überlagerung zeigt zunächst, dass die beiden C-RAF-Phosphopeptide, obwohl sie unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen, in einer sehr ähnlichen Konformation an das 14-3-3-Protein gebunden sind. Beide werden über das pS in einer elongierten Konformation in der 14-3-3-Bindegrube orientiert (siehe Abbildung 4.37A). Weiterhin zeigt sich aber auch, dass die pS259-Bindestelle des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Peptids sterisch kompatibel zu dem CNA-Molekül ist (siehe Abbildung 4.37B und C). Das C-RAF_(618–626)pS621-Peptid hingegen weist zwei sterische Konflikte mit dem CNA-Molekül auf. Zum Einen ist die Seitenkette des L625 sterisch inkompatibel mit dem CNA-Molekül (siehe Abbildung 4.37A) und zum Anderen ist die +1-AS E622 sterisch

nicht kompatibel mit einer gleichzeitigen Bindung von CNA (siehe Abbildung 4.37A und B). Das erklärt, warum CNA die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung nicht stabilisieren kann.

5. Diskussion und Ausblick

5.1. Untersuchung der Wechselwirkung von MLF1 mit 14-3-3-Proteinen

5.1.1. MLF1 kann über pS34 direkt mit 14-3-3-Proteinen interagieren

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von MLF1 mit 14-3-3-Proteinen mittels ITC wurde aufgereinigtes 14-3-3-Protein verwendet. Die 14-3-3-Isoform ϵ wurde hierfür heterolog in *E. coli* exprimiert und über einen His6-Tag affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Reinheit des Proteins konnte mittels SDS-PAGE auf über 95 % geschätzt werden. Je reiner die Proteinprobe ist, umso geringer ist der experimentelle Fehler. Damit erhöht sich die Zuverlässigkeit der durchgeführten Messungen und der ermittelten Dissoziationskonstanten.

Die heterologe Expression und anschließende Aufreinigung des Vollängen-MLF1-Proteins sowie von verkürzten Varianten aus *E. coli* war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Zudem handelt es sich bei der Phosphorylierung am S34 des MLF1-Proteins um eine posttranslationale Modifikation, die in *E. coli* nicht durchgeführt wird. Da die Kinase für die Phosphorylierung des MLF1-Proteins an S34 bisher nicht identifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 1.4.3 und Lim *et al.* (2002)), kommt eine *in vitro* Phosphorylierung des aufgereinigten Proteins zudem nicht in Frage. Es besteht die Möglichkeit, Proteine heterolog in einem eukaryotischen Insektenzellsystem zu exprimieren. Diese Methode bietet den Vorteil, dass zur Faltung benötigte eukaryotische Chaperone vorhanden sind und posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen durchgeführt werden (Höss *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Maruniak, 1996). Hohe Expressionsraten führen jedoch häufig dazu, dass nicht alle Proteine beziehungsweise alle Phosphorylierungsstellen eines Proteins gleichmäßig phosphoryliert werden (Höss *et al.*, 1990; Gray und Subramanian, 2001). Anschließend, von posttranslationalen Modifikationen abhängige biophysikalische und biochemische Untersuchungen sind dann nicht zuverlässig. Zudem können Säugerproteine auch rekombinant in Säugerzellen exprimiert werden. In diesem Expressionssystem ist die Prozessierung und posttranslationale Modifikation des rekombinanten Proteins dem des nativen Proteins am ähnlichsten. Allerdings ist die theoretische maximale Ausbeute an rekombinantem Protein von 0,3 - 30 μg pro 10^7 Zellen verglichen mit der theoretischen maximalen Ausbeute in Insektenzellen von 10 μg - 10 mg pro 10^7 Zellen so niedrig, dass dieses Expressionssystem für quantitative Messungen, die große Proteinmengen benötigen, nicht geeignet ist (Qiagen, 2009). Da synthetisch her-

gestellte Phosphopeptide eine gute und einfache Alternative darstellen, wurden diese für die hier durchgeführten Untersuchungen verwendet. Derartige Peptide weisen meistens keine Sekundärstruktur auf und liegen daher ungeordnet vor. Auch die Bereiche von Interaktionspartnern, die mit 14-3-3-Proteinen interagieren, sind ungeordnet (siehe Abschnitt 1.3.3). Da zudem für die im Vorfeld dieser Arbeit gelöste Röntgenkristallstruktur des MLF1/14-3-3-Komplexes ein kurzes MLF1-Phosphopeptid verwendet wurde (siehe Abschnitt 1.4.3), wurden auch in dieser Arbeit zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten kurze (14mer), einfach phosphorylierte MLF1-Peptide verwendet.

Mit ITC konnten die K_D -Werte für die Wechselwirkung zwischen dem 14-3-3 ϵ -Protein und dem WT-MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34 sowie den eingesetzten Mutanten bestimmt werden. Die K_D -Werte liegen erwartungsgemäß im niedrigen mikromolaren Bereich, wie sie bereits für andere 14-3-3/Phosphopeptid-Wechselwirkungen gemessen wurden (Rajagopalan *et al.*, 2010). Obwohl die Röntgenkristallstruktur zeigt, dass die AS 31-38 des MLF1-Phosphopeptids an der Wechselwirkung mit 14-3-3 ϵ beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.4.3 und Abbildung 1.13), hatte nur der Austausch des F33 zu A einen signifikanten Einfluss auf den K_D -Wert. Dieser Austausch erhöhte den gemessenen K_D -Wert für die Wechselwirkung von 14-3-3 ϵ mit MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34 von 1,55 μ M für das WT-Peptid auf 4,99 μ M. Die besondere Rolle des F33 kann durch die strukturellen Daten erklärt werden. Der Phenylring des F33 ist in einer hydrophoben Tasche gelagert, die aus den AS L223 und L230 sowie der Hauptkette der Helix 9 des 14-3-3-Proteins gebildet wird (siehe Abbildung 4.3). Durch die dadurch entstehende große hydrophobe Interaktionsfläche kann F33 einen signifikanten Beitrag zur Affinität des MLF1₍₂₉₋₄₂₎pS34-Peptids an das 14-3-3 ϵ -Protein leisten.

Zusammen mit der Röntgenkristallstruktur belegen diese Daten, dass das phosphorylierte MLF1-Protein direkt mit 14-3-3-Proteinen interagieren kann. Wie zuvor erwähnt, ist die Kinase, die das MLF1-Protein in Zellen phosphoryliert, unbekannt, sodass Aussagen über die physiologische Bedeutung der Wechselwirkung von MLF1 mit 14-3-3-Proteinen weiterhin spekulativ sind.

5.1.2. Die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 ist in Zellen humanen Ursprungs nicht direkt 14-3-3-abhängig

In dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 in HEK293T-Zellen auf ihre Abhängigkeit von 14-3-3-Proteinen hin untersucht. Dafür wurde das MLF1-Protein als GFP-Fusion in HEK293T-Zellen heterolog exprimiert. Die Fusion mit GFP bietet die Möglichkeit, die subzelluläre Lokalisation des fusionierten Proteins di-

rekt und in lebenden Zellen mittels konfokaler Mikroskopie zu untersuchen. Allerdings können durch die GFP-Fusion Lokalisationssequenzen und andere Interaktionsflächen des fusionierten Proteins verdeckt werden und das Fusionsprotein ist zudem größer als das native, nicht fusionierte Protein. Die Untersuchung der GFP-MLF1-Proteine als N- und C-terminale Fusionen diente der Überprüfung, ob eine Lokalisationssequenz oder die 14-3-3-Bindestelle durch die GFP-Fusion verdeckt würde. Tatsächlich konnte eine minimal abweichende Lokalisation für die unterschiedliche Orientierung der GFP-Fusion beobachtet werden. Sowohl das C-terminal als auch das N-terminal mit GFP-fusionierte MLF1-Protein war erwartungsgemäß hauptsächlich im CP lokalisiert (siehe Abschnitt 1.4.1, Yoneda-Kato *et al.* (1996) und Abbildung 4.4). Das C-terminal mit GFP-fusionierte MLF1-Protein wies im Gegensatz zum N-terminal mit GFP-fusionierten Protein eine leicht erhöhte Lokalisation im ZK auf (siehe Abbildung 4.4). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die C-terminale GFP-Fusion einen für die subzelluläre Lokalisation des Proteins wichtigen Bereich zumindest teilweise verdeckt. Ungeachtet dessen war für das Volllängen-MLF1-Protein keine 14-3-3-abhängige Lokalisation zu beobachten (siehe Abbildung 4.4).

GFP selbst weist in HEK293T-Zellen eine gleichmäßige Verteilung zwischen CP und ZK auf, wenn es ohne Fusionspartner exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Das spricht dafür, dass sich dieses Protein zwischen ZK und CP hin- und herbewegen kann. Durch die Fusion des 27kDa großen GFP an das 30 kDa große MLF1 wird ein 57kDa großes Fusionsprotein erzeugt. Proteine, die größer sind als 40 kDa, können nur über aktiven Transport in den ZK translozieren (Görlich und Kutay, 1999). Es kann also sein, dass das GFP-MLF1-Fusionsprotein aufgrund seiner Größe möglicherweise nicht mehr in den Zellkern translozieren kann oder, wie zuvor erwähnt, die NLS des MLF1-Proteins durch das fusionierte GFP unzugänglich wird, wodurch das die GFP-fusionierte Protein im CP gehalten werden würde. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die NES des MLF1-Proteins mutiert. Eine Mutation der NES verhindert eine Bindung an den Zellkern-Exportkomplex bestehend aus CRM1 und Ran-GTP. Dadurch wird ein Protein, das sich normalerweise mit intakter NES zwischen ZK und CP hin- und herbewegt, im ZK gehalten. Man würde erwarten, dass eine derartige Mutation keinen Einfluss bezüglich der subzellulären Lokalisation auf ein Protein hat, das ausschließlich im CP lokalisiert ist. Die NES-Mutanten GFP-MLF1 L89E und L89A sind in HEK293T-Zellen überwiegend im ZK lokalisiert (siehe Abbildung 4.6). Daraus kann geschlossen werden, dass die GFP-Fusion an sich keinen relevanten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins hat beziehungsweise dieses nicht an der Translokation in den ZK hindert.

Die 14-3-3-Bindestelle befindet sich im N-terminalen Bereich des MLF1-Proteins und umfasst wie zuvor beschrieben die AS 31-36. Da für die GFP-Fusionsproteine des Voll-längen-MLF1-Proteins keine 14-3-3-abhängige subzelluläre Lokalisation beobachtet werden konnte, wurden zusätzlich die C-terminal verkürzten MLF1₃₈ΔC, MLF1₄₇ΔC und MLF1₁₇₆ΔC sowohl als N-terminale als auch als C-terminale GFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen heterolog exprimiert. Dieser Versuch diente der Überprüfung, ob weitere Proteine, die mit dem C-terminalen Bereich des MLF1-Proteins interagieren, dessen subzelluläre Lokalisation beeinflussen beziehungsweise dem Einfluss der 14-3-3-Bindung entgegenwirken. Die beiden MLF1₃₈ΔC- und MLF1₄₇ΔC-GFP-Fusionsproteine waren zu etwa gleichen Teilen im CP und im ZK lokalisiert (siehe Abbildung 4.8). Das MLF1₁₇₆ΔC-GFP-Fusionsprotein dagegen war überwiegend im CP lokalisiert. Diese Lokalisation lässt sich eher auf die Tatsache, dass es sowohl eine NLS als auch eine NES enthält, als auf eine Bindung an 14-3-3-Proteine zurückführen. Eine 14-3-3-abhängige Lokalisation konnte für keines der C-terminal verkürzten MLF1-Proteine beobachtet werden, weder als N- noch als C-terminale GFP-Fusion (siehe Abbildung 4.8). Eine Co-Transfektion mit 14-3-3ε-mCherry zeigte eine schwache, jedoch statistisch signifikante 14-3-3-abhängige subzelluläre Lokalisation der MLF1₃₈ΔC- und MLF1₄₇ΔC-GFP-Fusionsproteine (siehe Abbildung 4.9). Während die Co-Transfektion von 14-3-3ε-mCherry keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der 14-3-3-Bindemutanten S34A-MLF1₃₈ΔC und -MLF1₄₇ΔC verglichen mit der einfachen Transfektion hatte, wiesen die entsprechenden WT-Proteine in Anwesenheit von 14-3-3ε-mCherry eine veränderte subzelluläre Lokalisation auf. Bei den WT-MLF1₃₈ΔC- und MLF1₄₇ΔC-GFP-Fusionsproteinen war das Verhältnis ihrer subzellulären Lokalisation von CP zu ZK (CP/ZK) in Anwesenheit von 14-3-3ε-mCherry deutlich erhöht im Vergleich zu den entsprechenden S34A-Mutanten und den ohne 14-3-3ε-mCherry exprimierten WT-Proteinen. Das deutet darauf hin, dass die subzelluläre Lokalisation des humanen MLF1 in den humanen HEK293T-Zellen durch 14-3-3-Proteine beeinflusst werden kann. 14-3-3-Proteine spielen jedoch bei der Regulation des Voll-längen-MLF1-Proteins wohl eher eine untergeordnete Rolle. Diese Schlussfolgerung konnte durch den Einsatz von N-terminal verkürzten MLF1-Proteinen bestätigt werden. Die MLF1₅₀ΔN-, MLF1₄₀ΔN- und MLF1₃₇ΔN-GFP-Fusionsproteine, denen der N-terminale Bereich und damit die vollständige 14-3-3-Bindestelle fehlte, waren in HEK293T-Zellen ausschließlich im CP lokalisiert. Dieses Ergebnis ähnelt den Daten von Yoneda-Kato und Kato (2008), die ein GFP-MLF1₅₀ΔN-Fusionsprotein in HEK293T-Zellen ebenfalls ausschließlich im CP detektierten. In humanen Zellen ist die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 also nicht direkt

14-3-3-abhängig, wie es für das murine MLF1 in Cos-7-Zellen gezeigt werden konnte (Winteringham *et al.*, 2006). Auch in Cos-7- und K-562-Zellen konnte in dieser Arbeit keine 14-3-3-abhängige subzelluläre Lokalisation des humanen MLF1-Proteins beobachtet werden.

Der von Winteringham *et al.* (2006) vorgeschlagene Regulationsmechanismus von murinem MLF1 durch 14-3-3-Proteine (siehe Abschnitt 1.4.3 und Abbildung 1.12) scheint also nur bedingt auf das humane Protein übertragbar zu sein. Das murine und das humane MLF1 sind zwar zu 80 % homolog, unterscheiden sich aber insbesondere durch ihren C-terminalen Bereich (siehe Abschnitt 1.4.2 und Abbildung 1.10). Während die AS 1-208 (bezogen auf das humane MLF1) der beiden Spezies zu 84 % konserviert sind, sind die AS 208-268 nur zu 65 % konserviert. Diese niedrige Homologie des C-Terminus ist vermutlich der Grund dafür, dass das humane MLF1-Protein anders reguliert wird als das murine Homolog und seine subzelluläre Lokalisation daher im Gegensatz zu dem murinen Homolog nicht direkt 14-3-3-abhängig ist.

5.2. Stabilisierung der Wechselwirkung von MLF1 und 14-3-3-Proteinen

Angesichts der Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die subzelluläre Lokalisation von humanem MLF1 nicht direkt 14-3-3-abhängig ist, stellt sich die Frage, ob eine Stabilisierung der 14-3-3/MLF1-Wechselwirkung sinnvoll wäre. Bezogen auf die Auswirkung eines möglichen Stabilisators auf die subzelluläre Lokalisation des MLF1-Proteins wäre eine Stabilisierung dementsprechend nicht sinnvoll. Die Regulation des MLF1-Proteins ist jedoch nicht ausreichend erforscht, um eine Aussage über die Sinnhaftigkeit einer Stabilisierung der 14-3-3/MLF1-Wechselwirkung zu treffen. Auch die physiologische Bedeutung der MLF1/14-3-3-Wechselwirkung ist noch nicht ausreichend bekannt, um eine umfassende Antwort auf diese Frage zu finden. Man könnte einen Stabilisator allerdings als biologische *Tool Compound* einsetzen, um die physiologische Bedeutung der MLF1/14-3-3-Wechselwirkung näher zu untersuchen. Zum Beispiel könnte man mit *Microarrays* untersuchen, ob und welche Gene in Abhängigkeit eines derartigen Stabilisators in ihrer Expression reguliert werden und so Hinweise auf die durch MLF1 beeinflussten biologischen Prozesse in der Zelle erhalten.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte über einen Fragment-basierten Ansatz mittels *soaking* von 14-3-3 ϵ /MLF1₂₉₋₄₂pS34-Kristallen durch Michael Weyand und Rolf Rose ein Fragment identifiziert werden, das an den 14-3-3 ϵ /MLF1₂₉₋₄₂pS34-Komplex bindet (sie-

he Abbildung 5.1 und Molzan *et al.* (2012)). Dieses Fragment, 3-Pyrrolidinol, bindet in einer Grube, die aus dem C-terminalen Bereich des MLF1-Peptids und dem 14-3-3-Protein gebildet wird. Es bildet sowohl polare Kontakte zum MLF1-Peptid als auch Wasser-vermittelte Kontakte zum 14-3-3-Protein aus. Ein FP-Experiment konnte zeigen, dass das Fragment an sich nicht in der Lage ist, die MLF1/14-3-3-Wechselwirkung zu stabilisieren (Daten nicht gezeigt und Molzan *et al.* (2012)). Das war aufgrund der wenigen Kontakte, die es ausbildet, und der geringen Molekülgröße auch nicht unerwartet. Man kann jedoch versuchen, über chemische Modifikationen aus diesem Fragment ein Molekül mit stabilisierenden Eigenschaften abzuleiten.

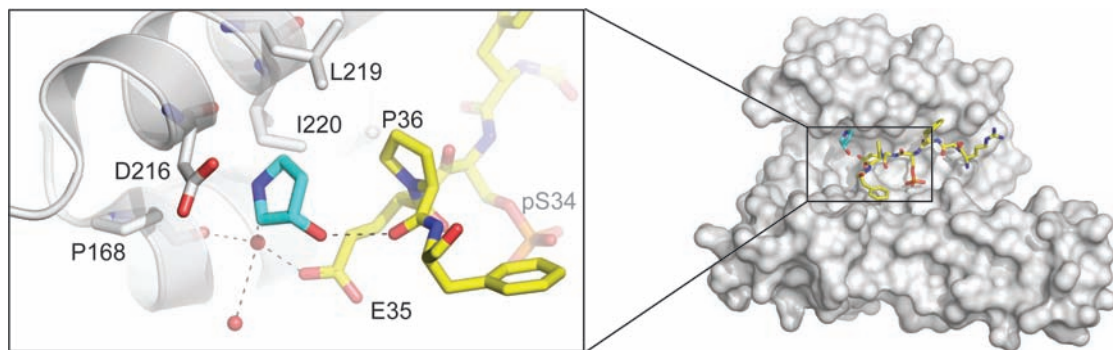


Abbildung 5.1: Fragment im 14-3-3 ϵ /MLF1₂₉₋₄₂pS34-Komplex. Das 14-3-3-Protein ist in grau als Oberflächendarstellung beziehungsweise im Detailausschnitt als Bändermodell dargestellt. Die für die Wechselwirkung mit 3-Pyrrolidinol (türkis) wichtigen AS sind als Stäbchenmodell gezeigt und beschriftet. Das MLF1-Peptid ist in gelb als Stäbchenmodell gezeigt und die wichtigen AS beschriftet (PDB ID: 3UBW). Abbildung modifiziert nach Molzan *et al.* (2012).

5.3. Untersuchung der Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen

5.3.1. Physiologischer Effekt von S259

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen gefundenen *RAF1*-Mutationen, die das S259 der C-RAF-Kinase umgeben (Pandit *et al.*, 2007; Razaque *et al.*, 2007), intensiv biochemisch und zellbiologisch untersucht (siehe Abschnitt 1.5.4). Dabei konnte mit strukturbiologischen Methoden gezeigt werden, dass die gefundenen Mutationen alle AS betreffen, die an der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung direkt beteiligt sind (siehe Abbildung 1.19A und B). Mittels ITC konnte belegt werden, dass diese Mutationen die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung stören oder sogar verhindern (siehe Abbildung 1.19C). In HEK293-Zellen hatten diese Mutationen Einfluss

auf die subzelluläre Lokalisation eines C-terminal verkürzten C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins. Die durch 14-3-3-Proteine bedingte Lokalisation im CP wurde durch die Mutationen aufgehoben und eine Co-Expression mit H-RAS führte zu einer Co-Lokalisation des C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins mit H-RAS an der PM und am Golgi (siehe Abbildung 1.20).

In der vorliegenden Arbeit wurde der physiologische Effekt dieser Mutationen auf die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung untersucht. Dafür wurde in HEK293-Zellen, die mit H-RAS und GFP-C-RAF₃₃₀ΔC co-transfiziert wurden, das endogene C-RAF über eine Immunfärbung sichtbar gemacht. Während das WT-C-RAF₃₃₀ΔC eine deutliche Co-Lokalisation mit dem endogenen C-RAF aufwies, zeigten die eingesetzten Mutanten eine ausschließliche Lokalisation an der PM und am Golgi (siehe Abbildung 4.12). In den Zellen, die mit den mutierten C-RAF₃₃₀ΔC-Konstrukten transfiziert worden waren, war das endogene C-RAF ebenso wie in den Zellen, die mit WT-C-RAF₃₃₀ΔC transfiziert worden waren, überwiegend im CP lokalisiert. Es zeigte sich keine Co-Lokalisation mit dem mutierten C-RAF₃₃₀ΔC an der PM oder am Golgi. Eine derartige Co-Lokalisation wäre ein Hinweis auf eine Dimerisierung des transfizierten C-RAF₃₃₀ΔC mit dem endogenen C-RAF gewesen. Diese Dimerisierung findet offenbar nicht statt, was verschiedene Gründe haben kann. Zum einen liegt das endogene C-RAF in unstimulierten Zellen an S259 phosphoryliert und darüber an 14-3-3-Proteine gebunden im CP vor (Dhillon und Kolch, 2002). Daher ist eine Translokation an die PM nicht möglich. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass nur etwa 30 % der C-RAF-Proteine einer Zelle an S259 phosphoryliert vorliegen (Dumaz *et al.*, 2002; Dumaz und Marais, 2003). Diesen unphosphorylierten Proteinen könnte es möglich sein, an die PM zu translozieren und dort mit dem C-RAF₃₃₀ΔC zu dimerisieren. Zum anderen wird vermutet, dass die Dimerisierung der C-RAF-Kinase hauptsächlich über das pS621 und damit einhergehend über die Bindung von 14-3-3-Proteinen an den C-Terminus vermittelt wird (siehe Abbildung 1.17 und Weber *et al.* (2001); Rushworth *et al.* (2006)). Da für die heterologe Expression ein C-terminal verkürztes C-RAF-Protein verwendet wurde, kann die Dimerisierung über den C-Terminus nicht mehr stattfinden. Somit stimmt dieses Resultat mit den publizierten Ergebnissen überein, dass C-RAF hauptsächlich über seinen C-terminalen Bereich dimerisiert.

Da das GFP-C-RAF₃₃₀ΔC, das die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen gefundenen C-RAF-Mutationen trägt, in unstimulierten HEK293-Zellen mit H-RAS an der PM und am Golgi co-lokalisieren kann (siehe Abbildungen 1.20 und 4.12), lässt sich vermuten, dass diese Mutationen in der Volllänge C-RAF-Kinase eine Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade bewirken können. Diese Signalkaskade wird in gesunden Zel-

len durch einen externen Stimulus initiiert. Über eine RTK wird RAS aktiviert, welches RAF an die PM rekrutiert (siehe Abschnitt 1.5.3 und Abbildung 1.15). Um den Einfluss der Mutationen auf den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit GFP-C-RAF(VL) als WT oder mutiert transfiziert und das Zellysate anschließend über einen Immunoblot auf ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass die in Noonan- und LEOPARD-Syndromen gefundenen Mutationen um S259 des C-RAF-Proteins in unstimulierten HEK293T-Zellen zu einer ERK1/2-Phosphorylierung führen. Diese Mutationen bewirken also eine Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade unabhängig von externen Stimuli. Zu den ebenfalls in Noonan- und LEOPARD-Syndromen als mutiert gefundenen Genen gehören neben *RAF1* auch noch *PTPN11*, *SOS1* und *KRAS* (Tartaglia *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2007; Tartaglia *et al.*, 2007; Carta *et al.*, 2006; Schubbert *et al.*, 2006). Mutationen in diesen Genen führen ebenfalls zu einer Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade. Somit passt die für die Mutationen in C-RAF gefundene Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade gut zu den Auswirkungen der Mutationen anderer Gene in Noonan- und LEOPARD-Syndrom.

5.3.2. S233- und S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung

Über die S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung ist im Gegensatz zu den S259- und S621-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkungen vergleichsweise wenig bekannt (siehe Abschnitt 1.5.4). Die Untersuchung dieser Wechselwirkung war daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Interesse.

Für die biochemische Untersuchung der S233-vermittelten Wechselwirkung wurde 14-3-3 ζ heterolog in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über einen His6-Tag aufgereinigt. Die Reinheit des Proteins konnte anhand einer SDS-PAGE-Analyse auf über 95 % geschätzt werden und war damit ausreichend für die nachfolgenden Untersuchungen. Wie unter 5.1.1 bereits erläutert, stellt die Verwendung von synthetischen Phosphopeptiden eine sinnvolle Alternative zu heterolog exprimierten Proteinen bei der Untersuchung der phosphorylierungsabhängigen 14-3-3-Wechselwirkungen dar. Für die Bestimmung der K_D -Werte mittels FP wurden daher N-terminal mit FAM-markierte, kurze C-RAF-Phosphopeptide verwendet. Für das FAM-C-RAF_(229–238)pS233-Peptid konnte ein K_D -Wert von 170,87 μ M an das 14-3-3 ζ -Protein bestimmt werden. Verglichen zu dem K_D -Wert des im gleichen Versuchsaufbau gemessenen FAM-C-RAF_(254–264)pS259-Peptids von 16,67 μ M ist der für das FAM-C-RAF_(229–238)pS233-Peptid bestimmte K_D -Wert etwa eine Größenordnung höher. Die S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwir-

kung ist damit deutlich schwächer als die S259-vermittelte. Weiterhin war es interessant zu überprüfen, ob eine gleichzeitig über die S233 und S259 vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung möglich ist. Es ist bekannt, dass zwei 14-3-3-Bindestellen synergistisch wirken und die Affinität zum 14-3-3-Protein erhöhen können (siehe Abschnitt 1.3.3 und Yaffe *et al.* (1997); Obsil *et al.* (2003); Kosteletzky *et al.* (2009)). Zudem wurde die Vermutung aufgestellt, dass die S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkungen gleichzeitig stattfinden und S259 dabei die *gatekeeper*-AS darstellt (siehe Abschnitte 1.3.3 und 1.5.4 und Yaffe *et al.* (1997); Dumaz und Marais (2003)). Dafür wurde FAM-C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid mit 14-3-3 ζ titriert und ein K_D -Wert von $0,35 \mu\text{M}$ bestimmt. Dieser ist deutlich niedriger als die für die einzelnen Bindestellen bestimmten K_D -Werte. Das bedeutet, dass auch im Fall der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung zwei 14-3-3-Bindestellen (S233 und S259) synergistisch wirken.

Da die beiden Bindestellen wie oben beschrieben eine unterschiedliche Affinität zum 14-3-3-Protein aufwiesen, wurde als nächstes überprüft, mit welcher Stöchiometrie die C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung stattfindet. Dafür waren mehrere Möglichkeiten vorstellbar (siehe Abbildung 4.16), die sowohl die Bindung des Diphosphopeptids an ein 14-3-3-Dimer in *cis* als auch in *trans* miteinbezogen. Zur Bestimmung der molaren Bindungsstöchiometrie (N) erfolgten ITC-Messungen mit 14-3-3 ζ und einem unmarkierten C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid, die eine Bindungsstöchiometrie von $N \approx 1$ bezogen auf ein 14-3-3-Dimer ergaben. Eine *Active Site Titration* des FAM-markierten C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptids mit 14-3-3 ζ und anschließender Messung über FP bestätigte dieses Ergebnis. Dadurch ließ sich die Möglichkeit ausschließen, dass das C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid mit einer 2:1 Stöchiometrie an ein 14-3-3-Dimer bindet.

Zur weiteren Untersuchung der gleichzeitig über S233 und S259 vermittelten Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen wurde ein Komplex aus 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ und C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid kristallisiert und mittels Röntgenkristallographie strukturell untersucht. Dafür wurde 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ heterolog in *E.coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über einen His6-*Tag* aufgereinigt. Der für die Kristallisation hinderliche His6-*Tag* wurde durch TEV-Protease abgespalten und über präparative Gelfiltration entfernt. Anschließend lag das Protein in ausreichender Menge und Qualität für die Proteinkristallisation vor. Von den erhaltenen Kristallen des 14-3-3 $\zeta\Delta\text{C}$ /C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Komplexes konnte mit Synchrotron-Strahlung ein Datensatz bis $1,95 \text{ \AA}$ aufgenommen werden. Über molekularen Ersatz mit dem bekannten Strukturmodell eines 14-3-3 ζ -Proteins im Komplex mit einem C-RAF-

Konformation	Möglichkeit	direkter Abstand in Å
<i>trans</i>	1	33,8
<i>trans</i>	2	43,1
<i>trans</i>	3	53,1
<i>cis</i>	-	31,4
elongiert	19mer-Peptid	49,0

Tabelle 16: Direkte Abstände von P235 zu R256 des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptids in verschiedenen denkbaren Konformationen (*cis* und *trans*) für symmetrieverwandte Komplexe im Proteinkristall gemessen. Als Vergleich ist die Länge eines 19mer-Peptids in elongierter Konformation angegeben.

Phosphopeptid (PDB ID: 3NKX) wurde die Struktur des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C und C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid gelöst. Das erhaltene Strukturmodell zeigt, dass die beiden amphipathischen Gruben des 14-3-3 ζ -Dimers mit den unterschiedlichen Bindestellen des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptids besetzt sind (siehe Abbildung 4.21). In diesem Strukturmodell sind die 19 AS nicht sichtbar, welche die beiden 14-3-3-Bindestellen des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptids miteinander verbinden. Für sie war keine interpretierbare Elektronendichte vorhanden, was auf eine hohe Flexibilität dieser AS schließen lässt. Zur Beantwortung der Frage, in welcher Form das C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptid an das 14-3-3 ζ -Dimer bindet, wurden die symmetrieverwandten Komplexe im Proteinkristall betrachtet (siehe Abbildung 4.22). Dies führte zu der Überlegung, dass zusätzlich zu einer Bindung in *cis* drei mögliche Bindungen in *trans* denkbar wären. Um zu überprüfen, welche dieser Möglichkeiten in Betracht kommen könnte, wurden die direkten Abstände von P235 in einem Komplex bis zum R256 in einem benachbarten Komplex gemessen. Auch der direkte Abstand von P235 zu R256 in demselben Komplex, also der möglichen *cis*-Konformation, wurde gemessen. Die gemessenen Abstände sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Messung des direkten Abstands verläuft für die drei möglichen *trans*-Konformationen jeweils durch das 14-3-3-Protein. Daher können diese Messungen nur als Näherung betrachtet werden. Unter Annahme der durchschnittlichen Bindungslängen einer Peptidbindung kann ein 19mer-Peptid in elongierter Konformation maximal 49,0 Å überbrücken. Der direkte Abstand von P235 zu R256 in einem benachbarten Komplex beträgt bei der 3. möglichen *trans*-Konformation hingegen 53,1 Å, was durch 19 AS nicht zu überbrücken ist. Daher kann diese *trans*-Konformation (siehe Tabelle 16) ausgeschlossen werden. Die anderen beiden *trans*-Konformationen können aufgrund der hier durch-

geführten Abstandsmessung nicht ausgeschlossen werden. Jedoch erscheint eine Bindung des C-RAF_(229–264)pS233,pS259-Diphosphopeptids an das 14-3-3 ζ -Dimer in *cis* am wahrscheinlichsten. Die direkte Abstandsmessung führte für diese Konformation nicht durch ein 14-3-3-Protein. Damit sind sterische Konflikte der 19 AS mit dem 14-3-3-Protein in einer *cis*-Konformation nahezu ausgeschlossen. Der gemessene direkte Abstand von P235 zu R256 ist mit 31,4 Å geringer als die für die übrigen *trans*-Konformationen gemessenen Abstände. Angesichts der Tatsache, dass die 19 AS keine interpretierbare Elektronendichte lieferten, ist zu beachten, dass sie in einer flexiblen Konformation vorzuliegen scheinen. Auch diese Flexibilität wäre bei einem zu überbrückenden direkten Abstand von 31,4 Å und keinem sterischen Konflikt mit dem 14-3-3-Protein am ehesten für die *cis*-Konformation gewährleistet.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der S259-Bindestelle in HEK293-Zellen zu einer veränderten subzellulären Lokalisation eines C-terminal verkürzten GFP-C-RAF₃₃₀ Δ C-Fusionsproteins verglichen mit dem entsprechenden WT-Protein führt (siehe Abschnitt 1.5.4 und Abbildung 1.20). Diese veränderte Lokalisation ist auf eine gestörte Bindung des C-RAF-Proteins an 14-3-3-Proteine zurückzuführen, welche die WT-C-RAF-Kinase in unstimulierten Zellen im CP halten. Die Mutation der S259-Bindestelle führt ebenfalls dazu, dass das C-RAF₃₃₀ Δ C-Protein, wenn es mit H-RAS heterolog co-exprimiert wird, mit diesem an der PM und am Golgi co-lokalisiert. Das unterstützt die These, dass RAS und 14-3-3-Proteine um die Bindung an C-RAF konkurrieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass C-RAF *in vitro* über die S233-Bindestelle an 14-3-3-Proteine binden kann. Außerdem wird vermutet, dass die S233- und S259-Bindestellen des C-RAF-Proteins in Zellen zusammen für die Rekrutierung von 14-3-3-Proteinen an den N-Terminus der C-RAF-Kinase verantwortlich sind (Dumaz und Marais, 2003). Daher wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss die S233-vermittelte Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen auf die subzelluläre Lokalisation des C-RAF₃₃₀ Δ C-Proteins in HEK293T-Zellen hat. Abbildung 4.23 zeigt, dass die Mutation S233A, die eine Bindung von 14-3-3-Proteinen an die S233-Bindestelle verhindert, einen mit der S259A-Mutation vergleichbaren Effekt auf die subzelluläre Lokalisation C-RAF₃₃₀ Δ C-Proteins hat. Das C-RAF₃₃₀ Δ C-Protein kann durch die S233A-Mutation nicht mehr über die Bindung an 14-3-3-Proteine im CP der HEK293T-Zellen gehalten werden, sondern transloziert in den ZK. Es ist bekannt, dass ein GFP-C-RAF-RBD-Fusionsprotein überwiegend im ZK lokalisiert ist (Chiu *et al.*, 2002). WT-C-RAF wird in unstimulierten Zellen demnach sowohl über sie S233- als auch über sie S259-

vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung im CP gehalten. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten des CP und ZK verdeutlichte zudem, dass ein schwacher, aber statistisch signifikanter Unterschied in der subzellulären Lokalisation zwischen der S233A- und der S259A-Mutante besteht. Das Verhältnis ZK/CP ist für die S259A-Mutante höher als für die S233A-Mutante. Das bedeutet, dass der Einfluss der S233A-Mutation auf die subzelluläre Lokalisation des C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins nicht so groß ist wie der Einfluss der S259A-Mutation. Vermutlich liegt ein Teil der S233A-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteine weiterhin über das S259-vermittelt an 14-3-3-gebunden im CP vor. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die S259-Bindestelle für die subzelluläre Lokalisation des C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins wichtiger zu sein scheint als die S233-Bindestelle. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen biochemischen und strukturellen Daten, welche belegen, dass die S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung deutlich schwächer ist als die S259-vermittelte.

Zusätzlich wurde überprüft, welchen Einfluss eine Co-Expression mit H-RAS auf die subzelluläre Lokalisation der S233A-Mutante des C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins verglichen mit dem WT und der S259A-Mutante hat. Abbildung 4.24 zeigt, dass die S233A-Mutante des C-RAF₃₃₀ΔC-Protein ebenso wie die S259A-Mutante mit H-RAS an der PM colokalisieren kann. Die S233A-Mutation selbst hat zwar eine schwächere Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation des C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins als die S259A-Mutation. Dennoch reicht der Effekt der S233A-Mutation aus, um das C-RAF₃₃₀ΔC-Protein ohne externen Stimulus von H-RAS an die PM rekrutieren zu lassen, wie es auch für die S259A-Mutation beobachtet wurde. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch eine gestörte S233-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung einen aktivierenden Effekt auf den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg hat, wie es für die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung beobachtet wurde (siehe Abschnitt 4.3.2 und 5.3.1).

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen mit GFP-C-RAF(VL) als WT oder S233A- beziehungsweise S259A-Mutante transfiziert und das Zelllysate anschließend über einen Immunoblot auf ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die S233A-Mutation im Gegensatz zu der S259A-Mutation nicht zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führt (siehe Abbildung 4.25). Für diese Beobachtung sind zwei verschiedene Erklärungen denkbar. Zum einen kann es sein, dass der geringere Einfluss der S233-Bindestelle, wie er zuvor *in vitro* und für das C-terminal verkürzte C-RAF₃₃₀ΔC gezeigt werden konnte, dafür sorgt, dass sich das S233A-Volllängen-C-RAF-Protein eher wie das WT-Protein verhält. Das würde bedeuten, dass sich in diesem Fall, im Gegensatz zu den Untersuchungen für die S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-

Wechselwirkung, die mit dem S233A-C-RAF₃₃₀ΔC gefundenen Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation nicht direkt auf das Volllängen-Protein übertragen lassen. Zum anderen könnte es sein, dass die durch die S233A-Mutation hervorgerufene Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs und damit einhergehend die ERK1/2-Phosphorylierung so schwach ist, dass sie mit dem durchgeführten Experiment nicht detektiert werden kann. Für die durchgeführte Detektion der ERK1/2-Phosphorylierung wurde das Zellysats von transfizierten Zellen verwendet. Die Transfektionsrate liegt üblicherweise zwischen 10 % und 30 %. Dadurch kann es vorkommen, dass schwache, tranfektionsabhängige Signale mit dieser Methode nicht detektiert werden können. Für diese Vermutung spricht die beobachtete, leicht unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der S233A- und S259A-Mutanten des C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins und die daraus gefolgerte Vermutung, dass ein Teil des S233A-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins über S259-vermittelt an 14-3-3-Proteine im CP gebunden bleibt. Wenn diese Vermutung für das Volllängen-Protein ebenfalls zutrifft, wäre eine Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs und eine daraus resultierende Phosphorylierung von ERK1/2 deutlich schwächer. Daher ist es notwendig diese Ergebnisse mit weiteren Experimenten zu überprüfen.

Zusammengenommen weisen die Untersuchungen zur S233-vermittelten und zu der gleichzeitig über S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung darauf hin, dass C-RAF über S233 und S259 gleichzeitig an 14-3-3-Proteine binden kann. Beide Bindestellen vermitteln in unstimulierten Zellen eine Bindung von C-RAF an 14-3-3-Proteine im CP. Zudem wirkt die gleichzeitige Bindung von C-RAF über S233 und S259 an 14-3-3-Proteine synergistisch und erhöht *in vitro* die Affinität zum 14-3-3-Protein deutlich verglichen zu den einzelnen Bindestellen. Die Tatsache, dass die S233-Bindestelle in Zellen vermutlich ebenso so wie die S259-Bindestelle inaktivierend auf die C-RAF-Kinase wirkt (Dumaz *et al.*, 2002; Dumaz und Marais, 2003), spricht dafür, dass es sich bei der S259 Bindestelle um die *gatekeeper*-AS handelt. S233 stellt in diesem Fall die Bindestelle mit der niedrigen Affinität dar. Diese Schlussfolgerung stimmt mit der von Dumaz und Marais (2003) angestellten Vermutung überein. Sie widerspricht aber der Vermutung, dass S621 die *gatekeeper*-AS darstellt und S259 die niedrig affine Bindung vermittelt (Hekman *et al.*, 2004).

Um abschließend zu klären, welche AS die *gatekeeper*-AS darstellt, wäre die strukturelle Aufklärung der Volllängen-C-RAF-Kinase wichtig. Diese Struktur könnte Aufschluss darüber geben, ob eine gleichzeitige Bindung der C-RAF-Kinase über S259 und S621 an 14-3-3-Proteine sterisch überhaupt möglich ist. Bisher ist jedoch keine strukturelle Information darüber verfügbar, wie die drei 14-3-3-Bindestellen der C-RAF-Kinase

im Volllängenprotein zueinander orientiert sind. Um die Regulation der C-RAF-Kinase durch 14-3-3-Proteine weiter aufzuklären sind zusätzliche zellbiologische Untersuchungen notwendig. Insbesondere Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierte Einzelmolekülmessungen könnten Aufschluss über die Bindungsstöchiometrie von C-RAF- und 14-3-3-Proteinen in der Zelle geben. Da es sich sowohl bei dem 14-3-3-Protein als auch bei der C-RAF-Kinase um ein dimeres Protein handelt, sind Einzelmolekülmessungen jedoch nicht ohne Weiteres möglich. Zudem können typische Mutations- und Deletionsstudien irreführend sein. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Mutation der S621-Bindestelle zu einer Inaktivierung der C-RAF-Kinase führt (Thorson *et al.*, 1998). Das bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass diese Inaktivierung 14-3-3-abhängig ist. Eine gute Alternative scheint der Ersatz einzelner phosphorylierungsabhängiger 14-3-3-Bindemotive durch die phosphorylierungsunabhängige Sequenz des R18-Peptids zu sein (siehe Abschnitt 1.3.3). Damit konnte bereits der Einfluss der 14-3-3-Bindung an die C-terminale S621-Bindestelle des C-RAF-Proteins erfolgreich untersucht werden (Light *et al.*, 2002).

5.4. Stabilisierung der Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen durch Cotylenin A

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass C-RAF *in vitro* sowohl über die S233- als auch gleichzeitig über die S233- und S259-Bindestellen an 14-3-3-Proteine binden kann. Die gleichzeitige Bindung über S233 und S259 erhöht *in vitro* die Affinität des C-RAF-Proteins an das 14-3-3-Protein im Vergleich zu den einzeln über S233- oder S259-vermittelten Bindungen. Weiterhin wurde gezeigt, dass in unstimulierten HEK293T-Zellen C-RAF sowohl über die S233- als auch über die S259-vermittelte Wechselwirkung mit 14-3-3-Proteinen im CP gehalten wird. Ebenso wie die Störung der S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung führt die Störung der S233-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung zu einer veränderten subzellulären Lokalisation eines C-terminal verkürzten GFP-C-RAF₃₃₀ΔC-Proteins. Zusammen mit publizierten Erkenntnissen, dass sowohl die S233- als auch die S259-vermittelten Wechselwirkungen von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen einen inaktivierenden Effekt auf die C-RAF-Kinase haben (Tzivion *et al.*, 1998; Dhillon und Kolch, 2002; Dumaz *et al.*, 2002; Kubicek *et al.*, 2002; Light *et al.*, 2002; Dumaz und Marais, 2003), scheint es ein möglicher therapeutischer Ansatz zu sein, die S233- und S259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung zu stabilisieren.

Bisher war FCA zusammen mit Epibestatin und Pyrrolidon 1 als einziger Stabilisator von 14-3-3-PPIs bekannt (siehe Abschnitt 1.2.2). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass FCA als Stabilisator der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung nicht funktioniert (siehe Abschnitt 4.5.1). Allerdings wurde veröffentlicht, dass das mit FCA verwandte Molekül CNA (siehe Abbildung 4.28) an einen Komplex aus dem pflanzlichen 14-3-3c-Protein und einem C-RAF₍₂₅₅₋₂₆₅₎pS259,M265A-Peptid binden kann (Ottmann *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass CNA auch an den Komplex aus dem C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259-Peptid und dem humanen 14-3-3 ζ Δ C binden kann. Die strukturbiologische Untersuchung zeigte, dass das CNA-Molekül jeweils eine Bindegrube im C-terminalen Bereich der C-RAF-Bindesequenzen einnimmt (siehe Abbildung 4.29). Die von CNA besetzten Bindegruben werden sowohl durch das 14-3-3-Protein als auch durch das C-RAF-Peptid gebildet. Daher schien CNA als Stabilisator der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung in Frage zu kommen.

Die Untersuchung mittels SPR konnte belegen, dass CNA die Wechselwirkung von 14-3-3 ζ und C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 mit einem EC₅₀ von 156 μ M stabilisieren kann (siehe Abbildung 4.30). In einem weiterführenden FP-Experiment wurde daraufhin gezeigt, dass CNA nicht nur die gleichzeitig über S233- und S259- vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung stabilisieren kann, sondern auch die Wechselwirkungen der einzelnen Bindestellen mit 14-3-3 ζ . Die gemessenen EC₅₀-Werte unterscheiden sich jedoch signifikant für die einzelnen Bindestellen. Der Differenz ist vergleichbar mit den Unterschieden in den gemessenen K_D-Werten für die einzelnen Bindestellen (siehe Tabellen 10 und 14). Der mittels FP für die Stabilisierung der Wechselwirkung von 14-3-3 ζ und C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 durch CNA gemessene EC₅₀-Wert von 65,44 μ M ist in guter Übereinstimmung mit dem mittels SPR für diese Stabilisierung bestimmten Wert. In Anwesenheit von 500 μ M CNA verringert sich der K_D-Wert der Wechselwirkung von 14-3-3 ζ mit FAM-C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 von 350 nM auf 20 nM. Damit erhöht sich die Affinität dieser Wechselwirkung in Anwesenheit von CNA etwa 17-fach.

Da die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung vermutlich dem Effekt der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung entgegen wirkt (siehe Abschnitt 1.5.4 und Hekman *et al.* (2004)), wäre eine gleichzeitige Stabilisierung aller drei C-RAF-Bindestellen an 14-3-3-Proteine nicht sinnvoll. Ein Stabilisator hätte dann womöglich *in vivo* keinen Effekt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, welchen Einfluss CNA auf die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung hat. Durch FP-Messungen konnte belegt werden, dass CNA die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-

Wechselwirkung nicht stabilisiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits der Austausch der +1-AS von T, wie es in der S233- und der S259-Bindestelle vorkommt, zu E, wie es in der S621-Bindestelle vorkommt, ausreicht, um eine Stabilisierung des Komplexes durch CNA zu verhindern (siehe Abbildung 4.34). Dieser experimentelle Befund konnte durch strukturbiochemische Daten unterstützt werden. Dafür wurde ein Komplex aus 14-3-3 σ Δ C und C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621-Peptid kristallisiert und röntgenkristallographisch ein Datensatz bis 1,70 Å aufgenommen. Über molekularen Ersatz mit dem bekannten Strukturmodell des 14-3-3 σ -Proteins konnte die Struktur gelöst werden (siehe Abbildung 4.36). Die Überlagerung des erhaltenen Strukturmodells des C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621/14-3-3 σ -Komplexes mit dem Strukturmodell des Komplexes aus 14-3-3 ζ und C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259 verdeutlicht, dass ein E an der +1-Position sterisch inkompatibel mit einer gleichzeitigen Bindung von CNA ist (siehe Abbildung 4.37). Das erklärt, warum CNA die S621-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung nicht stabilisieren kann.

Im nächsten Schritt wäre es wichtig zu überprüfen, ob die *in vitro* gefundene Stabilisierung der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung durch CNA auch in Zellen stattfindet, und ob eine derartige Stabilisierung den erwarteten physiologischen Effekt, eine Unterbrechung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs, hat. Für eine derartige Untersuchung müssen jedoch die im Folgenden aufgeführten Probleme gelöst oder umgangen werden. Zunächst ist der *in vitro* gemessene EC₅₀-Wert von CNA für die Stabilisierung mit etwa 65 μ M für die gleichzeitig über S233- und 259-vermittelte C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung vermutlich zu hoch, um in Zellen einen Effekt zu zeigen. Man muss davon ausgehen, dass in einem Zellversuch der eingesetzte Wirkstoff nicht vollständig aufgenommen wird. Weiterhin kann es zu einem Abbau des Wirkstoffs durch die Zelle kommen und es können Nebenwirkungen auftreten, wenn zum Beispiel CNA auch noch an weitere in der Zelle vorhandene Komplexe mit einer sterisch kompatiblen +1- AS bindet. Somit ist es schwierig, die effektive CNA-Konzentration für die Stabilisierung der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung in Zellen im Überschuss zu dosieren, was nötig wäre, um einen zellulären Effekt zu beobachten. Zudem ist CNA in hohen Konzentrationen (etwa über 1 mM) nicht wasserlöslich. Dadurch entstehende Lösungsmittelleffekte können zellbiologische Untersuchungen zusätzlich beeinflussen. Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg wird durch einen externen Stimulus wie EGF aktiviert. Zur Untersuchung der physiologischen Wirkung müsste also der Effekt von CNA entgegen dem RAS-RAF-MEK-ERK untersucht werden. Durch die Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkasade wird die Dephosphorylierung des S259 am

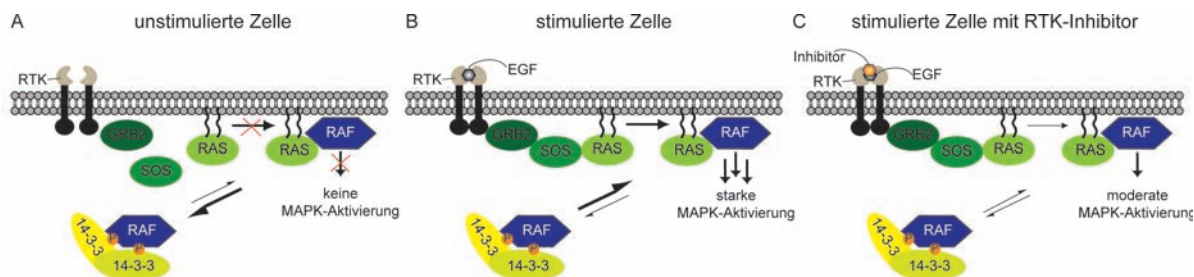


Abbildung 5.2: Unterschiedliche MAPK-Aktivierungszustände. (A) In unstimulierten Zellen ist der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg nicht aktiv. (B) Eine Stimulierung mit beispielsweise EGF bewirkt eine Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs. (C) Eine gleichzeitige Stimulierung mit EGF und Inhibition der RTK sollte eine moderate Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs bewirken. In diesem Zustand könnte der Einfluss von CNA in Zellen besser messbar sein.

C-RAF induziert und gleichzeitig erhöht der Austausch von GTP für GDP die Affinität von RAS und RAF etwa 1000-fach auf $0,1 - 0,3 \mu\text{M}$ (Block *et al.*, 1996; Filchtinski *et al.*, 2010). RAS und 14-3-3-Proteine konkurrieren in Zellen um eine Bindung an C-RAF. Durch die Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs könnte sich das Gleichgewicht zwischen 14-3-3-gebundenem C-RAF und RAS-gebundenem C-RAF soweit zur RAS-gebundenen Seite verschieben, dass CNA aufgrund des hohen EC_{50} -Werts keinen Effekt zeigen kann. Um diesen physiologischen Effekt zu umgehen, könnte man entweder den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg an anderer Stelle, zum Beispiel durch gleichzeitige, teilweise Inhibition der RTK, abschwächen (siehe Abbildung 5.2) oder sich sogenannter FRET-basierter zellulärer Sensoren bedienen (Adams *et al.*, 1991). Diese bestehen aus einem Fusionsprotein aus den beiden zu untersuchenden Proteinen sowie jeweils einem N-terminal und C-terminal fusioniertem Fluorophor (siehe Abbildung 5.3). Durch die Fusion der beiden zu untersuchenden Proteine wird die lokale Konzentration erhöht. Das hat den Vorteil, dass man gegebenenfalls mit einer niedrigeren effektiven Wirkstoffkonzentration in den Zellen mehr sehen könnte als durch Betrachten des nativen Signalwegs. Jedoch ist es wichtig, den Sensor auf seine Funktionalität hin zu überprüfen. Häufig werden nur die Bereiche eines Proteins in dem Sensor verwendet, die für die Untersuchung der Wechselwirkung von Interesse sind, also beispielsweise nur eine 14-3-3-Bindestelle der C-RAF-Kinase, nicht aber das Vollängenprotein mit der gesamten Kinasedomäne. Daher muss überprüft werden, ob die entsprechenden für die Regulation der Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen und Phosphatasen diese Sequenz noch als Substrat erkennen. Auch müssen die beiden Fluorophore durch die Wechselwirkung so zusammenkommen können, dass ein FRET-Signal erzeugt werden kann.

Um die Wirkung von CNA als Stabilisator der S233- und S259-vermittelten Wechselwirkung von C-RAF mit 14-3-3-Proteinen zu verbessern, könnte es chemisch derivatisiert

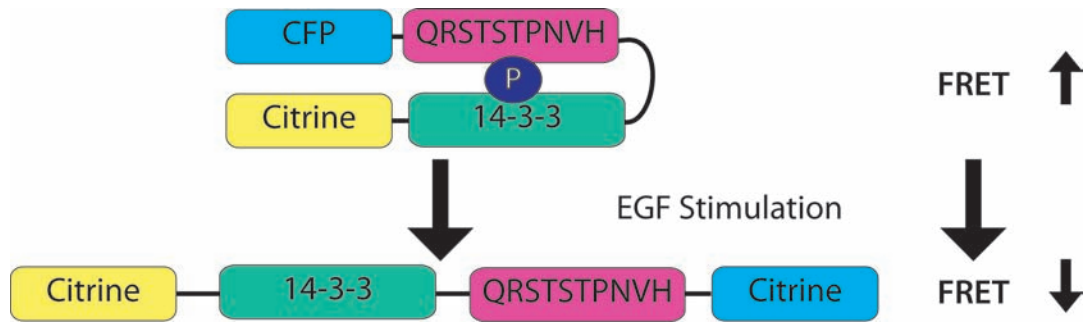


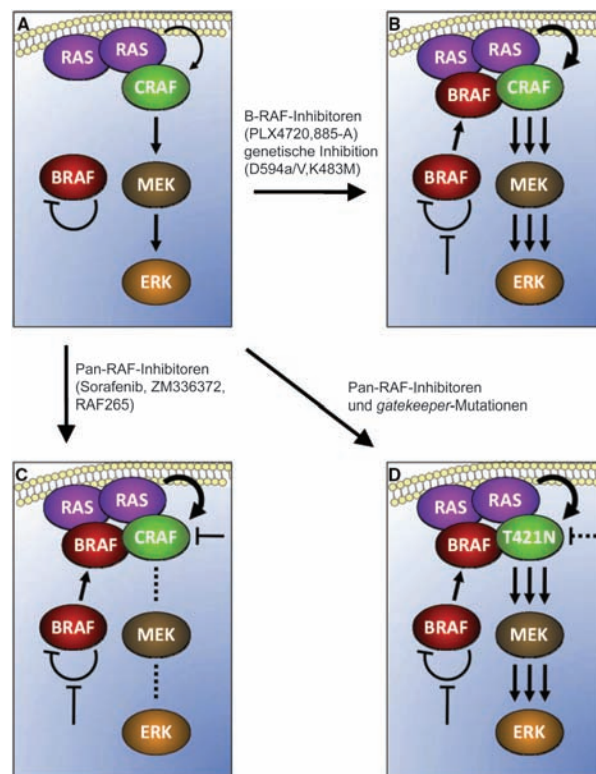
Abbildung 5.3: FRET-basierter zellulärer Sensor. Ein Sensor zur Untersuchung der Stabilisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung durch CNA könnte ein 14-3-3-Protein und die S259-Bindestelle de CRAF-Proteins beinhalten. N-terminal könnte als Fluorophor Citrine und C-Terminal das *cyan fluorescent protein* (CFP) fusioniert werden. In humanen Zellen sollte eine EGF-Stimulierung eine Dephosphorylierung der S259-Bindestelle bewirken und damit einhergehend die Bindung an das 14-3-3-Protein aufheben. Dadurch würden die beiden Fluorophore ihre räumliche Nähe verlieren und das FRET-Signal sollte deutlich verringert sein. In Anwesenheit von CNA sollte die EGF-induzierte FRET-Signaländerung deutlich verringert oder zeitlich verzögert sein.

und die Effekte der erhaltenen Derivate untersucht werden. Sowohl die chemische Synthese als auch die chemische Modifizierung dieses komplexen Naturstoffs konnte bis jetzt jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Daher scheint es sinnvoller, über HTS- oder FBDD-basierte Methoden neue Stabilisatoren zu identifizieren, die einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie CNA aufweisen, aber gleichzeitig chemisch leichter zugänglich sind als CNA. Ein derartiges Vorgehen war im Fall der Stabilisierung der PMA2 an 14-3-3-Proteine durch FCA bereits erfolgreich. Auf diese Weise konnten die Stabilisatoren Epibestatin und Pyrrolidon 1 identifiziert werden (Rose *et al.*, 2010). Gleichwohl konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Stabilisierung der C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung durch CNA prinzipiell möglich ist. Dies ist das erste Mal, dass eine Stabilisierung für eine 14-3-3-Wechselwirkung mit einem nicht-*mode III*-Bindemotiv nachgewiesen werden konnte.

Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg ist in 30 % aller humanen Tumore aktiviert (Downward, 2003). Dabei machen Mutationen der kleinen GTPase RAS mit 20 % den Hauptanteil der gefundenen Mutationen aus. Mutationen in B-RAF machen etwa 66 % aller in Melanomen gefundenen Mutationen aus (Davies *et al.*, 2002). Mutationen in C-RAF spielen hingegen in Tumoren mit nur etwa 1 % aller gefundenen Mutationen eine untergeordnete Rolle, wobei C-RAF-Amplifikationen und -Deletionen vor allem in Blasenkrebs häufiger vorkommen (Maurer *et al.*, 2011). Allerdings zeigte sich sowohl bei der Untersuchung der Homo- und Heterodimerisierung von B- und C-RAF als auch bei der Untersuchung der B-RAF-Kinase-Inhibitoren, dass katalytisch inaktives B-RAF über

C-RAF den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg anschalten kann (siehe Abschnitt 1.5.3, Abbildungen 1.16 und Wan *et al.* (2004); Garnett *et al.* (2005); Dumaz *et al.* (2006); Rushworth *et al.* (2006); Rajakulendran *et al.* (2009); Hatzivassiliou *et al.* (2010); Heidorn *et al.* (2010); Poulikakos *et al.* (2010)). Abbildung 5.4 zeigt, dass insbesondere die PM-Rekrutierung der C-RAF-Kinase durch RAS dafür von Bedeutung ist. Eine Stabilisierung der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung würde dieser Membranrekrutierung entgegen wirken und somit in Kombination mit B-RAF-Inhibitoren eine sinnvolle Alternative beziehungsweise Ergänzung zur klassischen Kinaseinhibition als Krebstherapie darstellen (siehe Abbildung 5.4B). Zudem ist es denkbar,

Abbildung 5.4: C-RAF-Aktivierung über B-RAF. (A) In der Gegenwart von onkogenem RAS ist B-RAF cytosolisch und hält sich selbst in einer inaktiven Konformation, abhängig von der eigenen Kinaseaktivität. C-RAF wird durch RAS an die PM rekrutiert, wodurch der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg eingeschaltet wird. (B) Wenn B-RAF durch Kinaseinhibitoren inhibiert wird, wird die Autoinhibition aufgehoben. RAS rekrutiert B-RAF an die PM, wo es mit C-RAF interagieren kann. Dadurch wird C-RAF und damit der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg aktiviert. (C) Pan-RAF-Inhibitoren hyperaktivieren C-RAF durch die Inhibition von B-RAF. Allerdings inhibieren sie auch die C-RAF-Kinaseaktivität, wodurch der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg inaktiv bleibt. (D) Die C-RAF T421N (*gatekeeper*)-Mutation macht diese Kinase resistent gegen Pan-RAF-Inhibitoren, sodass der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg über die B-RAF-Wechselwirkung mit C-RAF eingeschaltet wird. Abbildung modifiziert nach Heidorn *et al.* (2010).



dass ein Stabilisator der S233- und S259-vermittelten C-RAF/14-3-3-Wechselwirkung auch die A-RAF- und B-RAF-Wechselwirkung stabilisiert und somit ähnlich wie ein Pan-RAF-Inhibitor wirken könnte (siehe Abbildung 5.4C). Die S259-vermittelte 14-3-3-Bindestelle ist in allen drei RAF-Isoformen konserviert (S214 in A-RAF und S364 in B-RAF, siehe Abschnitt 1.5.1 und Abbildung 1.14). Über die Stabilisierung der zu S259 in C-RAF äquivalenten RAF/14-3-3-Wechselwirkung könnte CNA inaktivierend auf alle drei humanen RAF-Isoformen wirken. Zudem ist die S621-vermittelte 14-3-3-Bindestelle aus C-RAF auch in A- und B-RAF hoch konserviert (S582 in A-RAF und S728 in B-RAF). In allen drei Isoformen ist die +1 AS dieser 14-3-3-Bindestelle ein E, was

mit einer Stabilisierung durch CNA sterisch nicht kompatibel ist, wie es für C-RAF im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Somit würde eine Stabilisierung der RAF-Kinasen an 14-3-3-Proteine durch CNA nicht zu einer gleichzeitigen Aktivierung dieser RAF-Kinasen führen.

Literatur

- S.R. Adams, A.T. Harootunian, Y.J. Buechler, S.S. Taylor, R.Y. Tsien. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature*, 349:694–697, 1991.
- A. Aitken. 14-3-3 proteins: A historic overview. *Seminars in Cancer Biology*, 16(3): 162–172, June 2006.
- A. Aitken, D.B. Collinge, B.P.H. van Heusden, T. Isobe, P.H. Roseboom, G. Rosenfeld, J. Soll. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17:498–501, 1992.
- A. Aitken, H. Baxter, T. Dubois, S. Clokie, S. Mackie, K. Mitchell, A. Peden, E. Zemlickova. 14-3-3 Proteins in Cell Regulation. *Biochemical Society Transactions*, 30(4):351–360, 2002.
- B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 3rd edition, 1994. ISBN ISBN-10: 0-8153-4072-9.
- S. Ansari V. Helms. Statistical Analysis of Predominantly Transient Protein-Protein Interfaces. *Proteins*, 61(2):344–355, November 2005.
- A.N. Anselmo, R. Bumeister, J.M. Thomas, M.A. White. Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8):5940–5943, February 2002.
- M. Aouadi, B. Binetruy, L. Caron, Y. Le Marchand-Brustel, F. Bost. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*, 88(9): 1091–1098, September 2006.
- M.R. Arkin J.A. Wells. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(4):301–317, April 2004.
- R.P. Bahadur M. Zacharias. The interface of protein-protein complexes: Analysis of contacts and prediction of interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65:1059–1072, April 2008.
- R.P. Bahadur, P. Chakrabarti, F. Rodier, J. Janin. Dissecting Subunit Interfaces in Homodimeric Proteins. *Proteins*, 53(3):708–719, November 2003.
-

- A. Ballio, E.B. Chain, P. DeLeo, B.F. Erlanger, M. Mauri, A. Tonolo, P. De Leo. Fusicoccin: a New Wilting Toxin produced by *Fusicoccum amygdali* Del. *Nature*, 203 (4942):297–297, July 1964.
- J.V. Barnier, C. Papin, A. Eychène, O. Lecoq, G. Calothy. The Mouse B-raf Gene Encodes Multiple Protein Isoforms with Tissue-specific Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(40):23381–23389, October 1995.
- P. Batard, M. Jordan, F. Wurm. Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene*, 270(1-2):61–68, May 2001.
- B. Baumann, C.K. Weber, J. Troppmair, S. Whiteside, A. Israel, U.R. Rapp, T. Wirth. Raf induces NF- κ B by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9):4615–4620, April 2000.
- J.J. Bechet, M. Houadjeto, A. D'Albis. Active-site titration of enzymes at high concentration. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 161:343–349, 1986.
- H.C. Birnboim J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6):1513–1523, January 1979.
- C. Block, R. Janknecht, C. Herrmann, N. Nassar, A. Wittinghofer. Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nature Structural Biology*, 3(3):244–251, 1996.
- M.M. Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.
- W.H. Bragg W.L. Bragg. The Reflection of X-rays by Crystals. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 88(605):428–438, July 1913.
- A.C. Braisted, J.D. Oslob, W.L. Delano, J. Hyde, R.S. McDowell, N. Waal, C. Yu, M.R. Arkin, B.C. Raimundo. Discovery of a Potent Small Molecule IL-2 Inhibitor through fragment assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 125(13):3714–3715, April 2003.
-

-
- D. Bridges G.B.G. Moorhead. 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Science's STKE*, 2005(296):1–8, August 2005.
- J. Brosius, M. Erfle, J. Storella. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3539–3541, March 1985.
- T.A. Brown. *Genomes*. Bios Scientific Publishers, Oxford, 2nd edition, 2002. ISBN ISBN-10: 0-471-25046-5.
- T. Brummer, P. Martin, S. Herzog, Y. Misawa, R.J. Daly, M. Reth. Functional analysis of the regulatory requirements of B-Raf and the B-Raf(V600E) oncoprotein. *Oncogene*, 25(47):6262–6276, October 2006.
- A.T. Brünger. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355(6359):472–475, January 1992.
- A.T. Brünger. Free R Value: Cross-Validation in Crystallography. *Methods in Enzymology*, 277:366–396, 1997.
- C. Carta, F. Pantaleoni, G. Bocchinfuso, L. Stella, I. Vasta, A. Sarkozy, C. Digilio, A. Palleschi, A. Pizzuti, P. Grammatico, G. Zampino, B. Dallapiccola, B.D. Gelb, M. Tartaglia. Germline Missense Mutations Affecting KRAS Isoform B Are Associated with a Severe Noonan Syndrome Phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 79(1):129–135, July 2006.
- C.L. Cepko, B.E. Roberts, R.C. Mulligan. Construction and Applications of a Highly Transmissible Murine Retrovirus Shuttle Vector. *Cell*, 37:1053–1062, 1984.
- P. Chakrabarti J. Janin. Dissecting Protein-Protein Recognition Sites. *Proteins*, 47(3):334–343, 2002.
- M. Chaudhri, M. Scarabel, A. Aitken. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(3):679–685, January 2003.
- N.E. Chayen. Comparative Studies of Protein Crystallization by Vapour-Diffusion and Microbatch Techniques. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 54(1):8–15, January 1998.
-

- J. Chen, K. Fujii, L. Zhang, T. Roberts, H. Fu. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14):7783–7788, July 2001.
- J. Chen, L. Guo, D.A. Peiffer, L. Zhou, O.T.M. Chan, M. Bibikova, E. Wickham-Garcia, S.-H. Lu, Q. Zhan, J. Wang-Rodriguez, W. Jiang, J.B. Fan. Genomic profiling of 766 cancer-related genes in archived esophageal normal and carcinoma tissues. *International Journal of Cancer*, 122(10):2249–2254, May 2008.
- V.K. Chiu, T. Bivona, A. Hach, J.B. Sajous, J. Silletti, H. Wiener, R.L. Johnson, A.D. Cox, M.R. Philips. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nature Cell Biology*, 4(5):343–350, May 2002.
- H. Chong, H.G. Vikis, K.-L. Guan. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cellular Signalling*, 15(5):463–469, May 2003.
- F. Christ, A. Voet, A. Marchand, S. Nicolet, B.A. Desimmie, D. Marchand, D. Bardiot, N.J. Van der Veken, B. Van Remoortel, S.V. Strelkov, M. De Maeyer, P. Chaltin, Z. Debyser. Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nature Chemical Biology*, 6(6):442–448, June 2010.
- T. Clackson J.A. Wells. A Hot Spot of Binding Energy in a Hormone-Receptor Interface. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5196):383–386, January 1995.
- G.J. Clark, J.K. Drugan, K.L. Rossman, J.W. Carpenter, K. Rogers-Graham, H. Fu, C.J. Der, S.L. Campbell. 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(34):20990–20993, August 1997.
- A. Cuenda S. Rousseau. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8):1358–1375, August 2007.
- B. D. Cuevas, A.N. Abell, G.L. Johnson. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, 26(22):3159–3171, May 2007.
- M.E. Cusick, N. Klitgord, M. Vidal, D.E. Hill. Interactome: gateway into systems biology. *Human Molecular Genetics*, 14(2):R171–181, October 2005.
-

H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shiple, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W.C. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892):949–954, June 2002.

A.S.H. De Jong, M. Van Kessel-Van Vark, A.K. Raap. Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. *Histochemical Journal*, 17:1119–1130, 1985.

J. De Las Rivas C. Fontanillo. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Computational Biology*, 6(6): e1000807, June 2010.

W.L. DeLano. The PyMOL Molecular Graphics System, 1998.

A. Denouel-Galy, E.M. Douville, P.H. Warne, C. Papin, D. Laugier, G. Calothy, J. Downward, A. Eychène. Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Current Biology : CB*, 8(1):46–55, January 1998.

S. Dhar, J.A. Squire, M.P. Hande, R.J. Wellinger, T.K. Pandita. Inactivation of 14-3-3 $\bar{\text{I}}$, Influences Telomere Behavior and Ionizing Radiation-Induced Chromosomal Instability. *Molecular and Cellular Biology*, 20(20):7764–7772, 2000.

A.S. Dhillon W. Kolch. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404(1):3–9, August 2002.

A.S. Dhillon, C. Pollock, H. Steen, P.E. Shaw, H. Mischak, W. Kolch. Cyclic AMP-Dependent Kinase Regulates Raf-1 Kinase Mainly by Phosphorylation of Serine 259. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10):3237–3246, 2002.

A.S. Dhillon, A. von Kriegsheim, J. Grindlay, W. Kolch. Phosphatase and Feedback Regulation of Raf-1 Signaling. *Cell Cycle*, 6(1):3–7, January 2007.

- A.S. Dhillon, Y.Y. Yip, G.J. Grindlay, J.L. Pakay, M. Dangers, M. Hillmann, W. Clark, A. Pitt, H. Mischak, W. Kolch. The C-terminus of Raf-1 acts as a 14-3-3-dependent activation switch. *Cellular Signalling*, 21(11):1645–1651, November 2009.
- C. Dingwall R.A. Laskey. Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends in Biochemical Sciences*, 16:478–481, 1991.
- M.K. Dougherty D.K. Morrison. Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 10):1875–1884, April 2004.
- J. Downward. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3(1):11–22, January 2003.
- M. Dreyfuss, E. Härrä, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache, H. Tschertter. Cyclosporin A and C: New Metabolites from *Trichoderma polysporum*. *European Journal of Applied Microbiology*, 3:125–133, 1976.
- N. Dumaz R. Marais. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32):29819–29823, August 2003.
- N. Dumaz, Y. Light, R. Marais. Cyclic AMP Blocks Cell Growth through Raf-1-Dependent and Raf-1-Independent Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 22(11):3717–3728, 2002.
- N. Dumaz, R. Hayward, J. Martin, L. Ogilvie, D. Hedley, J.A. Curtin, B.C. Bastian, C. Springer, R. Marais. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling.. *Cancer Research*, 66(19):9483–9491, October 2006.
- H. Edelhoch. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6(7):1948–1954, July 1967.
- T.H. Eickbush E.N. Moudrianakis. The Compaction of DNA Helices into either Continuous Supercoils or Folded-Fiber Rods and Toroids. *Cell*, 13:295–306, 1978.
- P. Emsley K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 60(Pt 12 Pt 1):2126–2132, December 2004.
-

- D. Engelsma, R. Bernad, J. Calafat, M. Fornerod. Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358. *The EMBO Journal*, 23(18):3643–3652, September 2004.
- B. Falini, B. Bigerna, A. Pucciarini, E. Tiacci, C. Mecucci, S.W. Morris, N. Bolli, R. Rosati, S. Hanissian, Z. Ma, Y. Sun, E. Colombo, D.A. Arber, R. Pacini, R. La Starza, B. Verducci Galletti, B.V. Galletti, A. Liso, M.P. Martelli, D. Diverio, P.-G. Pelicci, F.L. Coco, M.F. Martelli. Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukaemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia*, 20(2):368–371, February 2006.
- D. Filchtinski, O. Sharabi, A. Ruppel, I.R. Vetter, C. Herrmann, J.M. Shifman. What makes Ras an efficient molecular switch: a computational, biophysical, and structural study of Ras-GDP interactions with mutants of Raf. *Journal of Molecular Biology*, 399(3):422–435, June 2010.
- A. Fischer, M. Hekman, J. Kuhlmann, I. Rubio, S. Wiese, U.R. Rapp. B- and C-RAF Display Essential Differences in Their Binding to Ras: The Isotype-Specific N Terminus of B-RAF Facilitates Ras Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(36):26503–26516, September 2007.
- M. Fornerod, M. Ohno, M. Yoshida, I.W. Mattaj. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich. *Cell*, 90:1051–1060, 1997.
- D.S. Friend, D. Papahadjopoulos, R.J. Debs. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1278:41–50, 1996.
- H. Fu, J. Coburn, R.J. Collier. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6):2320–2324, March 1993.
- H. Fu, R.R. Subramanian, S.C. Masters. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40:617–647, January 2000.
- M. Fukuda, S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, E. Nishida. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, 390(6657):308–311, November 1997.
-

- S. Ganguly, J.L. Weller, A. Ho, P. Chemineau, B. Malpaux, D.C. Klein. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4):1222–1227, January 2005.
- M.J. Garnett, S. Rana, H. Paterson, D. Barford, R. Marais. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Molecular Cell*, 20(6):963–969, December 2005.
- E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In John M Walker, editor, *The Proteomics Protocols Handbook*, pages 571–607. Humana Press, 2005. URL <http://web.expasy.org/protparam/>.
- D. Gelperin, J. Weigle, K. Nelson, P. Roseboom, K. Irie, K. Matsumoto, S. Lemmon. 14-3-3 proteins: Potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25):11539–11543, December 1995.
- D. Gelperin, L. Horton, A. DeChant, J. Hensold, S.K. Lemmon. Loss of Ypk1 Function Causes Rapamycin Sensitivity, Inhibition of Translation Initiation and Synthetic Lethality in 14-3-3-Deficient Yeast. *Genetics*, 161(4):1453–1464, August 2002.
- N. Gerits, S. Kostenko, U. Moens. In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Research*, 16(3):281–314, June 2007.
- N. Gerits, S. Kostenko, A. Shiryaev, M. Johannessen, U. Moens. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cellular Signalling*, 20(9):1592–1607, September 2008.
- S.C. Gill P.H. von Hippel. Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry*, 182:319–326, 1989.
- F. Glaser, T. Pupko, I. Paz, R.E. Bell, D. Bechor-Shental, E. Martz, N. Ben-Tal. ConSurf: Identification of Functional Regions in Proteins by Surface-Mapping of Phylogenetic Information. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(1):163–164, January 2003.
- Z.G. Goldsmith D.N. Dhanasekaran. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26(22):3122–3142, May 2007.
-

-
- D. Görlich U. Kutay. Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev. Biol.*, 15:607–660, 1999.
- D. Görlich, N. Panté, U. Kutay, U. Aebi, F.R. Bischoff. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *The EMBO Journal*, 15(20): 5584–5594, October 1996.
- M. Goujon, H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern, R. Lopez. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38: Suppl: W695–9, 2010.
- B.L. Grasberger, T. Lu, C. Schubert, D.J. Parks, T.E. Carver, H.K. Koblish, M.D. Cummings, L.V. LaFrance, K.L. Milkiewicz, R.R. Calvo, D. Maguire, J. Lattanze, C.F. Franks, S. Zhao, K. Ramachandren, G.R. Bylebyl, M. Zhang, C.L. Manthey, E.C. Petrella, M.W. Pantoliano, I.C. Deckman, J.C. Spurlino, A.C. Maroney, B.E. Tomczuk, C.J. Molloy, R.F. Bone. Discovery and Cocystal Structure of Benzodiazepinedione HDM2 Antagonists That Activate p53 in Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (4):909–912, February 2005.
- D. Gray S. Subramanian. Choice of Cellular Protein Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 5:Unit5.16, May 2001.
- Y.-M. Gu, Y.-H. Jin, J.-K. Choi, K.-H. Baek, C.-Y. Yeo, K.-Y. Lee. Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 zeta. *FEBS Letters*, 580(1): 305–310, January 2006.
- J.Y. Han, E.Y. Jeong, Y.S. Kim, G.S. Roh, H.J. Kim, S.S. Kang, G.J. Cho, W.S. Choi. C-jun N-terminal Kinase Regulates the Interaction Between 14-3-3 and Bad in Ethanol-Induced Cell Death. *Journal of Neuroscience Research*, 86(14):3221–3229, November 2008.
- S.H. Hanissian, U. Akbar, B. Teng, Z. Janjetovic, A. Hoffmann, J.K. Hitzler, N. Iscove, K. Hamre, X. Du, Y. Tong, S. Mukatira, J.H. Robertson, S.W. Morris. cDNA cloning and characterization of a novel gene encoding the MLF1-interacting protein MLF1IP. *Oncogene*, 23(20):3700–3707, April 2004.
- S.H. Hanissian, B. Teng, U. Akbar, Z. Janjetovic, Q. Zhou, C. Duntsch, J.H. Robertson. Regulation of myeloid leukemia factor-1 interacting protein (MLF1IP) expression in glioblastoma. *Brain Research*, 1047(1):56–64, June 2005.
-

- G. Hatzivassiliou, K. Song, I. Yen, B.J. Brandhuber, D.J. Anderson, R. Alvarado, M.J.C. Ludlam, D. Stokoe, S.L. Gloor, G. Vigers, T. Morales, I. Aliagas, B. Liu, S. Sideris, K.P. Hoeflich, B.S. Jaiswal, S. Seshagiri, H. Koeppen, M. Belvin, L.S. Friedman, S. Malek. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*, 464(7287):431–435, March 2010.
- M.M. He, A.S. Smith, J.D. Oslob, W.M. Flanagan, A.C. Braisted, A. Whitty, M.T. Cancilla, J. Wang, A.A. Lugovskoy, J.C. Yoburn, A.D. Fung, G. Farrington, J.K. Eldredge, E.S. Day, L.A. Cruz, T.G. Cachero, S.K. Miller, J.E. Friedman, I.C. Choong, B.C. Cunningham. Small-molecule Inhibition of TNF-alpha. *Science*, 310(5750):1022–1025, November 2005.
- S.J. Heidorn, C. Milagre, S. Whittaker, A. Nourry, I. Niculescu-Duvas, N. Dhomen, J. Hussain, J.S. Reis-Filho, C.J. Springer, C. Pritchard, R. Marais. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*, 140(2):209–221, January 2010.
- M. Hekman, H. Hamm, A.V. Villar, B. Bader, J. Kuhlmann, J. Nickel, U.R. Rapp. Associations of B- and C-Raf with Cholesterol, Phosphatidylserine, and Lipid Second Messengers: Preferential Binding of Raf to Artificial Lipid Rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(27):24090–24102, July 2002.
- M. Hekman, S. Wiese, R. Metz, S. Albert, J. Troppmair, J. Nickel, M. Sendtner, U.R. Rapp. Dynamic changes in C-Raf phosphorylation and 14-3-3 protein binding in response to growth factor stimulation: differential roles of 14-3-3 protein binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(14):14074–14086, April 2004.
- J.K. Hitzler, D.P. Witte, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, C.W. Naeve, A.T. Look, S.W. Morris. cDNA Cloning, Expression Pattern, and Chromosomal Localization of Mlf1, Murine Homologue of a Gene Involved in Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Pathology*, 155(1):53–59, 1999.
- A. Höss, I. Moarefi, K.H. Scheidtmann, L.J. Cisek, J.L. Corden, I. Dornreiter, A.K. Arthur, E. Fanning. Altered Phosphorylation pattern of Simian Virus 40 T Antigen Expressed in Insect Cells by Using a Baculovirus Vector. *Journal of Virology*, 64(10):4799–4807, October 1990.
-

-
- M. Hüser, J. Luckett, A. Chiloeches, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X.-M. Sun, J. Brown, R. Marais, C. Pritchard. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *The EMBO Journal*, 20(8):1940–1951, April 2001.
- M. Imajo, Y. Tsuchiya, E. Nishida. Regulatory Mechanisms and Functions of MAP Kinase Signaling Pathways. *IUBMB Life*, 58(5-6):312–317, 2006.
- H. Inoue, H. Nojimas, H. Okayama. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96:23–28, 1990.
- Invitrogen. *Fluorescence Polarization Technical Resource Guide*. Invitrogen Corporation, 4 edition, 2006. URL www.invitrogen.com/drugdiscovery.
- P. Janosch, M. Schellerer, T. Seitz, P. Reim, M. Eulitz, M. Brielmeier, W. Kölch, J.M. Sedivy, H. Mischak. Characterization of I κ B Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(23):13868–13874, 1996.
- F. Jeanmougin, J.D. Thompson, M. Gouy, D.G. Higgins, T.J. Gibson. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(10):403–405, October 1998.
- J. Jin, F.D. Smith, C. Stark, C.D. Wells, J.P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J.R. Woodgett, L.K. Langeberg, J.D. Scott, T. Pawson. Proteomic , Functional , and Domain-Based Analysis of In Vivo 14-3-3 Binding Proteins Involved in Cytoskeletal Regulation and Cellular Organization. *Current Biology*, 14:1436–1450, 2004.
- C. Johnson, S. Crowther, M.J. Stafford, D.G. Campbell, R. Toth, C. MacKintosh. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochemical Journal*, 427: 69–78, April 2010.
- G.L. Johnson R. Lapadat. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK , JNK , and p38 Protein Kinases. *Science*, 298(December):1911–1912, 2002.
- D.H. Jones, S. Ley, A. Aitken. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters*, 368(1):55–58, July 1995.
- S. Jones J.M. Thornton. Protein-Protein Interactions: A Review of Protein Dimer Structures. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 63:31–65, 1995.
-

- S. Jones J.M. Thornton. Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(January):13–20, 1996.
- Wolfgang Kabsch. XDS. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(Part 2):125–132, February 2010.
- S. Kawai M. Nishizawa. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Molecular and Cellular Biology*, 4(6):1172–1174, June 1984.
- T. Kino, H. Hatanaka, M. Hashimoto, M. Nishiyama, T. Goto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 40(9):1249–1255, 1987.
- E. Kjarland, T.J. Keen, R. Kleppe. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(3):217–223, June 2006.
- B. Kostelecky, A.T. Saurin, A. Purkiss, P.J. Parker, N.Q. McDonald. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO Reports*, 10(9): 983–989, September 2009.
- M. Kozak. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature*, 308(15):241–246, 1984.
- M. Kozak. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15(20):8125–8130, 1987.
- M. Kubicek, M. Pacher, D. Abraham, K. Podar, M. Eulitz, M. Baccarini. Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10):7913–7919, March 2002.
- M.U. Kuefer, A.T. Look, D.C. Williams, V. Valentine, C.W. Naeve, F.G. Behm, J.E. Mullersman, N. Yoneda-Kato, K. Montgomery, R. Kucherlapati, S.W. Morris. cDNA cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of myelodysplasia/myeloid leukemia factor 2 (MLF2). *Genomics*, 35(2):392–396, July 1996.
- K. Kuroda, M. Veit, H.D. Klenk. Retarded Processing of Influenza Virus Hemagglutinin in Insect Cells. *Virology*, 180(1):159–165, January 1991.
-

-
- Ulrike Kutay Stephan Güttinger. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in Cell Biology*, 15(3):121–124, March 2005.
- J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science and Business Media, LLC, 223 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 3 edition, 2006. ISBN 9780387312781.
- T.M. Lanigan, A. Liu, Y.Z. Huang, L. Mei, B. Margolis, K.-L. Guan. Human homologue of Drosophila CNK interacts with Ras effector proteins Raf and Rlf. *FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(14):2048–2060, November 2003.
- M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948, 2007. URL <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.
- S. Li J.M. Sedivy. Raf-1 protein kinase activates the NF- κ B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF- κ B-I κ B complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20):9247–9251, October 1993.
- W. Li, M. Han, K.-L. Guan. The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf. *Genes & Development*, 14(8):895–900, April 2000.
- Y. Light, H. Paterson, R. Marais. 14-3-3 Antagonizes Ras-Mediated Raf-1 Recruitment to the Plasma Membrane To Maintain Signaling Fidelity. *Molecular and Cellular Biology*, 22(14):4984–4996, 2002.
- R. Lim, L.N. Winteringham, J.H. Williams, R.K. McCulloch, E. Ingley, Jim Y-H Tiao, J.-P. Lalonde, S. Tsai, P.A. Tilbrook, Y. Sun, X. Wu, S.W. Morris, S.P. Klinken. MADM, a novel adaptor protein that mediates phosphorylation of the 14-3-3 binding site of myeloid leukemia factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(43):40997–41008, October 2002.
- R. Linding, L.J. Jensen, A. Pasculescu, M. Olhovsky, K. Colwill, P. Bork, M.B. Yaffe, T. Pawson. NetworKIN: a resource for exploring cellular phosphorylation networks. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue):D695–699, January 2008.
-

- D. Liu, J. Bienkowska, C. Petosa, R.J. Collier, H. Fu, R. Liddington. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, 376:191–194, 1995.
- L. Lo Conte, C. Chothia, J. Janin. The Atomic Structure of Protein-Protein Recognition Sites. *Journal of Molecular Biology*, 285(5):2177–2198, February 1999.
- LO-Laboroptik. Zählkammer Neubauer, 2012. URL <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.html>.
- H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudeira, D. Baltimore, J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. Freeman, W. H., New York, 4th edition, 2000. ISBN ISBN-10: 0-7167-3136-3.
- A. Loyter, G.A. Scangos, F.H. Ruddle. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(2):422–426, January 1982.
- Z. Luo, G. Tzivion, P.J. Belshaw, D. Vavvas, M. Marshall, J. Avruch. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature*, 383:181–185, 1996.
- Z.J. Luo, X.F. Zhang, U.R. Rapp, J. Avruch. Identification of the 14.3.3 zeta domains important for self-association and Raf binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(40):23681–23687, October 1995.
- G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600):1912–1934, December 2002.
- R. Marais C.J. Marshall. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surveys*, 27:101–125, January 1996.
- D.M.A. Martin, D. Miranda-Saavedra, G.J. Barton. Kinomer v. 1.0: a database of systematically classified eukaryotic protein kinases. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue):D244–250, January 2009.
- J.E. Maruniak. Productivity of insect cells for recombinant proteins. *Cytotechnology*, 20:145–148, 1996.
- S.C. Masters, K.J. Pederson, L. Zhang, J.T. Barbieri, H. Fu. Interaction of 14-3-3 with a Nonphosphorylated Protein Ligand , Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 38:5216–5221, 1999.
-

-
- D. Matallanas, M. Birtwistle, D. Romano, A. Zebisch, J. Rauch, A. von Kriegsheim, W. Kolch. Raf Family Kinases: Old Dogs Have Learned New Tricks. *Genes & Cancer*, 2(3):232–260, March 2011.
- N. Matsumoto, N. Yoneda-Kato, T. Iguchi, Y. Kishimoto, T. Kyo, H. Sawada, E. Tsumi, S. Fukuhara. Elevated MLF1 expression correlates with malignant progression from myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 14(10):1757–1765, October 2000.
- G. Maurer, B. Tarkowski, M. Baccharini. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene*, 30(32):3477–3488, August 2011.
- A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(Pt 4):658–674, August 2007.
- J. McGadey. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie. Histochemistry. Histochemie*, 23(2):180–184, January 1970.
- M. Mikula, M. Schreiber, Z. Husak, L. Kucerova, J. R uth, R. Wieser, K. Zatloukal, H. Beug, E.F. Wagner, M. Baccharini. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *The EMBO Journal*, 20(8):1952–1962, April 2001.
- S. Miller, J. Janin, A.M. Lesk, C. Chothia. Interior and Surface of Monomeric Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 196:641–656, 1987.
- J. Mintseris Z. Weng. Atomic contact vectors in protein-protein recognition. *Proteins*, 53(3):629–639, November 2003.
- G.J. Miroy, Z. Lai, H.A. Lashuel, S.A. Peterson, C. Strang, J.W. Kelly. Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26):15051–15056, December 1996.
- H. Mischak, T. Seitz, P. Janosch, M. Eulitz, H. Steen, M. Schellerer, A. Philipp, W. Kolch. Negative Regulation of Raf-1 by Pphosphorylation of Serine 621. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10):5409–5418, October 1996.
- T. Miyamoto, R. DeRose, A. Suarez, T. Ueno, M. Chen, T.-p. Sun, M.J. Wolfgang, C. Mukherjee, D.J. Meyers, T. Inoue. Rapid and orthogonal logic gating with a gibberellin-induced dimerization system. *Nature Chemical Biology*, March:1–6, March 2012.
-

- M. Molzan, B. Schumacher, C. Ottmann, A. Baljuls, L. Polzien, M. Weyand, P. Thiel, R. Rose, M. Rose, P. Kuhenne, M. Kaiser, U.R. Rapp, J. Kuhlmann. Impaired binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(19):4698–4711, October 2010.
- M. Molzan, M. Weyand, R. Rose, C. Ottmann. Structural insights of the MLF1/14-3-3 interaction. *The FEBS Journal*, 279(4):563–571, February 2012.
- B.W. Moore V.J. Perez. Specific acidic proteins of the nervous system. In F. D. Carlson, editor, *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, pages 343–359. Prentice Hall, New York, 1967.
- I.S. Moreira, P.A. Fernandes, M.J. Ramos. Hot spot A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins*, pages 803–812, 2007.
- H. Moriuchi, C. Okamoto, R. Nishihama, I. Yamashita, Y. Machida, N. Tanaka. Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene rolB. *The Plant Journal*, 38(2):260–275, April 2004.
- D.K. Morrison. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of Cell Science*, 114(9):1609–1612, May 2001.
- D.K. Morrison R.J. Davis. Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19:91–118, January 2003.
- D.K. Morrison, G. Heidecker, U.R. Rapp, T.D. Copeland. Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(23):17309–17316, August 1993.
- H.R. Mott, J.W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R.M. Bell, S.L. Campbell. The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16):8312–9317, August 1996.
- T. Mrowiec B. Schwappach. 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biological Chemistry*, 387(9):1227–1236, September 2006.
-

-
- K.B. Mullis F.A. Faloon. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335–350, 1987.
- G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 53(Pt 3):240–255, May 1997.
- A.J. Muslin, J.W. Tanner, P.M. Allen, A.S. Shaw. Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell*, 84(6):889–897, March 1996.
- N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, A. Wittinghofer. The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogues. *Nature*, 375:554–560, 1995.
- E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P.H. Hofschneider. Gene transfer into mouse lymphoma in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7):841–845, 1982.
- C. Noble, K. Mercer, J. Hussain, L. Carragher, S. Giblett, R. Hayward, C. Patterson, R. Marais, C.A. Pritchard. CRAF autophosphorylation of serine 621 is required to prevent its proteasome-mediated degradation. *Molecular Cell*, 31(6):862–872, September 2008.
- I.M.A. Nooren J.M. Thornton. Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal*, 22(14):3486–3492, 2003a.
- I.M.A. Nooren J.M. Thornton. Structural Characterisation and Functional Significance of Transient Protein-Protein Interactions. *Journal of Molecular Biology*, 325(5):991–1018, January 2003b.
- T. Obsil, R. Ghirlando, D.C. Klein, S. Ganguly, F. Dyda. Crystal Structure of the 14-3-3 ζ : Serotonin N-Acetyltransferase Complex : A Role for Scaffolding in Enzyme Regulation. *Cell*, 105:257–267, 2001.
- T. Obsil, R. Ghirlando, D.E. Anderson, A.B. Hickman, F. Dyda. Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding. *Biochemistry*, 42(51):15264–15272, December 2003.
-

- C. Oecking, C. Eckerskorn, E.W. Weiler. The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Letters*, 352(2): 163–166, 1994.
- M. Ogris E. Wagner. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discovery Today*, 7(8):479–85, April 2002.
- M.O. Olson, M.O. Wallace, A.H. Herrera, L. Marshall-Carlson, R.C. Hunt. Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry*, 25(2):484–491, January 1986.
- T. Oltersdorf, S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, R.C. Armstrong, D.J. Augeri, B.A. Belli, M. Bruncko, T.L. Deckwerth, J. Dinges, P.J. Hajduk, M.K. Joseph, S. Kitada, S.J. Korsmeyer, A.R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M.J. Mitten, D.G. Nettesheim, S. Ng, P.M. Nimmer, J.M. O'Connor, A. Oleksijew, A.M. Petros, J.C. Reed, W. Shen, S.K. Tahir, C.B. Thompson, K.J. Tomaselli, B. Wang, M.D. Wendt, H. Zhang, S.W. Fesik, S.H. Rosenberg. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435(7042):677–681, June 2005.
- E. O'Neill, L. Rushworth, M. Baccarini, W. Kolch. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science*, 306(5705):2267–2270, December 2004.
- S. Ory, M. Zhou, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, D.K. Morrison. Protein Phosphatase 2A Positively Regulates Ras Signaling by Dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on Critical 14-3-3 Binding Sites. *Current Biology*, 13:1356–1364, 2003.
- C. Ottmann, S. Marco, N. Jaspert, C. Marcon, N. Schauer, M. Weyand, C. Vandermeeren, G. Duby, M. Boutry, A. Wittinghofer, J.-L. Rigaud, C. Oecking. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Molecular Cell*, 25(3):427–440, February 2007a.
- C. Ottmann, L. Yasmin, M. Weyand, J.L. Veesenmeyer, M.H. Diaz, R.H. Palmer, M.S. Francis, A.R. Hauser, A. Wittinghofer, B. Hallberg. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *The EMBO Journal*, 26(3):902–913, February 2007b.
-

-
- C. Ottmann, M. Weyand, T. Sassa, T. Inoue, N. Kato, A. Wittinghofer, C. Oecking. A Structural Rationale for Selective Stabilization of Anti-tumor Interactions of 14-3-3 proteins by Cotylenin A. *Journal of Molecular Biology*, 386(4):913–919, March 2009.
- C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 4(11):2411–2423, November 1995.
- B. Pandit, A. Sarkozy, L.A. Pennacchio, C. Carta, K. Oishi, S. Martinelli, E.A. Pogna, W. Schackwitz, A. Ustaszewska, A. Landstrom, J.M. Bos, S.R. Ommen, G. Esposito, F. Lepri, C. Faul, P. Mundel, J. P. López Sigüero, R. Tenconi, A. Selicorni, C. Rossi, L. Mazzanti, I. Torrente, B. Marino, M.C. Digilio, G. Zampino, M.J. Ackerman, B. Dallapiccola, M. Tartaglia, B.D. Gelb. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics*, 39(8):1007–1012, August 2007.
- P. Pattniak. Surface Plasmon Resonance. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 126(1):79–92, 2005.
- J.R. Perkins, I. Diboun, B.H. Dessailly, J.G. Lees, C. Orengo. Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure*, 18(10):1233–1243, October 2010.
- C. Petosa, S.C. Masters, L.A. Bankston, J. Pohl, B. Wang, H. Fu, R.C. Liddington. 14-3-3zeta Binds a Phosphorylated Raf Peptide and an Unphosphorylated Peptide via Its Conserved Amphipathic Groove. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26):16305–16310, 1998.
- A. Peyroche, B. Antony, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, C.L. Jackson. Brefeldin A Acts to Stabilize an Abortive ARF-GDP-Sec7 Domain Protein Complex: Involvement of Specific Residues of the Sec7 Domain. *Molecular Cell*, 3(3):275–285, March 1999.
- P.I. Poulikakos, C. Zhang, G. Bollag, K.M. Shokat, N. Rosen. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*, 464(7287):427–430, March 2010.
- J. Pouyssegur, V. Volmat, P. Lenormand. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6):755–763, September 2002.
-

- M. Pozuelo Rubio, K.M. Geraghty, B.H.C. Wong, N.T. Wood, D.G. Campbell, N. Morrice, C. MacKintosh. 14-3-3-Affinity Purification of Over 200 Human Phosphoproteins Reveals New Links To Regulation of Cellular Metabolism, Proliferation and Trafficking. *The Biochemical Journal*, 379(Pt 2):395–408, April 2004.
- C.A. Pritchard, L. Bolin, R. Slattery, R. Murray, M. McMahon. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Current Biology*, 6(5):614–617, May 1996.
- Qiagen. *QIAGENes Insect / Mammalia Handbook*. Number July. QIAGEN, Hilden, 07/2009 edition, 2009.
- T. Raabe U.R. Rapp. KSR—a regulator and scaffold protein of the MAPK pathway. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2002(136):pe28, June 2002.
- T. Raabe U.R. Rapp. Ras signaling: PP2A puts Ksr and Raf in the right place. *Current Biology*, 13(16):R635–R637, August 2003.
- S. Rajagopalan, R.S. Sade, F.M. Townsley, A.R. Fersht. Mechanistic differences in the transcriptional activation of p53 by 14-3-3 isoforms. *Nucleic Acids Research*, 38(3): 893–906, January 2010.
- T. Rajakulendran, M. Sahmi, M. Lefrançois, F. Sicheri, M. Therrien. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*, 461(7263):542–545, September 2009.
- G.N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1):95–99, July 1963.
- M. Raman, W. Chen, M.H. Cobb. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22):3100–3112, May 2007.
- U.R. Rapp, M.D. Goldsborough, G.E. Mark, T.I. Bonner, J. Groffen, F.H. Reynolds, J.R. Stephenson. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(14):4218–4222, July 1983.
- W.S. Rasband. ImageJ, 2004.
-

-
- S.S. Ray, R.J. Nowak, R.H. Brown, P.T. Lansbury. Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10):3639–3644, March 2005.
- M.A. Razzaque, T. Nishizawa, Y. Komoike, H. Yagi, M. Furutani, R. Amo, M. Kamisago, K. Momma, H. Katayama, M. Nakagawa, Y. Fujiwara, M. Matsushima, K. Mizuno, M. Tokuyama, H. Hirota, J. Muneuchi, T. Higashinakagawa, R. Matsuoka. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 39(8): 1013–1017, August 2007.
- G. Rhodes. *Crystallography Made Crystal Clear : Model Second Edition*. Academic Press, San Diego, California, 2nd edition, 2000. ISBN 0125870728.
- K. Rittinger, J. Budman, J. Xu, S. Volinia, L.C. Cantley, S.J. Smerdon, S.J. Gamblin, M.B. Yaffe. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Molecular Cell*, 4(2): 153–166, August 1999.
- A.E. Roberts, T. Araki, K.D. Swanson, K.T. Montgomery, T.A. Schiripo, V.A. Joshi, L. Li, Y. Yassin, A.M. Tamburino, B.G. Neel, R.S. Kucherlapati. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 39(1):70–74, January 2007.
- R.L. Roberts, H.-U. Mösch, G.R. Fink. 14-3-3 Proteins Are Essential for RAS/MAPK Cascade Signaling during Pseudohyphal Development in *S. cerevisiae*. *Cell*, 89(7): 1055–1065, June 1997.
- O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P.J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P.I.H. Bastiaens. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, 307(5716):1746–1752, March 2005.
- L. Röglin. *PNA-Peptid-PNA Chimären*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2008.
- R. Rose, S. Erdmann, S. Bovens, A. Wolf, M. Rose, S. Hennig, H. Waldmann, C. Ottmann. Identification and Structure of Small-Molecule Stabilizers of 14-3-3 Protein-Protein Interactions. *Angewandte Chemie*, 49(24):4129–4132, June 2010.
-

- M. Rosenquist, M. Alsterfjord, C. Larsson, M. Sommarin. Data Mining the Arabidopsis Genome Reveals Fifteen 14-3-3 Genes. Expression Is Demonstrated for Two out of Five Novel Genes. *Plant Physiology*, 127(1):142–149, September 2001.
- P.P. Roux J. Blenis. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2):320–344, 2004.
- L.K. Rushworth, A.D. Hindley, E.O. Neill, W. Kolch. Regulation and Role of Raf-1 / B-Raf Heterodimerization. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6):2262–2272, 2006.
- M. Salvi, S. Sarno, L. Cesaro, H. Nakamura, L.A. Pinna. Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(5):847–859, May 2009.
- F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*, 74(12):5463–5467, January 1977.
- W. Schaffner. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4): 2163–2167, April 1980.
- H. Schägger G. von Jagow. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166:368–379, 1987.
- S. Schubbert, M. Zenker, S.L. Rowe, S. Böll, C. Klein, G. Bollag, I. van der Burgt, L. Musante, V. Kalscheuer, L.-E. Wehner, H. Nguyen, B. West, K.Y.J. Zhang, E. Sistermans, A. Rauch, C.M. Niemeyer, K. Shannon, C.P. Kratz. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 38(3):331–336, March 2006.
- K.B. Seamon, W. Padgett, J.W. Daly. Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6):3363–3367, 1981.
- L.B. Sheard, X. Tan, H. Mao, J. Withers, G. Ben-Nissan, T.R. Hinds, Y. Kobayashi, F.-F. Hsu, M. Sharon, J. Browse, S.Y. He, J. Rizo, G.A. Howe, N. Zheng. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468 (7322):400–405, November 2010.
-

-
- S. Shikano, B. Coblitz, M. Wu, M. Li. 14-3-3 Proteins: Regulation of Endoplasmic Reticulum Localization and Surface Expression of Membrane Proteins. *Trends in Cell Biology*, 16(7):370–375, July 2006.
- K. Shimizu, S. Kuroda, B. Yamamori, S. Matsuda, K. Kaibuchi, T. Yamauchi, T. Isobe, K. Matsumoto, Y. Takai. Synergistic Activation by Ras and 14-3-3 Protein of a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Named Ras-dependent Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase Stimulator. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(37):22917–22920, 1994.
- D. Shotton N. White. Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging. *Trends in Biochemical Sciences*, 14:435–439, 1989.
- N.D. Sonawane, F.C. Szoka, A.S. Verkman. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *The Journal of biological chemistry*, 278(45):44826–44831, November 2003.
- K. Stade, C.S. Ford, C. Guthrie, K. Weis. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, 90(6):1041–1050, September 1997.
- M. Stewart. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(3):195–208, March 2007.
- D. Stokoe, S.G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons, J.F. Hancock. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264(5164):1463–1467, June 1994.
- S.M. Storm, J.L. Cleveland, U.R. Rapp. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*, 5(3):345–351, March 1990.
- A. Sumioka, S. Nagaishi, T. Yoshida, A. Lin, M. Miura, T. Suzuki. Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent Gene Transactivation Mediated by the Amyloid beta-Protein Precursor Cytoplasmic Fragment. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(51):42364–42374, December 2005.
- S. Sun, E.W.P. Wong, M.W.M. Li, W.M. Lee, C.Y. Cheng. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein-protein interactions during spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*, 202(3):327–336, 2009.
-

- W. Sun, K. Zhang, X. Zhang, W. Lei, T. Xiao, J. Ma, S. Guo, S. Shao, H. Zhang, Y. Liu, J. Yuan, Z. Hu, Y. Ma, X. Feng, S. Hu, J. Zhou, S. Cheng, Y. Gao. Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Cancer Letters*, 212(1):83–93, August 2004.
- X. Tan, L.I.A. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C.V. Robinson, M. Estelle, N. Zheng. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7136):640–645, April 2007.
- M. Tartaglia, E.L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H.G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A.H. Crosby, A. Ion, S. Jeffery, K. Kalidas, M.A. Patton, R.S. Kucherlapati, B.D. Gelb. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 29(4):465–468, December 2001.
- M. Tartaglia, L.A. Pennacchio, C. Zhao, K.K. Yadav, V. Fodale, A. Sarkozy, B. Pandit, K. Oishi, S. Martinelli, W. Schackwitz, A. Ustaszewska, J. Martin, J. Bristow, C. Carta, F. Lepri, C. Neri, I. Vasta, K. Gibson, C.J. Curry, J.P.L. Sigüero, M.C. Digilio, G. Zampino, B. Dallapiccola, D. Bar-Sagi, B.D. Gelb. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 39(1):75–79, January 2007.
- C.D. Thanos, M. Randal, J.A. Wells. Potent Small-Molecule Binding to a Dynamic Hot Spot on IL-2. *Journal of the American Chemical Society*, 125(50):15280–15281, December 2003.
- P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann. Small-Molecule Stabilization of Protein-Protein Interactions: An Underestimated Concept in Drug Discovery? *Angewandte Chemie International Edition*, 51(9):2012–2018, February 2012.
- M. Thomas A.M. Klibanov. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1):27–34, July 2003.
- K.S. Thorn A.A. Bogan. ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics*, 17(3):284–285, 2001.
- J.A. Thorson, L.W.K. Yu, A.L. Hsu, N.-Y. Shih, P.R. Graves, J.W. Tanner, P.M. Allen, H. Piwnica-Worms, A.S. Shaw. 14-3-3 Proteins Are Required for Maintenance of
-

-
- Raf-1 Phosphorylation and Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9): 5229–5238, 1998.
- H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry*, 76(9):4350–4354, January 1979.
- D.H.H Tsao, A.G. Sutherland, L.D. Jennings, Y. Li, T.S. Rush, J.C. Alvarez, W. Ding, E.G. Dushin, R.G. Dushin, S.A. Haney, C.H. Kenny, A.K. Malakian, R. Nilakantan, L. Mosyak. Discovery of novel inhibitors of the ZipA/FtsZ complex by NMR fragment screening coupled with structure-based design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(23):7953–7961, December 2006.
- G. Tzivion, Z. Luo, J. Avruch. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, 394:88–92, 1998.
- M.J. van Hemert, H.Y. Steensma, G.P.H. van Heusden. 14-3-3 Proteins: Key Regulators of Cell Division, Signalling and Apoptosis. *BioEssays*, 23(10):936–946, October 2001.
- G. P. H. van Heusden, D. J. F. Griffiths, J. C. Ford, T. F. C. Chin-A-Woeng, P. A. T. Schrader, A. M. Carr, H. Y. Steensma. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 229(1):45–53, April 1995.
- L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E.A. Liu. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*, 303(5659):844–848, February 2004.
- A. Velázquez-Campoy, H. Ohtaka, A. Nezami, S. Muzammil, E. Freire. Isothermal Titration Calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology*, pages 17.8.1–17.8.24, 2004.
- C. Vézina, A. Kudelski, S.N. Sehgal. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 28(10):721–726, 1975.
- P.T.C. Wan, M.J. Garnett, S.M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V.M. Good, C.M. Jones, C.J. Marshall, C.J. Springer, D. Barford, R. Marais. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6): 855–867, March 2004.
-

- B. Wang, H. Yang, Y.-C. Liu, T. Jelinek, L. Zhang, E. Ruoslahti, H. Fu. Isolation of High-Affinity Peptide Antagonists of 14-3-3 Proteins by Phage Display. *Biochemistry*, 38(38):12499–12504, September 1999.
- H.G. Wang, U.R. Rapp, J.C. Reed. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, 87(4):629–638, November 1996.
- M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. McPhail. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9):2325–2327, 1971.
- P.J. Watson, L. Fairall, G.M. Santos, J.W.R. Schwabe. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. *Nature*, 481(7381):335–340, January 2012.
- C.K. Weber, J.R. Slupsky, C. Herrmann, M. Schuler, U.R. Rapp, C. Block. Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene*, 19(2):169–176, January 2000.
- C.K. Weber, J.R. Slupsky, H.A. Kalmes, U.R. Rapp. Active Ras Induces Heterodimerization of cRaf and B-Raf Active Ras Induces Heterodimerization of cRaf and B-Raf 1. *Cancer Research*, 61:3595–3598, 2001.
- C. Wellbrock, M. Karasarides, R. Marais. The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(11):875–885, November 2004.
- J.A. Wells C.L. McClendon. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 450(7172):1001–1009, December 2007.
- C.R. Weston R.J. Davis. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2):142–149, April 2007.
- P.W. White, S. Titolo, K. Brault, L. Thauvette, A. Pelletier, E. Welchner, L. Bourgon, L. Doyon, W.W. Ogilvie, C. Yoakim, M.G. Cordingley, J. Archambault. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(29):26765–26772, July 2003.
- E.W. Wilker, R.A. Grant, S.C. Artim, M.B. Yaffe. A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19):18891–18898, May 2005.
-

-
- J.H. Williams, L.N. Daly, E. Ingley, J.G. Beaumont, P.A. Tilbrook, J.P. Lalonde, J.P. Stillitano, S.P. Klinken. HLS7, a hemopoietic lineage switch gene homologous to the leukemia-inducing gene MLF1. *The EMBO Journal*, 18(20):5559–5566, October 1999.
- L.N. Winteringham, S. Kobelke, J.H. Williams, E. Ingley, S.P. Klinken. Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene*, 23(29):5105–5109, June 2004.
- L.N. Winteringham, R. Endersby, S. Kobelke, R.K. McCulloch, J.H. Williams, Ju. Stillitano, S.M. Cornwall, E. Ingley, S.P. Klinken. Myeloid leukemia factor 1 associates with a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50):38791–38800, December 2006.
- T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brandts, L.-N. Lin. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179:131–137, 1989.
- L. Wojnowski, A.M. Zimmer, T.W. Beck, H. Hahn, R. Bernal, U.R. Rapp, A. Zimmer. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature Genetics*, 16:293–297, 1997.
- L. Wojnowski, L.F. Stancato, A. Zimmer, H. Hahn, T.W. Beck, A.C. Larner, U.R. Rapp, A. Zimmer. Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mechanisms of Development*, 76:141–149, August 1998.
- J.M. Woodcock, J. Murphy, F.C. Stomski, M.C. Berndt, A.F. Lopez. The Dimeric Versus Monomeric Status of 14-3-3zeta Is Controlled by Phosphorylation of Ser58 at the Dimer Interface. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38):36323–36327, September 2003.
- M. Würtele, C. Jelich-Ottmann, A. Wittinghofer, C. Oecking. Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *The EMBO Journal*, 22(5):987–994, March 2003.
- B. Xiao, S.J. Smerdon, D.H. Jones, G.G. Dodson, Y. Soneji, A. Aitken, S.J. Gamblin. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signaling pathways. *Nature*, 376:188–191, 1995.
- M.B. Yaffe. How do 14-3-3 proteins work?– Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*, 513(1):53–57, February 2002.
-

- M.B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P.R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, L.C. Cantley. The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell*, 91:961–971, 1997.
- X. Yang, W.H. Lee, F. Sobott, E. Papagrigoriou, C.V. Robinson, J.G. Grossmann, M. Sundström, D.A. Doyle, J.M. Elkins. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46):17237–17242, November 2006.
- N. Yoneda-Kato J.-Y. Kato. Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1):422–434, January 2008.
- N. Yoneda-Kato, A.T. Look, M.N. Kirstein, M.B. Valentine, S.C. Raimondi, K.J. Cohen, A.J. Carroll, S.W. Morris. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*, 12(2): 265–275, January 1996.
- N. Yoneda-Kato, K. Tomoda, M. Umehara, Y. Arata, J.Y. Kato. Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *The EMBO Journal*, 24(9):1739–1749, May 2005.
- Y. Zhang C. Dong. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21):2771–2789, November 2007.
- S. Zimmermann K. Moelling. Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science*, 286(5445):1741–1744, November 1999.
- I.S. Zuhorn, R. Kalicharan, D. Hoekstra. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20):18021–18028, May 2002.
-

A. Anhang

A.1. Abkürzungsverzeichnis

Å	10 ⁻¹⁰ m
<i>A.rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>
AANAT	Serotonin-N-Acetyltransferase
AICD	APP intrazelluläre Domäne
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
cAMP	englisch: <i>cyclic AMP</i> , zyklisches AMP
AP	alkalische Phosphatase
APP	englisch: <i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar
kbp	Kilobasenpaar
<i>B.taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C.aethiops</i>	<i>Cercopithecus aethiops</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
°C	Temperatur in Grad Celsius
CaMK	Ca ²⁺ /-calmodulinabhängige Proteinkinase
CMV	Zytomegalie-Virus
CNA	Cotylenin A
CP	Cytoplasma
C-Terminus	Carboxyterminus
dCTP	Desoxycytosintriphosphat

CR	englisch: <i>conserved region</i> , konservierte Region
CRD	cysteinreiche Domäne
CRM1	englisch: <i>Chromosome region maintenance 1</i>
CSN3	englisch: <i>subunit 3 of the COP9 signalosome</i> , Untereinheit 3 des COP9-Signalosoms
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethylcellulose
DMEM	englisch: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPF	Dortmund Protein Facility
DpnI	<i>Diplococcus pneumoniae G41 I</i>
DTE	1,4-Dithioerythritol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	englisch: <i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	englisch: <i>enhanced GFP</i> , modifiziertes GFP
EGFR	EGF-Rezeptor
Elk-1	englisch: <i>ETS-like transcription factor 1</i>
ERK	englisch: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	lateinisch: <i>et alii</i> , und andere

ETS	englisch: <i>E-twenty six</i>
ExoS	Exoenzyme S
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBDD	englisch: <i>fragment based drug design</i> , Fragment-basierte Wirkstoffsuche
FCA	Fusicoccin A
FCS	englisch: <i>fetal calf serum</i> , fötale Kälberserum
ff	englisch: <i>fast flow</i>
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPLC	englisch: <i>fast performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAP	G-Protein aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GED	GTPase Effektor Domäne
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRB2	englisch: <i>growth-factor-receptor bound-2</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
<i>H.sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HBS	englisch: <i>HEPES buffered Saline</i> , HEPES-Puffer
HBS-T	HEPES-Puffer mit Tween20
HBSS	englisch: <i>Hank's Buffered Salt Solution</i> , ein Puffer
HEK-Zellen	englisch: <i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nierenzellen

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLS7	englisch: <i>hemopoietic lineage switch gene 7</i>
HPLC	englisch: <i>high pressure liquid chromatography</i> Hochdruckflüssigchromatographie
HTS	englisch: <i>high-throughput screening</i> , Hochdurchsatz-basierte Wirkstoffsuche
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	englisch: <i>isothermal titration calorimetry</i> , Isothermale Titrationskalorimetrie
dITP	Desoxyinositoltriphosphat
I.S.I.R	Institute of Scientific and Industrial Research
K _D	Dissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani
MAD	englisch: <i>median absolut deviation</i> , Abweichung des Medians
MADM	MLF1-Adaptermolekül
Manp	MLF1-assoziiertes nukleares Protein
MAPK	englisch: <i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
mcs	englisch: <i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
2-ME	beta-Mercaptoethanol
MEK	MAPK/ERK Kinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute

MLF1	myeloider Leukämiefaktor 1
MLF1IP	MLF1-interagierendes Protein
MPI	Max-Planck-Institut
<i>M.musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MWCO	englisch: <i>molecular weight cut-off</i> , Größenausschluss
<i>N.plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>N.tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
N	Nucleolus
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NES	englisch: <i>nuclear export sequence</i> , Kernexportsequenz
NLS	englisch: <i>nuclear localization sequence</i> , Kernimportsequenz
NPM	Nucleophosmin
N-Terminus	Aminoterminus
NTA	Nitrotriessigsäure
OD	optische Dichte
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
<i>P.abelii</i>	<i>Pongo abelii</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P.amygdali</i>	<i>Phomopsis amygdali</i> , früher <i>Fusicoccum amygdali</i>
P	Polarisation
mP	milliP
PBS	englisch: <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	englisch: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	englisch: <i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>

Pipes	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
PMA2	Plasmamembran-H ⁺ -ATPase 2
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PPI	englisch: <i>protein-protein interaction</i> , Protein-Protein-Wechselwirkung
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
RAF	englisch: <i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ran	englisch: <i>RAS-related nuclear protein</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i> , eine kleine GTPase
Raumtemperatur	RT
RBD	RAS-bindende Domäne
RBS	ribosomale Bindestelle
RNS	Ribonukleinsäure
mRNS	englisch: <i>messenger RNS</i> , Boten-RNS
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RU	englisch: <i>response unit</i> , Resonanzeinheit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP	englisch: <i>Shrimp alkaline phosphatase</i> , alkalische Phosphatase der Krabbe
SDS	englisch: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	englisch: <i>Src-homology 2</i>
SH3	englisch: <i>Src-homology 3</i>
SOB	englisch: <i>Super Optimal Broth</i> , ein Medium
SOC	englisch: <i>Super Optimal Broth with Catabolic repressor</i> , ein Medium
SOS	englisch: <i>Son-of-sevenless</i>

SPR	englisch: <i>surface plasmon resonance</i> , Oberflächenplasmonenresonanz
SV	Säulenvolumen
SV40	<i>Simian-Virus 40</i> , „Affenvirus 40“
T4	aus dem Bakteriophagen T4
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	englisch: <i>Terrific Broth</i> , ein Medium
TBS	englisch: <i>Tris buffered saline</i> , Tris-Puffer
TBS-T	Tris-Puffer mit Tween20
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
TEV	englisch: <i>Tobacco Etch Virus</i> , Tabakäzavirus
TFA	englisch: <i>Trifluoro acetic acid</i> , Trifluoressigsäure
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
U	Einheit für Enzymaktivität
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VS	englisch: <i>virtual screening</i> , virtuelle Wirkstoffsuche
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
<i>X.laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
ZK	Zellkern

Die 21 natürlich vorkommenden Aminosäuren werden entweder durch den Einbuchstaben- oder durch den Dreibuchstabencode abgekürzt.

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val
beliebig	X	-

Die Nukleobasen wurden mit dem geläufigen Einbuchstabencode abgekürzt.

Nukleotid	Abkürzung
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden durch die entsprechenden Summenformeln abgekürzt.

Chemikalie	Summenformel
Calciumchlorid	CaCl_2
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4
Kaliumchlorid	KCl
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4
Kaliumhydroxid	KOH
Magnesiumchlorid	MgCl_2
Magnesiumsulfat	MgSO_4
Natriumchlorid	NaCl
Natriumhydroxid	NaOH
Salzsäure	HCl

A.2. Zusätzliches Material

A.2.1. Chemikalienliste

Acrylamid-4-Lösung, (30%) Mix 37,5:1	Applichem (Darmstadt)
Agarose	Life Technologies (Darmstadt)
APS	Serva (Heidelberg)
BCIP/NBT	Calbiochem (Darmstadt)
2-ME	Serva (Heidelberg)
BioRAD, Protein Assay	Bio-Rad, (München)
Bromphenolblau Na-Salz	Applichem (Darmstadt)
BSA	Calbiochem (Darmstadt)
BSA, diagnostic grade	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brillant Blau R250, G250	Serva (Heidelberg)
Cotylenin A	Nobuo Kato (I.S.I.R., Osaka University, Japan)
DTE	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
DMEM	PAA (Pasching, Österreich)
DMEM ohne Phenolrot	PAN (Aidenbach)
DMSO	Serva (Heidelberg)

dNTP-MIX, 10 mM	Novagen (Darmstadt)
EDTA	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
Ethanol	Baker (Deventer, Niederlande)
Essigsäure 100	Baker (Deventer, Niederlande)
FCS	Life Technologies (Darmstadt)
FluorSave™ Reagent	Calbiochem (Darmstadt)
Fusicoccin A	Enzo Life Sciences (Lörrach)
Glycerin, 99.5 %	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
HCl	Applichem (Darmstadt)
Harnstoff	Baker (Deventer, Niederlande)
HBSS	Life Technologies (Darmstadt)
Immersionsöl, Immersol® 518 F	Zeiss (Jena)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
IPTG	Applichem (Darmstadt)
L-Glutathion	Merck (Darmstadt)
MES	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
MgCl ₂	Baker (Deventer, Niederlande)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
NaOH	Baker (Deventer, Niederlande)
NeXtal DWBlock JCSG Core Suite I-IV	Qiagen (Hilden)
Penicillin 10.000 U/Streptomycin 10 mg × ml ⁻¹ /L-Glutamin 200 mM	Sigma (Deisenhofen)
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma (Deisenhofen)
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma (Deisenhofen)
PMSF	Serva (Heidelberg)
Poly-L-Lysin, 0,1 % (w/v) in H ₂ O	Sigma (Deisenhofen)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
RPMI 1640	Life Technologies (Darmstadt)
	Sigma (Deisenhofen)
SDS	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
Silikonpaste, Baysilone-Paste, mittelviskos	GE Bayer Silicones (Leverkusen)

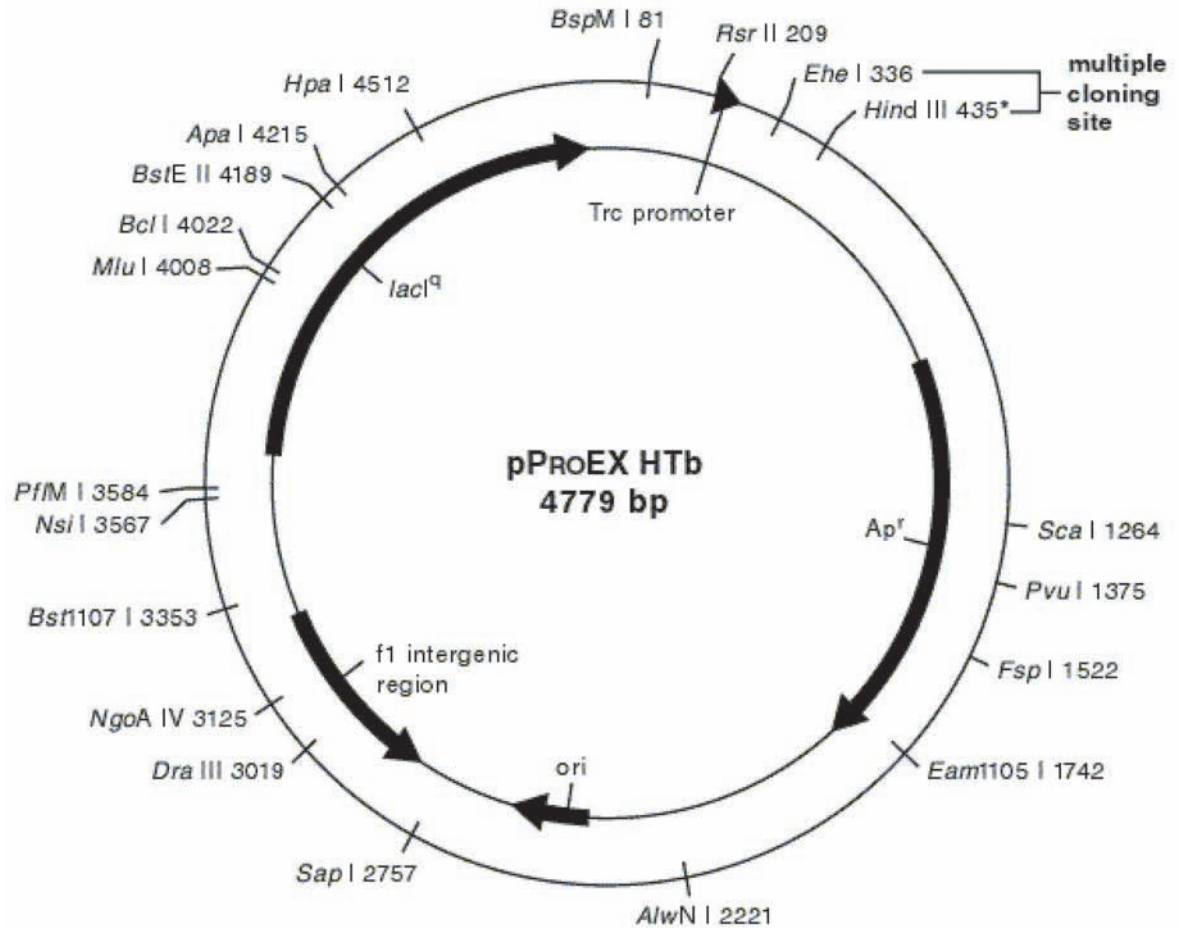
SYBR [®] Safe DNA Gel Stain	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tricin	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Merck (Darmstadt)
Triton [®] X-100	Acros Organics (Geel, Belgien)
Trypsin-EDTA, 0,05%	Life Technologies (Darmstadt)
Tween20	Acros Organics (Geel, Belgien)

A.2.2. Vektorkarten

Für die heterologe Expression der humanen 14-3-3-Proteine in *E. coli* wurde der Vektor pProEXHTb eingesetzt (siehe Abbildung A.1). Wichtig für die Klonierung verschiedener Gene sind hierbei insbesondere der Replikationsursprung (*ori*), der es *E. coli* ermöglicht das Plasmid zu vervielfältigen, die Ampicillin-Resistenz (Ap^r), die eine Selektion über Antibiotika ermöglicht, sowie die multiple Klonierungsstelle (*mcs*), über die Gene mittels Restriktion und Ligation in das Plasmid eingebracht werden können. Für die heterologe Expression eines über die *mcs* klonierten Gens sind der Lac-Repressor (*lacI^q*) und der *Trc*-Promotor von Bedeutung. Dabei handelt es sich um ein induzierbares System. In Abwesenheit von Lactose ist der Lac-Repressor an den *Trc*-Promotor gebunden und es findet keine Transkription und damit auch keine Proteinbiosynthese des klonierten Gens statt. Wird ein Lactose-Analog wie IPTG zum Medium gegeben, bindet dieses an den Lac-Repressor, der Promotor wird zugänglich für RNS-Polymerasen und Transkription kann stattfinden. Da IPTG von *E. coli* nicht umgesetzt werden kann, bleibt die Konzentration im Medium über den Versuchszeitraum konstant. Der *Trc*-Promotor ist eine Weiterentwicklung des synthetischen *Tac*-Promotors, der aus den *lac*- und *trp*-Operons erzeugt wurde (Brosius *et al.*, 1985). Des weiteren sind für die Expression und spätere Proteinaufreinigung des klonierten Gens die ribosomale Bindestelle (RBS), der His-*Tag* (siehe 2.5.3) und die TEV-Protease-Erkennungssequenz (siehe 2.5.6) wichtig. Diese sind dem klonierten Gen vorgelagert.

Für die heterologe Expression humaner Proteine in Säugerzellen wurden hauptsächlich die Vektoren pEGFP-C1 (siehe Abbildung A.2 im Anhang) und pmCherry-C1 eingesetzt. Der pEGFP-C1 unterscheidet sich vom pmCherry-C1 Vektor dadurch, dass unterschiedliche fluoreszente Proteine codiert sind; bei pEGFP-C1 ist dies *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), das bei 488 nm ein Absorptionsmaximum und bei 507 nm ein Emissionsmaximum aufweist, und bei pmCherry-C1 ist es mCherry, dessen Maxima

A



B

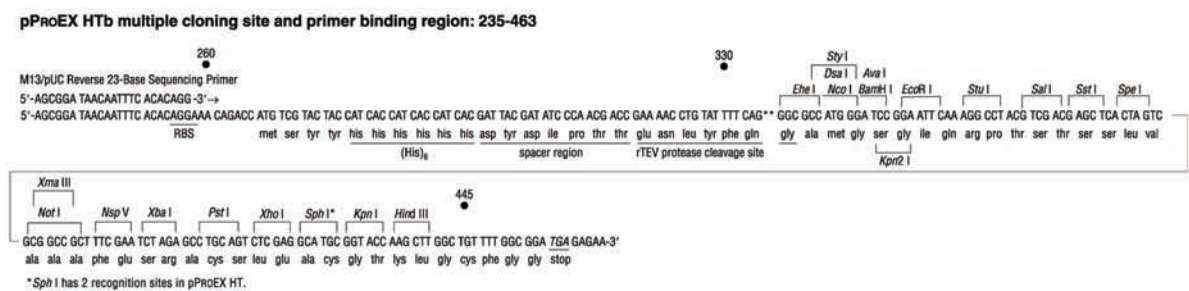


Abbildung A.1: Der pProEXHTb-Vektor von Invitrogen. (A) Die Vektorkarte zeigt die wichtigsten Eigenschaften und die Größe des Plasmids. (B)Die *mcs* ist im Detail dargestellt.

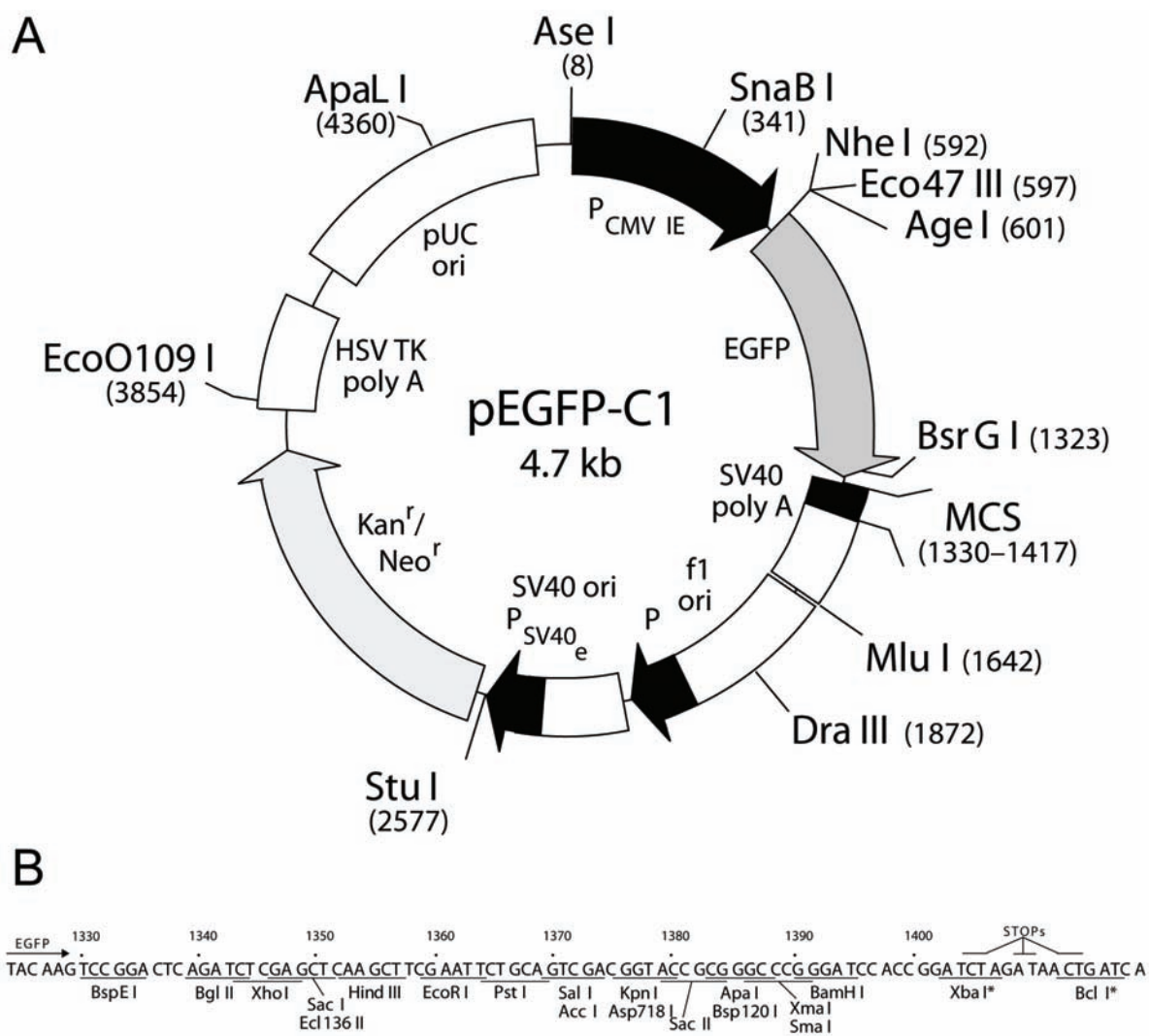


Abbildung A.2: Der pEGFP-C1-Vektor von Clontech. (A) Die Vektorkarte zeigt die wichtigsten Eigenschaften und die Größe des Plasmids. (B) Die *mcs* ist in im Detail dargestellt.

für Absorption und Emission jeweils bei 587 nm und 610 nm liegen. Ebenso wie bei dem pProEXHTb-Vektor beinhaltet der pEGFP-C1-Vektor alle für die Klonierung in *E.coli* benötigten Eigenschaften; einen Replikationsursprung (*pUC ori*), eine Kanamycinresistenz (*Kan^r*) sowie eine *mcs*. Außerdem werden für die Genexpression in Säugerzellen ein Replikationsursprung (*SV40 ori*), ein Promotor (*P_CMV*), sowie ein Polyadenylierungssignal (*SV40 poly A*) benötigt, die die Replikation des Plasmids, die Transkription des Gens sowie die korrekte Prozessierung der RNS gewährleisten sollen. Durch die Klonierung über die *mcs* wird ein Gen C-terminal an das Gen für das fluoreszente Protein (EGFP oder mCherry) fusioniert. Zusätzlich ist vor dem Startcodon eine Kozak-Sequenz vorhanden (nicht abgebildet). Diese ist für den Start der Translation notwendig (Kozak, 1987, 1984).

A.2.3. Verwendete Konstrukte

Bezeichnung	Gen (Länge in AS)	Mutation	Plasmid
GFP-MLF1(VL)WT	MLF1 (1-268)	WT	pEGFP-C1
MLF1(VL)WT-GFP	MLF1 (1-268)	WT	pEGFP-N1
GFP-MLF1(VL)S34A	MLF1 (1-268)	S34A	pEGFP-C1
MLF1(VL)S34A-GFP	MLF1 (1-268)	S34A	pEGFP-N1
GFP-MLF1(VL)L89E	MLF1 (1-268)	L89E	pEGFP-C1
GFP-MLF1(VL)L89A	MLF1 (1-268)	L89A	pEGFP-C1
GFP-MLF1(VL)L89V	MLF1 (1-268)	L89V	pEGFP-C1
GFP-MLF1(VL)S34A,L89V	MLF1 (1-268)	S34A,L89V	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₃₈ ΔC-WT	MLF1 (1-38)	WT	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₄₇ ΔC-WT	MLF1 (1-47)	WT	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₁₇₆ ΔC-WT	MLF1 (1-176)	WT	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₃₈ ΔC-S34A	MLF1 (1-38)	S34A	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₄₇ ΔC-S34A	MLF1 (1-47)	S34A	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₁₇₆ ΔC-S34A	MLF1 (1-176)	S34A	pEGFP-C1
MLF1 ₃₈ ΔC-WT-GFP	MLF1 (1-38)	WT	pEGFP-N1
MLF1 ₄₇ ΔC-WT-GFP	MLF1 (1-47)	WT	pEGFP-N1
MLF1 ₁₇₆ ΔC-WT-GFP	MLF1 (1-176)	WT	pEGFP-N1
MLF1 ₃₈ ΔC-S34A-GFP	MLF1 (1-38)	S34A	pEGFP-N1
MLF1 ₄₇ ΔC-S34A-GFP	MLF1 (1-47)	S34A	pEGFP-N1
MLF1 ₁₇₆ ΔC-S34A-GFP	MLF1 (1-176)	S34A	pEGFP-N1
GFP-MLF1 ₃₇ ΔN-WT	MLF1 (37-268)	WT	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₄₀ ΔN-WT	MLF1 (40-268)	WT	pEGFP-C1
GFP-MLF1 ₅₀ ΔN-WT	MLF1 (50-268)	WT	pEGFP-C1
GFP-C-RAF ₃₃₀ ΔC-WT	C-RAF (1-330)	WT	pEGFP-C1
GFP-C-RAF ₃₃₀ ΔC-S233A	C-RAF (1-330)	S233A	pEGFP-C1

GFP-C-RAF ₃₃₀ ΔC-S259A	C-RAF (1-330)	S259A	pEGFP-C1
GFP-C-RAF ₃₃₀ ΔC-S259F	C-RAF (1-330)	S259F	pEGFP-C1
GFP-C-RAF ₃₃₀ ΔC-T260R	C-RAF (1-330)	T260R	pEGFP-C1
GFP-C-RAF ₃₃₀ ΔC-V263A	C-RAF (1-330)	V263A	pEGFP-C1
GFP-C-RAF(VL)WT	C-RAF (1-648)	WT	pEGFP-C1
GFP-C-RAF(VL)S233A	C-RAF (1-648)	S233A	pEGFP-C1
GFP-C-RAF(VL)S259A	C-RAF (1-648)	S259A	pEGFP-C1
GFP-C-RAF(VL)S259F	C-RAF (1-648)	S259F	pEGFP-C1
GFP-C-RAF(VL)T260R	C-RAF (1-648)	T260R	pEGFP-C1
GFP-C-RAF(VL)V263A	C-RAF (1-648)	V263A	pEGFP-C1
H-Ras(VL)WT	H-Ras (1-188)	WT	pCMV-HA-YC155
H-Ras(VL)WT	H-Ras (1-188)	WT	pmCherry-C1
mCherry-14-3-3ε	14-3-3ε (1-255)	WT	pOPINE(c)Cherry
14-3-3ε(VL)	14-3-3ε (1-255)	WT	pProEXHTb
14-3-3ζ(VL)	14-3-3ζ (1-245)	WT	pProEXHTb
14-3-3ζΔC	14-3-3ζ (1-230)	WT	pProEXHTb
14-3-3σΔC	14-3-3σ (1-231)	WT	pProEXHTb

Tabelle 17: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte.

A.2.4. Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Klonierungen	
MLF1_1s_BglII	CGCAGATCT_ATG TTCAGGATGCTGAACAGC
MLF1_1s_XhoI	CGCCTCGAG_ATG TTCAGGATGCTGAACAGC
MLF1_268as_EcoRI	CGCGAATTCTCATTATTTTTTGTGCTTTTTCACAGATG
MLF1_268as_PstI	CGCCTGCAGTTTTTTGTTGCTTTTTCACAGATG
MLF1_38as_EcoRI	CCGGGAATTCTCATCCAAAGGGTTCAGAAAACTTC
MLF1_47as_EcoRI	CCGGGAATTCTCAACCATCAGAGATACTGAGCAAGTCT
MLF1_176as_EcoRI	CCGGGAATTCTCATCCAGTCTTCTTGTTCTTTGACTTT
MLF1_38as_PstI	CCGGCTGCAGTCCAAAGGGTTCAGAAAACTTC
MLF1_47as_PstI	CCGGCTGCAGACCATCAGAGATACTGAGCAAGTCT
MLF1_176as_PstI	CCGGCTGCAGTCCAGTCTTCTTGTTCTTTGACTTT
MLF1_37s_BglII	CCGGAGATCTGGAAGAGACTTGCTCAGTATCTCTG
MLF1_40s_BglII	CCGGAGATCTTTGCTCAGTATCTCTGATGGTAGAG
MLF1_50s_BglII	CCGGAGATCTGCTCATAATCGTAGAGGACATAATGA
CRAF_1s_BglII	GGCCAGATCT_ATGGAGCACATACAGGGAGC
CRAF_330as_KpnI	GGCCGGTACCTCAAATTTTGT TTTTCTCCTGGGTC
HRAS_1s_BglII	CCGGAGATCT_ATGACAGAATACAAGCTTGTTGTTGTTG

HRAS_189as_EcoRI	GGCCGAATTC	TCAGGAGAGCACACACTTGC
Mutagenese		
MLF1_S34A_s	GAAAATATGCGACAGATGATAAGAAGTTTTGCTGAACCCCT-	TTGGAAG
MLF1_S34A_as	CTTCCAAAGGGTTCAGCAAACTTCTTATCATCTGTGCGCA-	TATTTTC
MLF1_L89E_s	GGTGTCAAATATGAGAACTATATGCAGAAAGAAGAAAGA-	AACTTCGGTCAAC
MLF1_L89E_as	GTTGACCGAAGTTTCTTTCTTCTTTCTGTCATATAGTTTCT-	CATATTTGACACC
MLF1_L89A_s	GGTGTCAAATATGAGAACTATATGCAGAAAGCAGAAAGA-	AACTTCGGTCAAC
MLF1_L89A_as	GTTGACCGAAGTTTCTTTCTGCTTTCTGTCATATAGTTTCT-	CATATTTGACACC
MLF1_L89V_s	CAAATATGAGAACTATATGCAGAAAGTAGAAAGAACTT-	CGGTCAACTTTA
MLF1_L89V_as	TAAAGTTGACCGAAGTTTCTTTCTACTTTCTGTCATATAGT-	TTCTCATATTTG
CRAF_S233A_s	GTTCTCAGCACAGATATGCTACACCTCACGCCTT	
CRAF_S233A_as	AAGGCGTGAGGTGTAGCATATCTGTGCTGAGAAC	
CRAF_S259A_s	CCAGAGGCAGAGGTCGACAGCCACACCTAA	
CRAF_S259A_as	TTAGGTGTGGCTGTCGACCTCTGCCTCTGG	
Sequenzierungen		
pEGFP-C2-FP	GATCACATGGTCCCTGCTG	
pEGFP-C1_rev	CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGG	
pEGFP-N1_for	GTCGTAAACAACCTCCGCCC	
pEGFP-N1_rev	GTCCAGCTCGACCAGGATG	
pProEx_Seq_fw	AGCGGATAACAATTTTACACAGG	
pProEx_Seq_rev	GCAAATTCTGTTTTTATCAGACCG	
pOPIN E/F/E2_fwd	TACGACTCACTATAGGGGAATTGTG	
pOPINE_mCherry_for	ACACCATCGTGGAACAGTAC	
Seq_CRAF_mid	ACACCTCACGCCTTCAC	
CRAF_mid_Seq_rev	CACAATTGCCAGGTTGTCC	

Tabelle 18: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Die Sequenz der Oligonukleotide ist in 5'→3'-Richtung dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind in blau hervorgehoben. Stop Codons und Mutationen sind „stark“ hervorgehoben. Ein Unterstrich markiert den Beginn des Leserahmens.

A.3. Bestimmung des K_D -Werts über biophysikalische Messungen im thermischen Gleichgewicht

Die hier aufgeführte Herleitung wurden dem „Fluorescence Polarization Technical Resource Guide“ von Invitrogen entnommen (Invitrogen, 2006). Die Bestimmung physikalischer Konstanten, die klassische Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen beschreiben, hängt von folgenden Annahmen ab:

1. Die Wechselwirkung muss reversibel mit einer bimolekularen Hin- und einer unimolekularen Rückreaktion sein.
2. Alle Rezeptormoleküle (B) müssen gleichwertig und unabhängig voneinander sein.
3. Die biologische Antwort muss proportional zu den besetzten Rezeptorbindestellen sein.
4. Die Wechselwirkung und der damit einhergehende Effekt müssen gemessen werden, nachdem sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet.
5. Der Ligand darf nicht abgebaut werden oder in anderen Reaktion involviert sein und nur in freier Form (A_f) oder an den Rezeptor gebunden (AB) vorliegen.

Unter diesen Annahmen gilt im chemischen Gleichgewicht:



(A_f = freier Ligand, B_f = freier Rezeptor, k_1 = Assoziationsrate, k_{-1} = Dissoziationsrate, k_e = Proportionalitätskonstante zwischen Bindung und Effekt)

Unter Gleichgewichtsbedingungen gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$\frac{[A_f][B_f]}{[AB]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_D \quad (23)$$

Beschreibt man nun A_f durch die gesamte Ligandenkonzentration (A_t) und setzt ($A_t - AB$) = A_f in Gleichung 23 ein, erhält man:

$$\frac{[B_f][A_t - AB]}{[AB]} = K_D \quad (24)$$

(B_f = freie Rezeptorkonzentration und A_t = gesamte Ligandenkonzentration)

Durch Umformen erhält man:

$$\frac{AB}{A_t} = \frac{B_f}{K_D + B_f} \quad (25)$$

Diese Gleichung beschreibt eine Hyperbel mit einer horizontalen Asymptote, die die 100 %ige Sättigung von A_t darstellt. Aus dieser Gleichung wird weiterhin ersichtlich, dass der K_D als die Konzentration B_f definiert wird, bei der 50 % der Rezeptorbindestellen besetzt sind. Wenn man nun $(B_t - AB)$ für B_f in Gleichung 25 einsetzt erhält man:

$$AB = \frac{A_t \times (B_t - AB)}{K_D + (B_t - AB)} \quad (26)$$

Eine reelle Lösung für AB ist:

$$AB = \frac{(A_t + K_D + B_t) - \sqrt{(-A_t - K_D - B_t)^2 - 4A_t B_t}}{2} \quad (27)$$

Diese Gleichung kann durch computergestützte nichtlineare Regression gelöst werden und liefert Werte für K_D und A_t . Die gemessene Anisotropie (r) kann durch folgende Abhängigkeit beschrieben werden:

$$AB = A_T \times \frac{r - r_f}{r_{AB} - r_f} \quad (28)$$

(A_t = gesamte Ligandenkonzentration, r = gemessene, experimentelle Anisotropie, r_f = Anisotropie des freien Liganden, r_{AB} = Anisotropie des komplett gebundenen Liganden) Setzt man diesen Wert für AB in Gleichung 27 ein und löst nach r auf, erhält man:

$$r = r_f + (r_{AB} - r_f) \times \frac{(A_t + K_D + B_t) - \sqrt{(A_t - K_D - B_t)^2 - 4A_t B_t}}{2A_t} \quad (29)$$

Da A_t bekannt ist und r für jede B_t -Konzentration gemessen wird, kann diese Gleichung nach K_D , r_{AB} und r_f gelöst werden. Wenn Rezeptor-Abbau kein Problem darstellt, ist B_t eine gute Annäherung an B_f in Gleichung 25:

$$AB = \frac{B_t \times A_t}{K_D + B_t} \quad (30)$$

Setzt man in diese Gleichung mit Gleichung 28 gleich und löst nach r auf, erhält man:

$$r = r_f + [(r_{AB} - r_f) \times \frac{B_t}{K_D + B_t}] \quad (31)$$

Diese Gleichung liefert Werte für K_D , r_{AB} und r_f . Weiterhin stellt die gemessene Anisotropie (r) den Y-Wert in Gleichung 14 dar. B_t ist die eingesetzte Konzentration des Rezeptors (14-3-3-Protein) und stellt den X-Wert dar. Damit wird Gleichung 31 zu Gleichung 14.

Zudem wird aus dieser Herleitung ersichtlich, dass diese Annahmen für viele biophysikalische Messungen, die unter Gleichgewichtsbedingungen stattfinden, gelten. Das bedeutet, dass man durch Ersetzen der Anisotropie (r) durch Messwerte aus zum Beispiel einer SPR-Messung auch diese Daten auswerten kann, um den K_D zu bestimmen.

A.4. Abbildungen und Tabellen

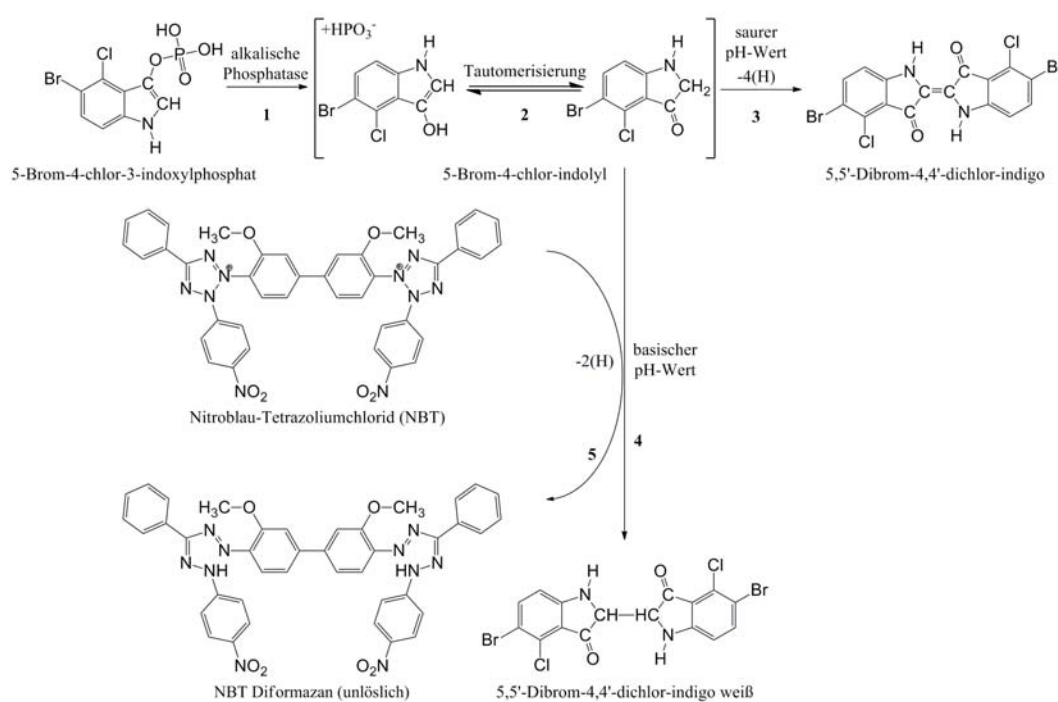


Abbildung A.3: Zunächst spaltet die alkalische Phosphatase das Phosphat des 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) ab, sodass 5-Brom-4-chlor-indolyl entsteht (1). Im nächsten Schritt findet eine Tautomerisierung des 5-Brom-4-chlor-indolyl statt (2). Daraufhin kann unter sauren Bedingungen durch Abspaltung von vier Wasserstoffatomen das 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo gebildet werden (3). Bei alkalischen Bedingungen jedoch bildet sich unter Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen das 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo weiß (4). Hierbei ist vor allem die Abspaltung der zwei Wasserstoffe von Bedeutung. Diese sind notwendig, um das zweite Substrat Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in das unlösliche NBT Diformazan umzuwandeln (5). Das unlösliche NBT Diformazan fällt blau bis lila aus und markiert so den Ort der aktiven alkalischen Phosphatase. Abbildung modifiziert nach McGadey (1970).

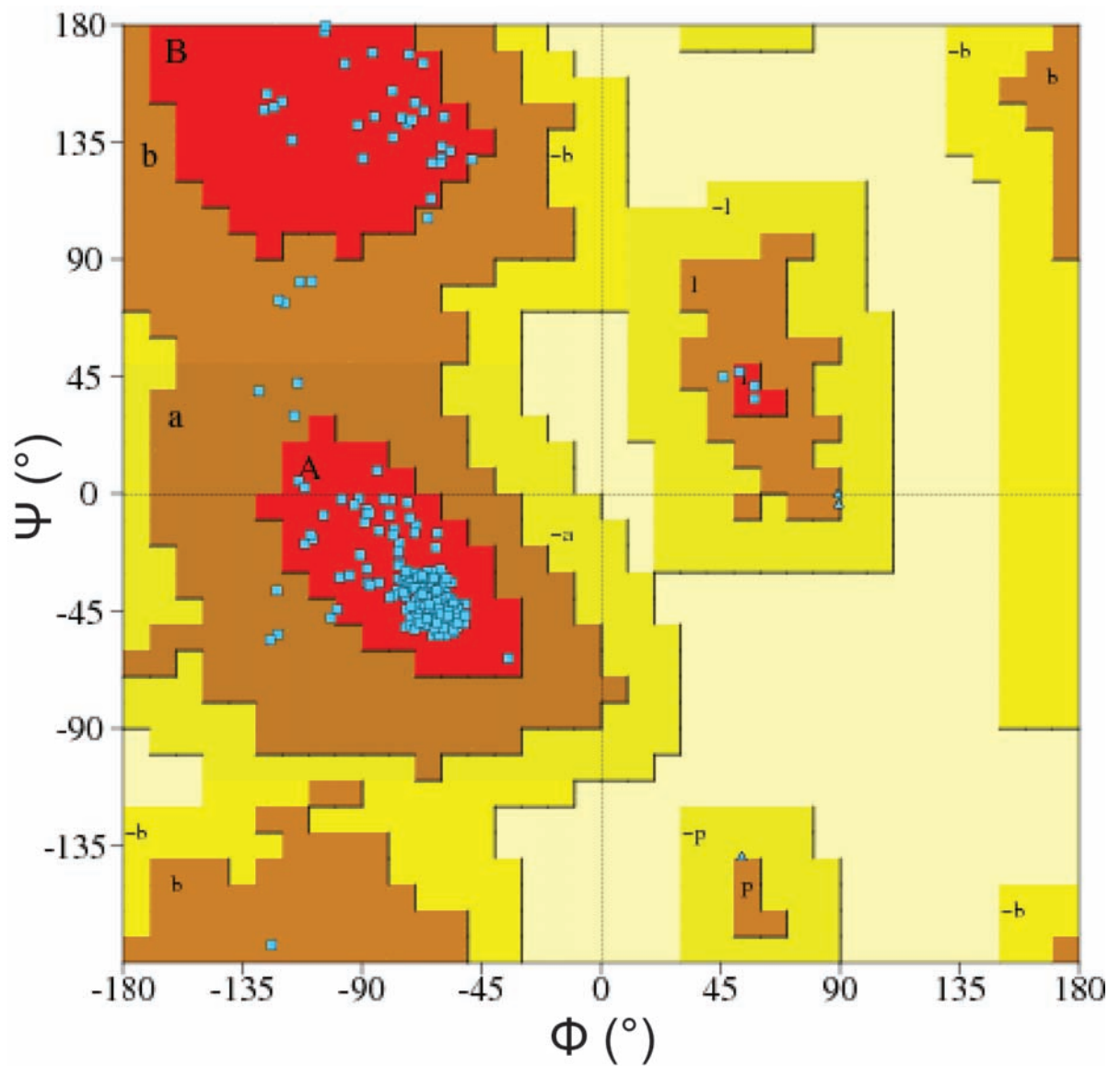


Abbildung A.4: Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C und C-RAF₍₂₂₉₋₂₉₆₎pS233,pS259. Die mit A, B, und L gekennzeichneten Bereiche entsprechen sterisch günstigen Ψ/Φ -Kombinationen für β -Faltblätter, α -Helices und linksgängige α -Helices. Die farblich markierten Regionen beschreiben den bevorzugten Bereich (rot), den erlaubten Bereich (braun) und den großzügig zugelassenen Bereich (gelb). Glycin-Reste sind als Dreiecke (▲) dargestellt, die anderen Aminosäuren als Quadrate (■). Die Erstellung des Diagramms erfolgte mit der Software *PROCHECK*.

14-3-3 ζ Δ C/C-RAF ₍₂₂₉₋₂₆₄₎ pS233,pS259	
Zellparameter	
a (Å)	72,14
b (Å)	102,43
c (Å)	113,89
$\alpha \beta \gamma$ (°)	90 90 90
Raumgruppe	P2(1)2(1)2(1)
Datenprozessierungsstatistik	
Auflösung (Å)	46,727 - 1,95 (2,00 - 1,95)
Anzahl <i>unique</i> Reflexe	61896 (4451)
Redundanz	5,19 (5,36)
I/ σ (I)	19,57 (4,31)
Vollständigkeit (%)	99,5 (99,5)
R _{merge}	0,062 (0,391)
Strukturverfeinerungsstatistik	
Auflösung (Å)	46,73 - 1,95 (2,001 - 1,95)
Anzahl Reflexe	58775 (4275)
R _{work} /R _{free}	0,198/0,226 (0,232/0,241)
Reflexe im Testset	3094
<i>Atomic displacement model</i>	anisotrop
Modellstatistik	
Nicht-H-Atome	4398
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	32,710
Ramachandran-Diagramm	
bevorzugte Bereiche (%)	96,4
erlaubte Bereiche (%)	3,6
großzügig erlaubte Bereiche (%)	0,0
nicht erlaubte Bereiche (%)	0,0

Tabelle 19: Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C und C-RAF₍₂₂₉₋₂₉₆₎pS233,pS259. Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösung.

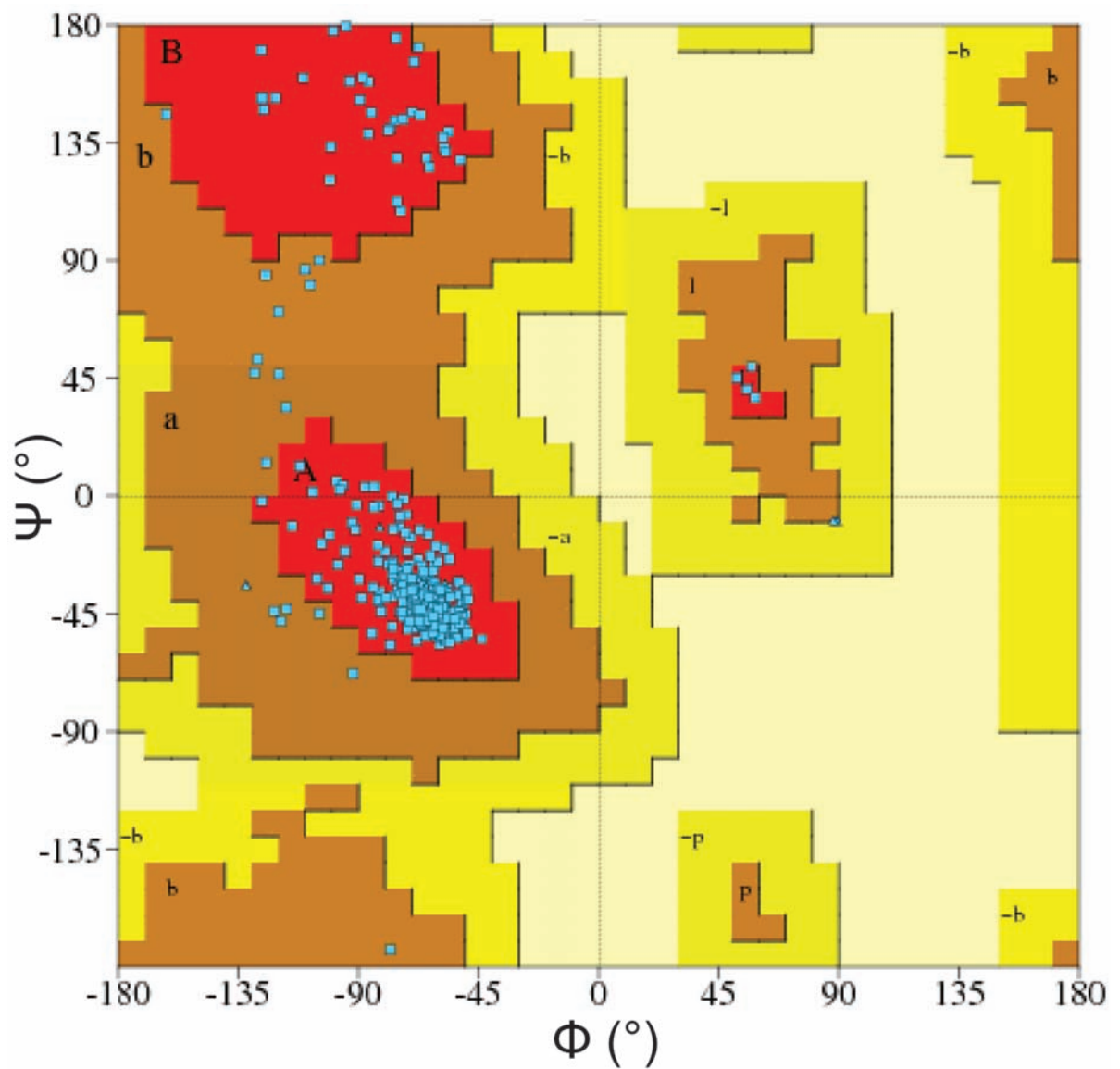


Abbildung A.5: Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C, C-RAF₍₂₂₉₋₂₉₆₎pS233,pS259 und CNA. Die mit A, B, und L gekennzeichneten Bereiche entsprechen sterisch günstigen Ψ/Φ -Kombinationen für β -Faltblätter, α -Helices und linksgängige α -Helices. Die farblich markierten Regionen beschreiben den bevorzugten Bereich (rot), den erlaubten Bereich (braun) und den großzügig zugelassenen Bereich (gelb). Glycin-Reste sind als Dreiecke (▲) dargestellt, die anderen Aminosäuren als Quadrate (■). Die Erstellung des Diagramms erfolgte mit der Software *PROCHECK*.

14-3-3 ζ Δ C/C-RAF₍₂₂₉₋₂₆₄₎pS233,pS259/CNA

Zellparameter	
a (\AA)	72,28
b (\AA)	103,40
c (\AA)	112,58
$\alpha \beta \gamma$ ($^\circ$)	90 90 90
Raumgruppe	P2(1)2(1)2(1)
Datenprozessierungsstatistik	
Auflösung (\AA)	49,447 - 2,20 (2,30 - 2,20)
Anzahl <i>unique</i> Reflexe	42870 (5204)
Redundanz	3,74 (3,67)
I/ σ (I)	21,65 (4,66)
Vollständigkeit (%)	98,3 (97,5)
R _{merge}	0,067 (0,391)
Strukturverfeinerungsstatistik	
Auflösung (\AA)	47,04 - 2,15 (2,206 - 2,15)
Anzahl Reflexe	44660 (3238)
R _{work} /R _{free}	0,214/0,251 (0,249/0,323)
Reflexe im Testset	2351
<i>Atomic displacement model</i>	anisotrop
Modellstatistik	
Nicht-H-Atome	4402
Durchschnittlicher B-Faktor (\AA^2)	38,227
Ramachandran-Diagramm	
bevorzugte Bereiche (%)	96,1
erlaubte Bereiche (%)	3,9
großzügig erlaubte Bereiche (%)	0,0
nicht erlaubte Bereiche (%)	0,0

Tabelle 20: Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 ζ Δ C, C-RAF₍₂₂₉₋₂₉₆₎pS233,pS259 und CNA. Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösung.

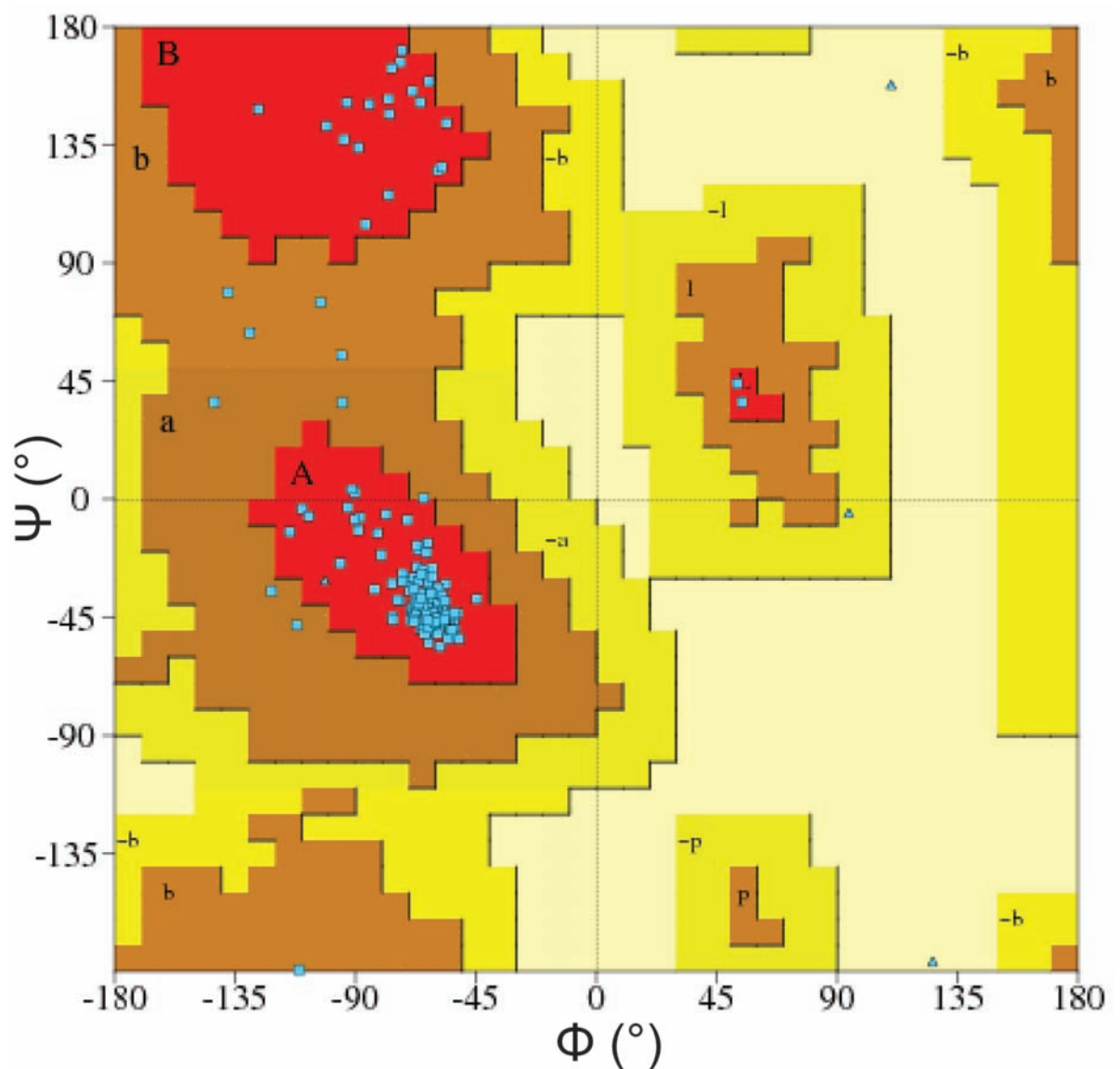


Abbildung A.6: Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 $\sigma\Delta$ C und C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621. Die mit A, B, und L gekennzeichneten Bereiche entsprechen sterisch günstigen Ψ/Φ -Kombinationen für β -Faltblätter, α -Helices und linksgängige α -Helices. Die farblich markierten Regionen beschreiben den bevorzugten Bereich (rot), den erlaubten Bereich (braun) und den großzügig zugelassenen Bereich (gelb). Glycin-Reste sind als Dreiecke (\blacktriangle) dargestellt, die anderen Aminosäuren als Quadrate (\blacksquare). Die Erstellung des Diagramms erfolgte mit der Software *PROCHECK*.

14-3-3 σ Δ C/C-RAF ₍₆₁₈₋₆₂₆₎ pS621	
Zellparameter	
a (Å)	82,10
b (Å)	111,50
c (Å)	62,40
$\alpha \beta \gamma$ (°)	90 90 90
Raumgruppe	C222(1)
Datenprozessierungsstatistik	
Auflösung (Å)	19,497 - 1,70 (1,80 - 1,70)
Anzahl <i>unique</i> Reflexe	31028 (4937)
Redundanz	7,95 (7,49)
I/ σ (I)	25,44 (6,24)
Vollständigkeit (%)	97,3 (99,7)
R _{merge}	0,071 (0,293)
Strukturverfeinerungsstatistik	
Auflösung (Å)	19,50 - 1,70 (1,744 - 1,70)
Anzahl Reflexe	29476 (2187)
R _{work} /R _{free}	0,179/0,220 (0,196/0,281)
Reflexe im Testset	1552
<i>Atomic displacement model</i>	anisotrop
Modellstatistik	
Nicht-H-Atome	2344
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	17,063
Ramachandran-Diagramm	
bevorzugte Bereiche (%)	95,3
erlaubte Bereiche (%)	4,7
großzügig erlaubte Bereiche (%)	0,0
nicht erlaubte Bereiche (%)	0,0

Tabelle 21: Statistik des Datensatzes und der Verfeinerung des Strukturmodells des Komplexes aus 14-3-3 σ Δ C und C-RAF₍₆₁₈₋₆₂₆₎pS621. Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Alfred Wittinghofer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit einen Großteil der praktischen Arbeit in der Abteilung für strukturelle Biologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Roland Winter möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Dr. Christian Ottmann gilt mein Dank für dieses spannende Projekt und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe am Chemical Genomics Centre zu arbeiten. Außerdem bedanke ich mich für die gute fachliche Betreuung sowie viele interessante wissenschaftliche Diskussionen und Ideen.

Bei der IMPRS bedanke ich mich für die finanzielle und menschliche Unterstützung.

Meinen (ehemaligen) Kollegen Dr. Benjamin Schumacher und Philipp Thiel danke ich für viele anregende Diskussionen, viel Spaß und viel Unterstützung, aber ganz besonders für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich meinen Kollegen Dr. Lars Röglin und Malgorzata Skwarczynska ebenfalls für viele kritische Diskussionen und das Korrekturlesen des Methodenteils.

Bei Dr. Sven Hennig bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der AG Ottmann, des Chemical Genomics Centre und der Abteilung für strukturelle Biologie im Labor und im Büro für die gute Zusammenarbeit. Dabei zusätzlich zu den oben genannten insbesondere Dr. Rolf Rose, Dr. Michael Weyand, Maria Bartel, David Bier, Dr. Ingrid Vetter, Marco Bürger, Susanne Löcke, Elena Mucha und Antje Schäfer.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen und die sprachliche Korrektur dieser Arbeit.

Maik danke ich für seine Geduld mit mir.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen worden sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Witten im Mai 2012

Manuela Molzan
