

Analyse von Struktur- Funktionsbeziehungen bei der Ras-abhängigen Raf-Aktivierung

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Quack
aus Rheydt

Düsseldorf, 2002

**Gedruckt mit der Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Referent: Prof. Dr. W. Kunz
Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner
Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2002

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
Der genetische Code	xv
Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren	xvi
Aminosäuren-Charakteristika	xvi
Restriktionsendonukleasen	xvii
1 EINLEITUNG	1
1.1 Signaltransduktion	1
1.2 GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter	2
1.3 Die Ras-Superfamilie	3
1.4 Signalübertragung durch Ras-Proteine	7
1.4.1 Ras-Effektoren	9
1.4.2 Die MAPK-Kaskade	12
1.5 Die Raf-Kinase	13
1.5.1 Domänenstruktur der Raf-Kinase	14
1.5.2 Interaktion zwischen c-Raf und Ras	15
1.5.3 Aktivierung und Regulation der Raf-Kinase	17
1.5.4 Die c-Raf C1-Domäne	23
1.5.4.1 Struktur der c-Raf C1-Domäne	24
1.5.4.2 Interaktion und Funktion der c-Raf C1-Domäne	26
1.6 Zielsetzung	31
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Material	32
2.1.1 Biologisches Material	32
2.1.1.1 Bakterien-Stämme (<i>E. coli</i>)	32
2.1.1.2 Hefe-Stämme	32
2.1.1.3 Säugerzellen	32
2.1.2 Nährmedien	32
2.1.2.1 Bakterien	32
2.1.2.2 Hefen	33
2.1.2.3 Säugerzellen	33
2.1.3 Chemikalien	34
2.1.4 Antibiotika	34
2.1.5 Antikörper	34
2.1.6 Enzyme	34
2.1.7 Puffer und Lösungen	34
2.1.8 Oligodesoxynucleotide	40
2.1.9 Vektoren und Plasmide	42

2.1.9.1	Hefe-Vektoren	42
2.1.9.2	Säuger-Expressionsvektoren	42
2.1.10	DNA- und Proteinstandards	43
2.1.10.1	DNA-Standards	43
2.1.10.2	Proteinstandards	43
2.1.11	Reagenziensets („kits“)	43
2.1.12	Verbrauchsmaterialien	43
2.1.13	Laborgeräte	44
2.1.14	Computer-Software	45
2.1.15	Internet-Adressen	45
2.2	Methoden	46
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	46
2.2.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	46
2.2.1.1.1	Photometrisch	46
2.2.1.1.2	Gelelektrophoretische Abschätzung	46
2.2.1.2	DNA-Restriktion mit Restriktionsendonukleasen des Typs II	47
2.2.1.3	Dephosphorylierung von DNA	48
2.2.1.4	Beseitigung überhängender DNA-Einzelstränge (<i>blunt ending</i>)	48
2.2.1.5	DNA-Extraktion	49
2.2.1.6	DNA-Ethanolpräzipitation	49
2.2.1.7	DNA-Ligation	49
2.2.1.8	Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynucleotide	50
2.2.1.9	Phosphorylierung von Oligodesoxynucleotiden	51
2.2.1.10	DNA-Gelelektrophorese	51
2.2.1.10.1	Analytische DNA-Gelelektrophorese	52
2.2.1.10.2	Präparative DNA-Gelelektrophorese	52
2.2.1.11	TOPO TA-Klonierung	52
2.2.1.12	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	53
2.2.1.13	PCR-Schnelltest	54
2.2.1.14	PCR- <i>in vitro</i> -Mutagenese	55
2.2.1.15	DNA-Sequenzierung	57
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	58
2.2.2.1	Protein-Konzentrationsbestimmung	58
2.2.2.1.1	mit Bicinchoninsäure (BCA)	58
2.2.2.1.2	nach Bradford	59
2.2.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	59
2.2.2.2.1	SDS-PAGE	59
2.2.2.2.2	Tricin-Gele	60
2.2.2.3	Coomassie-Färbung von Protein-Gelen	61
2.2.2.4	Protein-Transfer auf Membranen (Western-Blot)	61
2.2.2.4.1	Tank-Blotting	62
2.2.2.4.2	<i>Semi-Dry-Blotting</i>	62
2.2.2.5	Ponceau S-Färbung membrangebundener Proteine	63
2.2.2.6	Immundetektion membrangebundener Proteine	63
2.2.2.6.1	mittels „ECL Plus Western blotting detection system“	63
2.2.2.6.2	mittels „Western Breeze [®] -Kit“	64
2.2.2.7	Entfernung proteingebundener Antikörper	65
2.2.3	Arbeiten mit Bakterien	65
2.2.3.1	Anzucht von Bakterien	65
2.2.3.1.1	Vorkultur / ÜN-Kultur	65

2.2.3.1.2	Hauptkultur	65
2.2.3.2	Lagerung von Bakterien	65
2.2.3.3	Herstellung kompetenter Bakterien	66
2.2.3.4	Transformation kompetenter Bakterien	66
2.2.3.5	Bestimmung der Transformationseffizienz	66
2.2.3.6	Isolation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab	67
2.2.3.6.1	ohne Reagenzienset	67
2.2.3.6.2	mit Reagenzienset	67
2.2.3.7	Isolation von Plasmid-DNA in großem Maßstab	68
2.2.4	Arbeiten mit Hefe	68
2.2.4.1	Anzucht von Hefen	68
2.2.4.1.1	Vorkultur / ÜN-Kultur	68
2.2.4.1.2	Hauptkultur	69
2.2.4.2	Lagerung von Hefen	69
2.2.4.3	Herstellung kompetenter Hefen	69
2.2.4.4	Transformation kompetenter Hefen	70
2.2.4.5	Two-Hybrid-Interaktions-Assay	70
2.2.4.5.1	Qualitativer <i>Two-Hybrid-Assay</i>	72
2.2.4.5.2	Semiquantitativer <i>Two-Hybrid-Assay</i>	72
2.2.4.5.3	DNA-Konstrukte für das GAL4-Two-Hybrid-System	74
2.2.5	Arbeiten mit Säugerzellen	76
2.2.5.1	Zellkultur-Bedingungen	76
2.2.5.2	Zellzahl-Bestimmung	77
2.2.5.3	Transiente Transfektion von Säugerzellen	77
2.2.5.4	Ernte adhärenter Säugerzellen	79
2.2.5.4.1	durch mechanische Ablösung	79
2.2.5.4.2	durch Trypsin-Behandlung	79
2.2.5.5	Bestimmung der Transformationseffizienz	80
2.2.5.6	Immunpräzipitation von Proteinen aus Zell-Lysaten	80
2.2.5.7	Luciferase-Reportergen-Assay	81
2.2.5.8	Kinase-Aktivitäts-Assay	85
2.2.5.9	DNA-Konstrukte für den Luciferase-Reportergen-Assay und den Kinase-Aktivitäts-Assay	88
3	ERGEBNISSE	99
3.1	Untersuchung der Funktion der Lipidmodifikationen von H-Ras für die Aktivierung von c-Raf 1	99
3.1.1	Aktivierung von c-Raf(Wt) durch QI-RasG12V.3S	101
3.1.1.1	Aktivierung im Luciferase-Reportergen-Assay	101
3.1.1.2	Aktivierung im Kinase-Aktivitäts-Assay	103
3.1.1.3	Expressionskontrolle des QI-RasG12V.3S-Konstruktes	104
3.1.2	Aktivierung von c-Raf C1-Mutanten durch QI-RasG12V-Konstrukte	105
3.1.2.1	Aktivierung aktivierender Raf C1-Mutanten durch QI-RasG12V.3S	107
3.1.2.2	Aktivierung inhibierender Raf C1-Mutanten durch QI-RasG12V.3S	108
3.1.2.3	Aktivierung inhibierender Raf C1-Mutanten durch QI-RasG12V.3C	110
3.1.3	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch verschiedene RasG12V-Konstrukte	111
3.1.3.1	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch RasG12V	112
3.1.3.2	Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) an RasG12V	113
3.1.3.3	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch QI-RasG12V.3S und QI-RasG12V.3C	115

3.1.3.4	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch QI-RasG12V.3S und C-terminal verkürzte QI-RasG12V-Konstrukte	116
3.2	Identifizierung eines mit der c-Raf C1-Domäne interagierenden Ras-Epitops	119
3.2.1	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch verschiedene RasG12V.V45-Mutanten	121
3.2.2	Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) an verschiedene RasG12V.V45-Konstrukte	125
3.2.3	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region	128
3.2.4	Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region	131
3.2.5	Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Substitutionen in den Positionen 43, 45 und 50	133
3.2.6	Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Substitutionen in den Positionen 43, 45 und 50	135
3.2.7	Untersuchung der potentiellen Interaktion des identifizierten Ras-Epitops mit einem funktionellem Epitop der c-Raf C1-Domäne	137
4	DISKUSSION	144
4.1	Untersuchung der Funktion der Lipidmodifikationen von H-Ras für die Aktivierung von c-Raf 1	144
4.2	Identifizierung eines mit der c-Raf C1-Domäne interagierenden Ras-Epitops	162
5	ZUSAMMENFASSUNG	184
6	LITERATUR	186
7	DANKSAGUNG	209
8	ERKLÄRUNG	210

Abbildungsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
Abbildung 1.1	Schalterfunktion regulatorischer GTP-bindender Proteine	3
Abbildung 1.2	Die acht Subfamilien der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen	4
Tabelle 1	Konservierte Sequenzen innerhalb der G-Domäne von GTPasen der Ras-Superfamilie	5
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifizierungen von H-Ras	6
Abbildung 1.4	Tertiärstruktur von Ras(1-166)-GppNHp	8
Abbildung 1.5	Interaktion von Ras (H-, N-, K-), Rap und R-Ras/TC21 mit verschiedenen Effektoren und deren nachgeschalteten Signalwegen	9
Abbildung 1.6	Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mitgliedern der Ras-Subfamilie	10
Abbildung 1.7	Schematische Darstellung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade	12
Abbildung 1.8	Schematische Darstellung der Domänenstruktur der c-Raf-Kinase	14
Abbildung 1.9	Tertiärstruktur des Rap1A/Raf RBD-Komplexes	16
Abbildung 1.10	Phosphorylierungsstellen der c-Raf 1-Kinase	18
Abbildung 1.11	Modell der Raf-Aktivierung	22
Abbildung 1.12	Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener C1-Domänen	23
Abbildung 1.13	Struktur der c-Raf C1-Domäne	25
Abbildung 1.14	Vergleich der Struktur der C1-Domänen von c-Raf 1 und PKCδ	26
2	MATERIAL UND METHODEN	32
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese	56
Tabelle 2.1	SDS-PAGE (nach Lämmli <i>et al.</i>)	60
Tabelle 2.2	Tricin-Gele (nach Schagger und Jagow)	61
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung des GAL4-Two-Hybrid-Systems	71
Abbildung 2.3	Schematische Darstellung des pPC86- und des pPC86Xba-Vektors	74
Abbildung 2.4	Schematische Darstellung des pPC97- und des pPC97Xba-Vektors	74
Abbildung 2.5	Die Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl	77
Tabelle 2.3	Lösung I der Transfektions-Lösung des Luciferase-Reportergen-Assays	82
Tabelle 2.4	Lösung II der Transfektions-Lösung des Luciferase-Reportergen-Assays	82
Abbildung 2.6	Schematische Darstellung des Luciferase-Reportergen-Assays	83
Tabelle 2.5	Lösung I der Transfektions-Lösung des Kinase-Aktivitäts-Assays	86
Tabelle 2.6	Lösung II der Transfektions-Lösung des Kinase-Aktivitäts-Assays	86
Abbildung 2.7	Schematische Darstellung des pSVK3- und des pSVK3MCS-Vektors	89

Abbildung 2.8	Schematische Darstellung des pcDNA3- und des pcDNA3DMXB-Vektors	90
Abbildung 2.9	Schematische Darstellung der Klonierung der artifiziellen N-terminalen Transmembran-Domäne	92
Abbildung 2.10	Schematische Darstellung der Position diverser zur Herstellung der RasG12V-Konstrukte verwendeter Oligodesoxynucleotide	97
3	ERGEBNISSE	99
Abbildung 3.1	Schema der Konzeption der QI-RasG12V-Konstrukte	100
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung der verwendeten Ras-Konstrukte	101
Abbildung 3.3	QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch c-Raf(Wt) im Luciferase-Reportergen-Assay	102
Abbildung 3.4	QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch c-Raf(Wt) im Kinase-Aktivitäts-Assay	103
Abbildung 3.5	Vergleich der Expression von RasG12V und QI-RasG12V.3S	105
Abbildung 3.6	Funktionelle Epitope der c-Raf C1-Domäne	106
Abbildung 3.7	QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch aktivierende c-Raf C1-Mutanten im Luciferase-Reportergen-Assay	107
Abbildung 3.8	QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch inhibierende c-Raf C1-Mutanten im Luciferase-Reportergen-Assay	109
Abbildung 3.9	QI-RasG12V.3C-vermittelte Transaktivierung durch inhibierende c-Raf C1-Mutanten im Luciferase-Reportergen-Assay	110
Abbildung 3.10	Schematische Darstellung des c-Raf(DC1)-Konstruktes	112
Abbildung 3.11	Vergleich der RasG12V-vermittelten Transaktivierung durch c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) im Luciferase-Reportergen-Assay	113
Abbildung 3.12	Semiquantitative Bestimmung der Bindung von H-Ras an c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) im Two-Hybrid-System	114
Abbildung 3.13	Vergleich der QI-RasG12V.3S- und QI-RasG12V.3C-vermittelten Transaktivierung durch c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) im Luciferase-Reportergen-Assay	115
Abbildung 3.14	Schematische Darstellung C-terminal verkürzter QI-RasG12V-Konstrukte	117
Abbildung 3.15	Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) vermittelt durch QI-RasG12V.3S und C-terminal verkürzte QI-RasG12V-Konstrukte im Luciferase-Reportergen-Assay	118
Abbildung 3.16	Vergleich der Aminosäuresequenz von H-Ras und Rap1A	119
Abbildung 3.17	Lokalisation der Aminosäuren Asn26, His27, Val45 und Tyr64 in der dreidimensionalen Struktur von H-Ras(1-166)	120
Abbildung 3.18	Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung verschiedener RasG12V.V45-Konstrukte im Reportergen-Assay	122

Abbildung 3.19	Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung von QI-RasG12V.3S und QI-RasG12V.V45E.3S im Luciferase-Reporter-Gen-Assay	124
Abbildung 3.20	Semiquantitative Bestimmung der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V.V45-Konstrukte im Two-Hybrid-System	126
Abbildung 3.21	Schematische Darstellung der Arbeitshypothese	127
Abbildung 3.22	Lokalisation verschiedener Aminosäuren der Aktivierungs-Region sowie des Tyrosins 64 in der dreidimensionalen Struktur von H-Ras(1-166)	128
Abbildung 3.23	Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung verschiedener RasG12V-Konstrukte mit Mutationen in der Aktivierungs-Region im Reporter-Gen-Assay	129
Abbildung 3.24	Semiquantitative Bestimmung der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region im Two-Hybrid-System	132
Abbildung 3.25	Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung verschiedener RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Mutationen in den Positionen 43, 45 und 50 im Reporter-Gen-Assay	134
Abbildung 3.26	Semiquantitative Bestimmung der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Mutationen in den Positionen 43, 45 und 50 im Two-Hybrid-System	136
Abbildung 3.27	Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen verschiedenen funktionellen Bereichen von H-Ras und c-Raf	138
Tabelle 3.1	Schematische Darstellung der bei den „Kreuzexperimenten“ zu erwartenden Resultate	139
Abbildung 3.28	Vergleich der Transaktivierung verschiedener c-Raf-Konstrukte unter Vermittlung von RasG12V, RasG12V.43/45/50A und RasG12V.E37G im Reporter-Gen-Assay	140
Tabelle 3.2	Gegenüberstellung der für die „Kreuzexperimente“ prognostizierten und der tatsächlich gemessenen Resultate	141
4	DISKUSSION	144
Abbildung 4.1	Modell für die Insertion der c-Raf C1-Domäne in der Plasmamembran	150
Abbildung 4.2	Hypothetischer Effekt des QI-RasG12V.3S- und des QI-RasG12V.3C-Konstruktes auf die c-Raf C1-Mutanten K144A, L160A und R164A	154
Abbildung 4.3	Schematische Detail-Darstellung der hypothetischen Ras/Raf-Interaktion im b2/b3-Bereich des Ras-Proteins	177
Abbildung 4.4	Modell der Interaktion zwischen der c-Raf C1-Domäne und Ras	182

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
δ	delta
Δ	Deletion (Delta)
ΔC1	Deletion der c-Raf C1-Domäne
\emptyset	Durchschnitt / durchschnittlich
ε	epsilon
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
γ	gamma
κ	kappa
<i>I</i>	Bakteriophage <i>lambda</i>
<i>l</i>	Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung
μCi	Mikrocurie = 10^{-6} Ci
μg	Mikrogramm = 10^{-6} Gramm
μl	Mikroliter = 10^{-6} Liter
μm	Mikrometer = 10^{-6} Meter
μM	mikromolar = $\mu\text{mol/l}$
μmol	Mikromol = 10^{-6} mol
ζ	zeta
A	
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
a	aliphatische Aminosäure
A	Alanin
A	Ampere (Stromstärke)
Å	Ångström = 10^{-10} m = 0,1 nm
AD	Aktivierungs-Domäne
ade2	für das ADE2 -Protein kodierendes Gen
ADE2	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxylase (Biosynthese von Purin-Nucleotiden, u.a. Adenin)
ade2-101	<i>ochre</i> -Mutation im ade2-Gen; <i>ochre</i> = Stop-Codon
Ala	Alanin
ambre	UAG-Stop-Codon
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Amoniumperoxodisulfat
Arf	ADP ribosylation factor
Arg	Arginin
argF	Gen für ein Enzym des Arginin -Synthesewegs
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat (Asparaginsäure)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	
Ba/F3	B-Zelllinie der Maus
BCA	Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)
Bicine	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-glycin
Bq	Becquerel (Einheit der Aktivität einer radioaktiven Substanz) = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle / s
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise

C

C	Cystein
C-	Carboxy-
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)
C1	Protein Kinase C homology 1
Ca ²⁺	Calciumion
CAP	Ceramide-Activated Protein kinase
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA = <i>antisense</i> -Kopie durch reverse Transkription von mRNA
c-fos	FBJ murine osteosarcoma Protoonkogen
cGMP	cyclisches GMP (Guanosin-3',5'-cyclophosphat)
Ci	Curie (Einheit der Aktivität einer radioaktiven Substanz) = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
CIP	Calf Intestine Phosphatase (alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
COS	Zellen aus der Niere der Meerkatze
CR	Conserved R egion
CRD	Cystein R ich D omain
CRR	Cystein R ich R egion
cyh ^R	Cycloheximid- R esistenzgen
Cys	Cystein

D

D	Aspartat (Asparaginsäure)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)
d.h.	das heißt
Da	D alton = $1,66 \times 10^{-24}$ g (1/12 tel der Masse eines ¹² C-Atoms)
DAG	D iacylglycerol
DB	D N A - B indungs-Domäne
ddH ₂ O	deionisiertes und destiliertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DNS	D esoxyribonucleinsäure
DTT	1,4- D ithio-DL-threitol

E

E	G lutamat (Glutaminsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (kommensales Darmbakterium der Wirbeltiere)
ECL	Enhanced Chemi L uminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Elongations-Faktor
EGF	Epidermal G rowth F actor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
Elk	Transkriptionsfaktor der Ets-Familie
endA	DNA-spezifische E ndonuklease I (DNA-Degradation)
Epac	E xchange protein directly activated by c AMP
ER	Endoplasmatisches R etikulum
ERK	Extracellular Signal Regulated K inase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i>

F

F	P henylalanin
---	----------------------

F ⁻	substituierte F -Plasmide; entstehen durch ungenaue Exzision aus einem Hfr-Genom, wobei häufig chromosomale DNA-Abschnitte mit ausgeschnitten werden; F'-Plasmide können mit hoher Effizienz in Rezipienten-Zellen übertragen werden
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
fg	Femtogramm = 10 ⁻¹⁵ Gramm
Fos	Genprodukt des FBJ murine osteosarcoma -Virus Protoonkogens
FTase	Farnesyltransferase
G	
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
g	Gramm
G	Glycin
GAL4	Transkriptions-Aktivator im Galactose -Metabolismus; positive Regulation der GAL-Gene
gal80	für GAL80 -Protein kodierendes Gen
GAL80	Transkriptions-Korepressor im Galactose -Metabolismus; inhibiert die Transkriptions-Aktivität durch GAL4 in der Abwesenheit von Galactose
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDS	Guanine nucleotide Dissociation Stimulator
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GGTase	Geranylgeranyltransferase
G-Kinase	cGMP-abhängige Proteinkinase
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat (Glutaminsäure)
Gly	Glycin
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GppNHp	Guanosin-5'-(β, γ-imido)-triphosphat
Grb	Growth factor receptor-bound protein
GRP	Guanyl Nucleotide-Releasing Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gyr	DNA-Gyrase
gyrA	für die Gyrase kodierendes Gen; führt superhelikale Windungen in die DNA ein und spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation
GyrB	B -Untereinheit der DNA-Gyrase
H	
h	Stunde(n)
H	Histidin
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2 H ydroxyethyl)- p iperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
his3	für das HIS3 -Protein kodierendes Gen
HIS3	Imidazolglycerolphosphatdehydrogenase (Histidin -Biosynthese)
his3-Δ200	1 kb-Deletion (-205 bis +835) im his3 -Gen
H-ras	Harvey-ras
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
hsd	<i>host specificity determinant</i> , Gene des Restriktions-Modifikationsmechanismus (DNA-Methylase, Restriktionsnuklease)
Hsp	Heat shock protein
HVR	hypervariable Region
I	
I	Isoleucin
IF	Initiations-Faktor
IgG	Immunglobulin G

Ile Isoleucin
IR Infrarot

J

Jun Genprodukt des *avian* sarcoma-Virus Protoonkogens 17
(**jun** = japanisch für 17)

K

K Lysin
K12 *E. coli*-Sicherheitsstamm
kb Kilobasen
kDa Kilodalton
KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat
K-ras Kirsten-**ras**
Krev-1 K-Ras revertierend
KSR Kinase Suppressor of Ras

L

l Liter
L Leucin
lac Lactose-Operon; 3 für den Lactose-Stoffwechsel kodierende Gene
(lacZ, lacY und lacA)
lacI für das Repressor-Protein des **lac**-Operons kodierendes Gen (Inhibitor)
LB Luria Bertani
Leu Leucin
leu2 für das **LEU2**-Protein kodierendes Gen
LEU2 3-Isopropylmalatdehydrogenase (Enzym in der **Leucin**-Biosynthese)
leu2-3,112 (= leu2-3 leu2-112) +1 *frameshift*-Mutation im **leu2**-Gen
LEU3 Transkriptionsfaktor in der **Leucin**-Biosynthese
LTH ohne **Leucin**, **Tryptophan** und **Histidin**
Lys Lysin
lys2 für das LYS2-Protein kodierendes Gen
LYS2 Aminoacetylsemialdehyddehydrogenase
(Biosynthese von Aminosäuren, u.a. **Lysin**)

M

m Meter
M Methionin
M Molar = 1mol/l
m.a.W. mit anderen Worten
M⁻¹ 1/M
mA Milliampere = 10⁻³ Ampere
MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MAT *mating type locus* (Paarungstyp-Locus) mit den Allelen
a und α (a1, a2, α1, α2)
MBP hier: Maltose Binding Protein, aber auch: Myelin Basic Protein
MEK Mitogen- or Extracellular-regulated Kinase (MAP/ERK Kinase)
MEKK mitogen extracellular activated kinase kinase (MEK-Kinase)
MEM Modified Eagle's Medium
Met Methionin
mg Milligramm = 10⁻³ Gramm
Mg²⁺ Magnesiumion
MgCl₂ Magnesiumchlorid
min Minute(n)

ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
mm	Millimeter = 10^{-3} Meter
mM	millimolar = mmol/l
mmol	Millimol = 10^{-3} mol
mol	1Mol \cong Stoffmenge von $6,022045 \times 10^{23}$ Teilchen \cong Avogadrosche Zahl N(X)
M_r	molare Masse (g/mol)
M-ras	Muscle- / microspikes-ras
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA) = komplementäre RNA-Kopie der DNA
Myc	Genprodukt des <i>avian myelocytomatosis</i> -Virus Protoonkogens

N

N	Asparagin
N-	Amino-
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxyd
ng	Nanogramm = 10^{-9} Gramm
NIH3T3	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus der Maus
nl	Nanoliter = 10^{-9} Liter
nm	Nanometer = 10^{-9} Meter
nM	nanomolar = nmol/l
nmol	Nanomol = 10^{-9} mol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nr.	Nummer
N-ras	Neuroblastoma-ras
NTMD	N-terminale TransMembran-Domäne

O

ochre	UAA-Stop-Codon
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
opal	UGA-Stop-Codon

P

P	Prolin
PA	Phosphatidic Acid (Phosphatidylsäure)
Pak	P21-activated protein kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC12	Pheochromocytoma-Zellen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	Pyrococcus furiosus
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säure-Konstante K_s
PKA	Proteinkinase A
pK _b	negativer dekadischer Logarithmus der Basen-Konstante K_b
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D (PKC μ)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (Phorbolester)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A

Pro	Prolin
proA	Gen der Prolin -Synthese, kodiert für γ -Glutamylphosphat-Reduktase (Glutamat-5'-semialdehyd-dehydrogenase)
proB	Gen der Prolin -Synthese, kodiert für γ -Glutamyl-Kinase (Glutamat-5'-kinase)
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	
Q	Glutamin
R	
R	Arginin
Rab	Ras -like proteins from rat brain
Rad	Ras associated with diabetes
Raf	Rapid fibrosarcoma , Genprodukt des menschlichen c-raf-Protoonkogens
Ran	Ras related nuclear proteins
Ras	rat sarcoma , Genprodukt des menschlichen c-H-ras-Protoonkogens
recA	recombination , für das recA-Protein kodierendes Gen (Funktion bei der Rekombination)
relA	für den sog. stringenten Faktor (GTP-Pyrophosphokinase = (p)ppGpp-Synthetase) kodierendes Gen; Mutationen dieses Gens führen zu relaxierten Mutanten, die bei Aminosäuremangel keine stringente Reaktionen zeigen (Verminderung der rRNA- und tRNA-Synthese, erhöhte Protein-Degradation, Stoffwechsel-Anpassungen (Reduktion der Nucleotid-, Kohlenhydrat-, Lipid-Synthese <i>etc.</i>)
RF	Releasing Factor
Rgl	RalGDS -like
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rho	Ras homology
Rit	Ras -like protein in tissue
RK13	Rabbit Kidney 13 -Zelllinie, epitheliale Zellen aus der Kaninchenniere
Rlf	RalGDS -like factor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
R-Ras	Related-ras
RT	Raum-Temperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S	
s	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bierhefe)
s ⁻¹	1/s
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (alkalische Phosphatase aus Krabben)
SBEG	Sorbitol Bicine Ethylenglykol
SC-Medien	synthetisches Komplettmedium
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Ser	Serin
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> , Zelllinie 9 (klonal), aus dem Ovar
SH2, SH3	Src Homology
Shc	Src homology 2 domain-containing protein
SOS	Son of Sevenless (Austauschfaktor)
Src	Genprodukt des sarcoma-induzierenden Protoonkogens des Rous sarcoma-Virus
SRP	Signal Recognition Particle
supE	amber-Suppressor -tRNA; mutierte tRNA, welche das <i>amber</i> Stop-Codon (UAG) durch den Einbau von Glutamin supprimiert

SUR-8 Suppressor of **Ras**

T

T **Threonin**
Taq *Thermophilus aquaticus*
TBS **Tris Buffered Saline**
TEMED N,N,N',N'-**Tetramethyl-ethylendiamin**
tet^R Gen für **Tetracyclin-Resistenz**
thi Gen der **Thiamin-Synthese**
Thr **Threonin**
Tn10 bakterielles **Transposon** (ca. 9,3 kb), vermittelt Tetracyclin-Resistenz
TPA **Tetradecanoyl-phorbol-acetat** (Phorbol-ester)
tra tra-Gene kodieren für Proteine welche für die Ausbildung der Pili des Konjugationsapparats und damit für den Gen-**Transfer** von Zelle zu Zelle essentiell sind
Tricine N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100 Alkylphenylpolyethylenglykol
Trp **Tryptophan**
trp1 für das **TRP1**-Protein kodierendes Gen
TRP1 Phosphoribosylanthranilatisomerase
(Aminosäure-Metabolismus, u.a. **Tryptophan-Biosynthese**)
trp1-901 (= trp1Δ901); 1,45 kb-*EcoRI* / *EcoRI*-Deletion (-102 bis +1352) im **trp1**-Gen
TSS **Transformation Storage Solution**
Tween 20 Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
Ty **transposon yeast** (Hefe-Transposon)
Tyr **Tyrosin**

U

U **Unit** (Einheit für die enzymatische Aktivität)
u.a. **unter anderem**
UAS **Upstream Activating Sequence**
ÜN **über Nacht über Nacht**
ura3 für das **URA3**-Protein kodierendes Gen
URA3 Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase
(Biosynthese von Pyrimidin-Nucleotiden, u.a. **Uracil**)
ura3-52 Ty1-Insertion im **ura3**-Gen
(Transkription von links nach rechts, beginnend an Position 121)
ÜT **über Tag**

V

V **Valin**
V **Volt**
v/v **volume per volume** (Volumen pro Volumen)
Val **Valin**
Vav Rac-Austauschfaktor
vgl. **vergleiche**
Vol. **Volumen**

W

W **Tryptophan**
w/v **weight per volume** (Gewicht pro Volumen)
Wt **Wildtyp**

X

X beliebige Aminosäure
 X-Gal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
X. laevis *Xenopus laevis* (Krallenfrosch)

Y

Y Tyrosin
 YPD Yeast Peptone Dextrose Yeast Peptone Dextrose

Z

z.B. zum Beispiel
 Zn²⁺ Zinkion
 zzgl. zuzüglich

Der genetische Code					
1. Position (5'-Ende)	2. Position				3. Position (3'-Ende)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop (ochre)	Stop (opal)	A
	Leu	Ser	Stop (amber)	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

(entnommen aus Stryer 1979)

Einbuchstaben-Code	Dreibuchstaben-Code		Codon
		Aminosäure	
A	Ala	Alanin	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Cystein	UGC UGU
D	Asp	Aspartat (Asparaginsäure)	GAC GAU
E	Glu	Glutamat (Glutaminsäure)	GAA GAG
F	Phe	Phenylalanin	UUC UUU
G	Gly	Glycin	GGA GGC GGG GGU
H	His	Histidin	CAC CAU
I	Ile	Isoleucin	AUA AUC AUU
K	Lys	Lysin	AAA AAG
L	Leu	Leucin	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Methionin	AUG (Start)
N	Asn	Asparagin	AAC AAU
P	Pro	Prolin	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Glutamin	CAA CAG
R	Arg	Arginin	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Serin	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Threonin	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Valin	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Tryptophan	UGG
Y	Tyr	Tyrosin	UAC UAU
		Stop	UAG (ambre) UAA (ochre) UGA (opal)

Aminosäuren-Charakteristika							
Aminosäure	Formel	M _r	Masse [Da] ^{*2}	Häufigkeit [%] ^{*3}	Hydrophobizität ^{*4}	Volumen (Å ³)	pK _a ^{*5} (bei 25 °C)
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	89,1	71,0	9,0	2,1	92	
Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,2	157,2	4,7	4,2	202	12,5
Asparagin	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,1	114,1	4,4	7,0	135	
Asparaginsäure	C ₄ H ₇ NO ₄	133,1	114,0	5,5	10,0	125	3,9
Cystein	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,2	103,1	2,8	1,4	106	8,3
Glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,2	128,1	3,9	6,0	161	
Glutaminsäure	C ₅ H ₉ NO ₄	147,1	128,1	6,2	7,8	155	4,1
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	75,1	57,0	7,5	5,7	66	
Histidin	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,2	137,1	2,1	2,1	167	6,0
Isoleucin ^{*1}	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,2	113,1	4,6	-8,0	169	
Leucin ^{*1}	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,2	113,1	7,5	-9,2	168	
Lysin ^{*1}	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,2	129,1	7,0	5,7	171	10,8
Methionin ^{*1}	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,2	131,1	1,7	-4,2	117	
Phenylalanin ^{*1}	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,2	147,1	3,5	-9,2	203	
Prolin	C ₅ H ₉ NO ₂	115,1	97,1	4,6	2,1	129	
Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	105,1	87,0	7,1	6,5	99	
Threonin ^{*1}	C ₄ H ₉ NO ₃	119,1	101,1	6,0	5,2	122	
Tryptophan ^{*1}	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,2	186,2	1,1	-10,0	238	
Tyrosin	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,2	163,1	3,5	-1,9	204	10,1
Valin ^{*1}	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,2	99,1	6,9	-3,7	142	
Æ		136,9	118,84	bei Berücksichtigung der relativen Häufigkeiten = 109,45			

^{*1} essentielle Aminosäuren (unentbehrlich, nicht vom menschlichen Körper synthetisierbar); ^{*2} bezogen auf den jeweiligen Aminosäurerest, die Masse der entsprechenden Aminosäure liegt um 18 Da höher (Masse von H₂O), die Masse der jeweiligen Seitenkette ist um 56 Da niedriger (Masse einer Peptidgruppe) (Voet und Voet 1990); ^{*3} abgeschätzt aus den Zusammensetzungen von 207 nicht verwandten Proteinen (Voet und Voet 1990); ^{*4} artifizielle Einheiten; ^{*5} bezogen auf die jeweilige Seitenkette (Chothia 1984; Parker *et al.* 1986).

Restriktionsendonukleasen

<i>Aat</i> II	<i>Acetobacter aceti</i>	5′	<u>G A C G T</u> βC	3′
		3′	CŶT G C A G	5′
<i>Age</i> I	<i>Ruegeria gelatinovora</i>	5′	AβC C G G T	3′
		3′	T G G C CŶA	5′
<i>Apa</i> I	<i>Acetobacter pasteurianus</i> sub. <i>Pasteurianus</i>	5′	<u>G G G C C</u> βC	3′
		3′	CŶC C G G G	5′
<i>Bam</i> H I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5′	GβG A T C C	3′
		3′	C C T A GŶG	5′
<i>Bgl</i> I	<i>Bacillus globigii</i>	5′	G C C N <u>N N N</u> βN G G C	3′
		3′	C G G NŶN N N N C C G	5′
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	5′	AβG A T C T	3′
		3′	T C T A GŶA	5′
<i>Bsm</i> I	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5′	G A A T G C Nβ	3′
		3′	C T T A CŶG N	5′
<i>Bsr</i> G I	<i>Bacillus stearothermophilus</i> GR75	5′	T↓G T A C A	3′
		3′	A C A T GŶT	5′
<i>Bst</i> X I	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5′	C C A N <u>N N N N</u> βN T G G	3′
		3′	G G T NŶN N N N N A C C	5′
<i>Cla</i> I	<i>Caryophanon latum</i> (= <i>Bsp</i> D I)	5′	A TβC G A T	3′
		3′	T A G CŶT A	5′
<i>Eco</i> R I	<i>Escherichia coli</i> RY13	5′	GβA A T T C	3′
		3′	C T T A AŶG	5′
<i>Eco</i> R V	<i>Escherichia coli</i> (trägt das <i>Eco</i> R V-Gen des J62pLG74-Plasmids)	5′	G A TβA T C	3′
		3′	C T AŶT A G	5′
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5′	AβA G C T T	3′
		3′	T T C G AŶA	5′
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumonia</i>	5′	G G T A CβC	3′
		3′	CŶC A T G G	5′
<i>Mfe</i> I	<i>Mycoplasma fermentans</i> (= <i>Mun</i> I)	5′	CβA A T T G	3′
		3′	G T T A AŶC	5′
<i>Mlu</i> I	<i>Micrococcus luteus</i>	5′	AβC G C G T	3′
		3′	T G C G CŶA	5′

<i>Nar I</i>	<i>Nocardia argentinensis</i>	5′	G G <u>β</u> C G C C	3′
		3′	C C G C <u>γ</u> G G	5′
<i>Nde I</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	5′	C A <u>β</u> T A T G	3′
		3′	G T A T <u>γ</u> A C	5′
<i>Not I</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	5′	G C <u>β</u> G G C C G C	3′
		3′	C G C C G <u>γ</u> C G	5′
<i>Nru I</i>	<i>Nocardia rubra</i>	5′	T C G <u>β</u> C G A	3′
		3′	A G C <u>γ</u> G C T	5′
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuartii</i>	5′	C T G C A <u>β</u> G	3′
		3′	G <u>γ</u> A C G T C	5′
<i>Pvu I</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5′	C G A T <u>β</u> C G	3′
		3′	G C <u>γ</u> T A G C	5′
<i>Pvu II</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5′	C A G <u>β</u> C T G	3′
		3′	G T C <u>γ</u> G A C	5′
<i>Sac I</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5′	G A G C T <u>β</u> C	3′
		3′	C <u>γ</u> T C G A G	5′
<i>Sac II</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5′	C C G C <u>β</u> G G	3′
		3′	G G <u>γ</u> C G C C	5′
<i>Sal I</i>	<i>Streptomyces albus G</i>	5′	G <u>β</u> T C G A C	3′
		3′	C A G C T <u>γ</u> G	5′
<i>Sma I</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5′	C C C <u>β</u> G G G	3′
		3′	G G G <u>γ</u> C C C	5′
<i>Spe I</i>	<i>Sphaerotilus species</i>	5′	A <u>β</u> C T A G T	3′
		3′	T G A T C <u>γ</u> A	5′
<i>Sph I</i>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	5′	G C A T G <u>β</u> C	3′
		3′	C <u>γ</u> G T A C G	5′
<i>Ssp I</i>	<i>Sphaerotilus species</i>	5′	A A T <u>β</u> A T T	3′
		3′	T T A <u>γ</u> T A A	5′
<i>Tth111 I</i>	<i>Thermus thermophilus</i> (= <i>PflF I</i>)	5′	G A C N <u>β</u> N N G T C	3′
		3′	C T G N N <u>γ</u> N C A G	5′
<i>Xba I</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5′	T <u>β</u> C T A G A	3′
		3′	A G A T C <u>γ</u> T	5′
<i>Xho I</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	5′	C <u>β</u> T C G A G	3′
		3′	G A G C T <u>γ</u> C	5′

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Alle Lebewesen bestehen aus Zellen, wobei die einfachsten Lebensformen aus einzelnen Zellen bestehen, die kontinuierlich in unmittelbarem Kontakt zur Umgebung stehen und sich durch Zweiteilung fortpflanzen. Die Zelle kommuniziert permanent mit der Umwelt und ist fähig, auf veränderte chemische oder physikalische Reize flexibel zu reagieren und in Änderungen intrazellulärer Reaktionen umzusetzen. In prokaryontischen Einzelzellen werden als Konsequenz Gene an- und abgeschaltet sowie Enzyme aktiviert oder inaktiviert. Höhere Organismen gleichen Zellverbänden, in denen Gruppen von Zellen auf bestimmte Funktionen spezialisiert und durch komplexe Kommunikationssysteme verbunden sind. Im Zellverband der Metazoen sind die meisten Zellen gegenüber der Umwelt abgeschirmt; nur wenige spezialisierte Zellen stehen in direktem Kontakt zum umgebenden Milieu und sind für die Registrierung der Umgebungsreize verantwortlich, welche daraufhin den anderen Zellen des Zellverbandes im Rahmen einer interzellulären Kommunikation mitgeteilt werden. In der Zielzelle wird das Signal empfangen, in intrazellulären Signalketten weiterverarbeitet (Signaltransduktion) und letztlich in eine biochemische Antwort umgesetzt, die sich in Änderungen von Enzymaktivitäten oder der Genexpression äußern kann. Resultat der interzellulären Kommunikation ist die Regulation von Zellwachstum, Zellteilung, Zelldifferenzierung und des programmierten Zelltods (Apoptose). Zellen höherer Organismen besitzen ein wohl aufeinander abgestimmtes System von Proteinen, mit dem sie auf Signale von anderen Zellen antworten. Zu diesem System gehören Zelloberflächen-Rezeptoren, intrazelluläre Rezeptorproteine, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, GTP-bindende Proteine, regulierende Proteine wie Austauschfaktoren, Nucleotid-Dissoziations-Inhibitoren und GTPase-aktivierende Proteine sowie zahlreiche intrazelluläre Proteine wie Adapterproteine, mit denen diese Signalproteine wechselwirken (Boguski und McCormick 1993; Fauman und Saper 1996; Geyer und Wittinghofer 1997; Pelech 1996). Im Rahmen der interzellulären Kommunikation binden extrazelluläre Signalmoleküle an extrazelluläre Domänen transmembranaler Rezeptoren. Die aktivierten Rezeptoren leiten das Signal durch die Plasmamembran an eine Kaskade intrazellulärer Komponenten weiter, die ihrerseits aktiviert werden und das Signal dabei beispielsweise durch Amplifizierung modulieren. Die Vorstellung von linearen und hierarchisch aufgebauten Signalwegen wird zunehmend durch die eines komplexen Signalnetzwerkes ersetzt (Dhanasekaran 1998), da verschiedene Signale auf unterschiedlichen Ebenen innerhalb der Signalkaskaden integriert werden. Die funktionellen Mechanismen der intrazellulären Signal-

weiterleitung sind Protein/Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und kovalente Modifikationen von Proteinen, speziell durch reversible Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Der inter- und intrazellulären Signalverarbeitung kommt eine große medizinische Bedeutung zu, da zahlreiche Krankheiten des Menschen auf Störungen zellulärer Regulationsprozesse sowie der Signalverarbeitung beruhen. Ein prominentes Beispiel ist die Krebsentstehung, bei der die Regulationsmechanismen für Zellteilung und -differenzierung durch Akkumulation von Mutationen in verschiedenen Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen gestört sind und es so zu ungehemmtem Wachstum der Zellen kommt (Hunter 1991; Vogelstein und Kinzler 1993).

1.2 GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter

GTP-bindende Proteine sind an den verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt. So etwa bei der Signaltransduktion an Membranen, der Regulation der ribosomalen Proteinbiosynthese, der Translokation von Proteinen durch Membranen und beim Transport von Proteinen und Nucleinsäuren innerhalb der Zelle. Die GTP-bindenden Proteine werden in fünf verschiedene Superfamilien unterteilt (Bourne *et al.* 1990; Bourne *et al.* 1991):

- Translokationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3)
- G_{α} -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (G_s , G_i , G_t , G_0 , G_q)
- Ras-verwandte Proteine
- Signalerkennungspartikel (SRP) und dessen Rezeptor (SR)
- Große GTP-bindende Proteine (GBP, Mx, Dynamamin)

Regulatorische GTP-bindende Proteine kommen in einer inaktiven GDP-gebundenen oder einer aktiven GTP-gebundenen Form vor, wodurch sie eine regulative Schalterfunktion in zentralen Signaltransduktionsprozessen eukaryontischer Zellen ausüben. **Abbildung 1.1** zeigt den unidirektionalen GTPase-Zyklus am Beispiel des Ras-Proteins, dem prominentesten Vertreter der kleinen GTP-bindenden Proteine. Im Bereich der in allen GTP-bindenden Proteinen vorkommenden strukturell konservierten G-Domäne erfolgt die Bindung und Hydrolyse des Nucleotids, wobei sowohl GDP als auch GTP mit hoher Affinität von 10^7 bis 10^{11} M^{-1} gebunden werden (Bourne *et al.* 1991). Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysieren die Dissoziation des GDP von dem inaktiven Ras•GDP-Komplex und stabilisieren den nucleotidfreien Zustand des Ras-Proteins. Dadurch kann das im Vergleich zu GDP in einer ca. 10-fach höheren intrazellulären Konzentration vorliegende GTP an den nucleotidfreien GTPase/GEF-Komplex binden und Ras in die aktive GTP-gebundene Form überführen. Ohne Austauschfaktoren liefere der Austausch von GDP gegen GTP nur sehr langsam ab, so daß den

GEFs die Funktion eines positiven Regulators für Ras zukommt (Lenzen *et al.* 1998). In der nun aktiven GTP-gebundenen Form kann Ras das Signal durch Interaktion mit nachgeschalteten Effektor-Molekülen weiterleiten (Wittinghofer und Herrmann 1995). Die relativ langsame intrinsische GTPase-Aktivität des Ras-Proteins bewirkt die hydrolytische Abspaltung des γ -Phosphates des gebundenen GTPs, wodurch Ras wieder in die inaktive GDP-gebundene Form überführt und die Signalweiterleitung so terminiert wird (Wittinghofer 1998; Wittinghofer und Pai 1991). Die Interaktion mit einem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) als weiteren modulierenden Faktor beschleunigt die normalerweise langsam ablaufende GTP-Hydrolyse durch die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras (Trahey und McCormick 1987) *in vitro* um das 10^5 fache (Gideon *et al.* 1992), wodurch die Lebensdauer der signalübertragenden Form stark verkürzt wird. Somit kommt den GAPs die Funktion eines negativen Regulators für Ras zu.

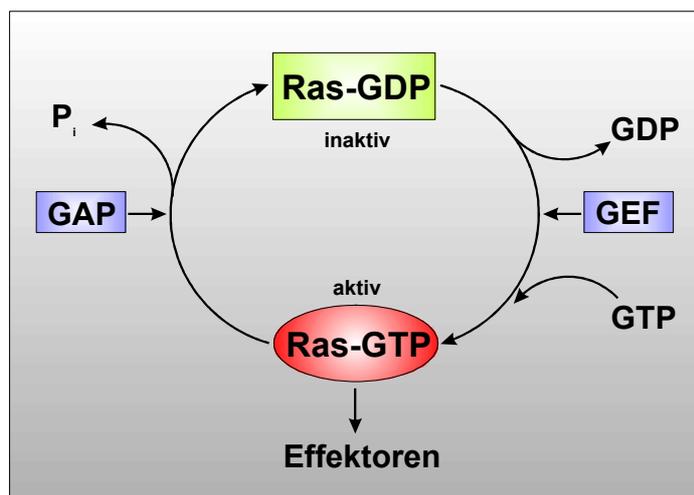


Abbildung 1.1 Schalterfunktion regulatorischer GTP-bindender Proteine

Im GDP-gebundenen Zustand ist das GTP-bindende Protein inaktiv; in der GTP-gebundenen Form ist es aktiv und es erfolgt eine Signalweiterleitung durch die Interaktion mit Effektoren. Der unidirektionale GTPase-Zyklus wird durch Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert.

1.3 Die Ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie GTP-bindender Proteine umfaßt sämtliche Ras-verwandten Proteine, die aufgrund ihres Molekulargewichtes von 20 kDa bis 35 kDa auch als „kleine GTPasen“ bezeichnet werden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen sowie der zellulären Funktionen der Proteine erlaubt eine Unterteilung der Ras-Superfamilie in mittlerweile acht Subfamilien (Abbildung 1.2).

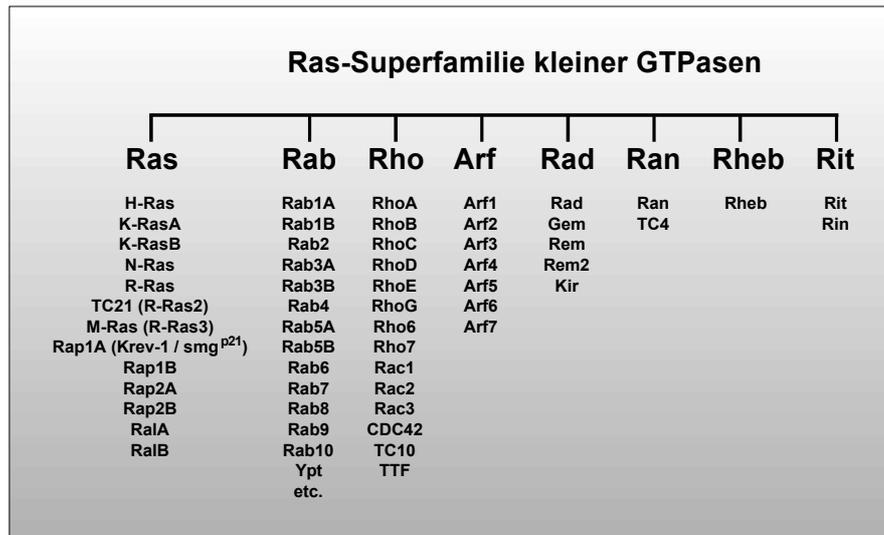


Abbildung 1.2 Die acht Subfamilien der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen

(Verändert nach Boguski und McCormick 1993; Clark *et al.* 1997b; Herrmann und Nassar 1996; Lee *et al.* 1996; Yee und Worley 1997).

- **Ras** (*Rat sarcoma*)-Proteine besitzen wichtige Funktionen bei der Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Harvey 1964; Kawata *et al.* 1988; Kimmelman *et al.* 1997; Kirsten und Mayer 1967; Kitayama *et al.* 1989; Matsumoto *et al.* 1997; Ohmori *et al.* 1989; Pizon *et al.* 1988; Scolnick *et al.* 1979).
- **Rab** (*Ras-like proteins from rat brain*)-Proteine sind in den vesikulären Transport involviert (Brennwald und Novick 1993; Pfeffer 1992; Schimmöller *et al.* 1997; Simons und Zerial 1993).
- **Rho** (**R**as **h**omology)-Proteine sind hauptsächlich an der Reorganisation des Cytoskelettes beteiligt, haben jedoch auch Funktionen bei der Regulation der Genexpression und der Kontrolle des Zellwachstums (Mackay und Hall 1998; Ridley und Hall 1992; Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997).
- **Arf** (*ADP ribosylation factor*)-Proteine sind für die Vesikelbildung und die Regulation des Vesikeltransportes vom ER zum Golgi-Apparat verantwortlich (Donaldson und Klausner 1994; Moss und Vaughan 1998; Palmer *et al.* 1993).
- **Rad** (*Ras associated with diabetes*)-Proteine wurden in Muskelzellen von Diabeteskranken gefunden; ihre Funktion ist noch nicht geklärt (Bilan *et al.* 1998; Garvey *et al.* 1997; Reynet und Kahn 1993).
- **Ran** (*Ras related nuclear proteins*)-Proteine sind maßgeblich am Kerntransport beteiligt (Drivas *et al.* 1990; Moore 1998).
- **Rheb** (*Ras homolog enriched in brain*)-Proteine sind Antagonisten des Ras-Signalweges (Clark *et al.* 1997b; Yee und Worley 1997).

- **Rit** (*Ras-like protein in tissue*)-Proteine binden an Calmodulin und sind wahrscheinlich an der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion beteiligt (Lee *et al.* 1996).

Sämtliche Mitglieder der Ras-Superfamilie verfügen über eine Konsensussequenz innerhalb der ca. 160 Aminosäuren umfassenden G-Domäne, welche die Bindung des GDP bzw. GTP und die GTPase-Aktivität vermittelt. In der **Tabelle 1.1** sind die konservierten Sequenzmotive der G-Domäne zusammengefaßt (Valencia *et al.* 1991). Die verschiedenen Motive sind an der Bindung des Phosphats und des Mg^{2+} (PM1 bis PM3) oder an Wechselwirkungen mit der Guanin-Base (G1 bis G3) beteiligt (vgl. auch **Abbildung 1.4**).

Motiv	Name	Konsensussequenz	Wechselwirkung mit
PM1	<i>p-loop</i>	GxxxxGK(S/T)	Phosphatteil
G1		F/Y	Guanin-Base
PM2	<i>switch I</i> , Effektor-Region	T	Mg^{2+} und γ -Phosphat (GTP)
PM3	<i>switch II</i>	DxxG	Mg^{2+} und γ -Phosphat (GTP)
G2		(N/T)(K/Q)xD	Guanin-Base
G3		SA(K/L)	Guanin-Base

Tabelle 1 **Konservierte Sequenzen innerhalb der G-Domäne von GTPasen der Ras-Superfamilie**

PM = Phosphat- und Mg^{2+} -Bindungsmotiv; G = Guanin-Bindungsmotiv; Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben, x = beliebige Aminosäure.

Mit Ausnahme der Ran- und Rad-Proteine werden alle Mitglieder der Ras-Superfamilie durch kovalente Bindung hydrophober Gruppen an spezifische Aminosäuren der jeweiligen GTPase posttranslational modifiziert. Dazu werden Myristinsäure-, Palmitinsäure-, C_{15} -Farnesyl-, oder C_{20} -Geranylgeranylreste durch spezifische Transferasen mit der GTPase verknüpft. Die Lipidmodifikationen vermitteln die Membranlokalisation der Proteine und sind daher für ihre biologische Funktion essentiell (Brown und Goldstein 1993). Arf-Proteine werden an ihrem N-Terminus myristoyliert, wobei die Myristinsäure (n-Tetradecansäure) in einer stabilen Säureamidbindung an die Aminogruppe des N-terminalen Glycinrestes angehängt ist (Kahn *et al.* 1988). Die Konsensussequenz für die Myristoylierung ist MGxxxS/T (x = beliebige Aminosäure), wobei die auf das Glycin folgende Aminosäure oft Cystein ist (Resh 1996). Die Modifizierung der Ras- und Rheb-Proteine in Form einer Farnesylierung und die Geranylgeranylierung der Rho- und Rit-Proteine erfolgt durch Isoprenylierung eines C-terminalen Cysteinrestes unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung. Als Signal für die posttranslationale Isoprenylierung fungiert das C-terminal lokalisierte CaaX-Motiv (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure) (Bourne *et al.* 1991),

wobei die letzte Aminosäure (X) die Art der Isoprenylierung determiniert (Goldstein *et al.* 1991; Marshall 1993; Moores *et al.* 1991; Reiss *et al.* 1991; Seabra *et al.* 1991; Yokoyama *et al.* 1991). Liegt ein Methionin oder Serin vor, so fungiert das Protein als Substrat der Farnesyltransferase (FTase); ein Leucin bewirkt eine Modifizierung durch die Geranylgeranyltransferase I (GGTase I). Im Fall der Ras- und Rho-Proteine werden nach erfolgter Modifizierung des Cysteins die drei C-terminalen Aminosäuren (aaX) proteolytisch abgespalten und die Carboxylgruppe des isoprenylierten Cysteins methyliert (Gutierrez *et al.* 1989; Hancock *et al.* 1991a). Häufig werden Proteine mehrfach posttranslational modifiziert. So erfolgt beispielsweise bei H-Ras und N-Ras nach der Farnesylierung zusätzlich eine Palmytylierung zweier N-terminal des CaaX-Motivs gelegener Cysteine (Hancock *et al.* 1989; Hancock *et al.* 1990; Hancock *et al.* 1991b). Dies ist für eine stabile Insertion des Proteins in der Membran essentiell (Choy *et al.* 1999; Magee und Marshall 1999; Völkert *et al.* 2001). **Abbildung 1.3** zeigt exemplarisch die posttranslationale Modifizierung von H-Ras.

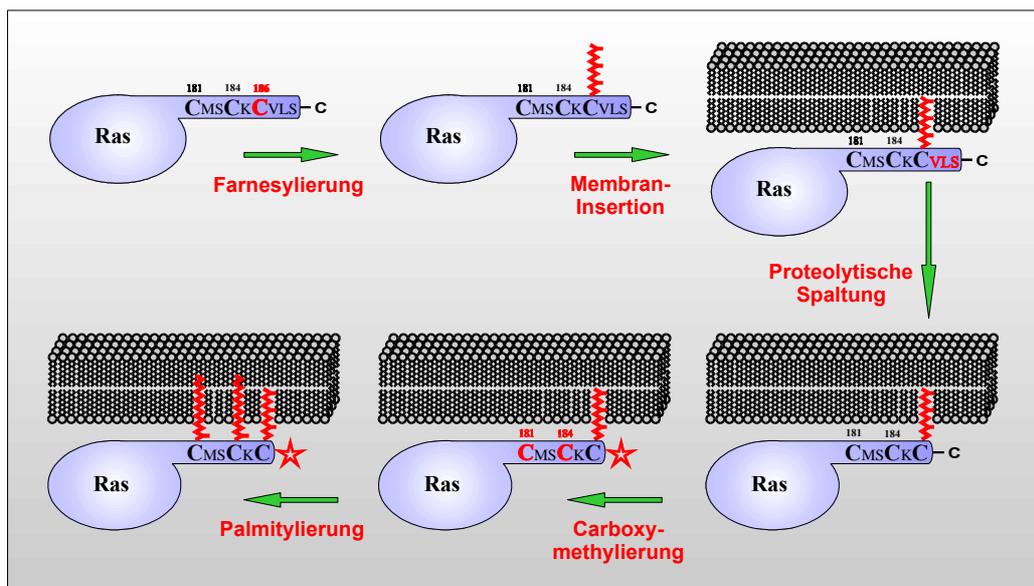


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifizierungen von H-Ras (Nähere Erläuterungen im Text).

Die Thioesterbindung des Palmitinsäure-Ankers ist weniger stabil als die Säureamidbindung des Myristin-Ankers und hat deshalb einen dynamischen, reversiblen Charakter, wodurch die Regulierbarkeit der Membranverankerung ermöglicht wird. Das K-Ras-Protein wird nicht palmytyliert; eine zusätzliche Verankerung mit der Membran erfolgt hier durch elektrostatische Wechselwirkungen einer C-terminalen, polybasischen Sequenz aus Lysinen mit negativ geladenen Kopfgruppen von Phospholipiden.

1.4 Signalübertragung durch Ras-Proteine

Das Ras-Protein ist das am besten untersuchte Mitglied der Ras-Superfamilie. Das erste ras-Gen wurde als Onkogen des Harvey-Sarcom-Retrovirus der Ratte identifiziert, welches dort Tumore vom Sarcomtyp auslöst (Ellis *et al.* 1981) und wird entsprechend als H-ras bezeichnet. Mittlerweile sind für Säugetiere fünf verschiedene ras-Gene bekannt (H-ras, K-ras, N-ras, R-ras und M-ras; vgl. **Abbildung 1.6**), die untereinander eine hohe Homologie aufweisen und aufgrund ihres Molekulargewichtes von 21 kDa auch als p21^{ras} bezeichnet werden. Ras-Gene werden ubiquitär exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Signalen für Wachstum, Teilung und Differenzierung normaler und transformierter Zellen (Bos 1997; Macara *et al.* 1996; Wiesmüller und Wittinghofer 1994). Die besondere Bedeutung des Ras-Proteins als Signalmolekül kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß in etwa 30 % aller menschlichen Tumore eine Mutation in einem der ras-Gene zu finden ist (Barbacid 1987; Bos 1988; Bos 1989; Grand und Owen 1991; Lowy und Willumsen 1993). Für das H-Ras-Protein existieren die meisten strukturellen, biochemischen und funktionellen Daten. Aufgrund der hohen Homologien innerhalb der Ras-Subfamilie kann angenommen werden, daß sich grundlegende Erkenntnisse über Struktur und Funktion des H-Ras-Proteins auf andere Vertreter dieser Familie übertragen lassen. Nachfolgend wird der Einfachheit halber das H-Ras-Protein als Ras bezeichnet.

Die dreidimensionale Struktur des Ras-Proteins in der GDP- und GTP-gebundenen Form wurde mittels Röntgen-Kristallstrukturanalyse bestimmt (Milburn *et al.* 1990; Pai *et al.* 1989; Tong *et al.* 1989). **Abbildung 1.4** zeigt die Tertiärstruktur von H-Ras₍₁₋₁₆₆₎ komplexiert mit dem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen GppNHp (γ -Imido-GTP) (Pai *et al.* 1989). Die etwa 160 Aminosäuren umfassende katalytische G-Domäne, bestehend aus fünf Helices und einem zentralen sechssträngigen β -Faltblatt, weist zwei Regionen auf, deren Konformationen sich zwischen der GDP- und der GTP-gebundenen Form des Proteins unterscheiden (Milburn *et al.* 1990; Schlichting *et al.* 1990; Wittinghofer und Pai 1991). Diese Regionen werden daher als *switch I* und *switch II* bezeichnet. Jene die Aminosäuren 30 bis 37 umfassende *switch I*-Region beginnt im *loop 2* und reicht bis in das β_2 -Faltblatt hinein. Dabei überlappt sie mit der Effektor-Region, bestehend aus den Aminosäuren 32 bis 40, welche an der Bindung von Ras-Effektoren beteiligt ist. Die *switch II*-Region besteht aus den Aminosäuren 60 bis 76 und umfaßt den *loop 4* und die α_2 -Helix. Ein weiteres für die Schalterfunktion des Ras-Proteins bedeutendes Strukturelement ist der auch als *p-loop* bezeichnete *loop 1*, welcher die Aminosäuren 10 bis 17 umfaßt.

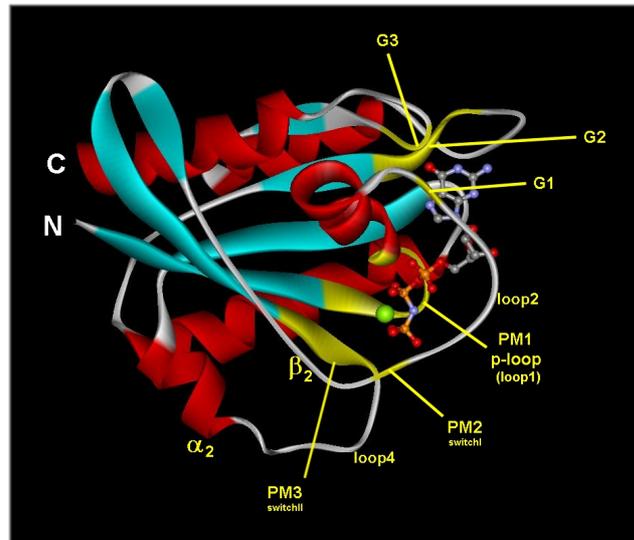


Abbildung 1.4 Tertiärstruktur von Ras₍₁₋₁₆₆₎-GppNHp

Das gebundene Nucleotid und das Mg²⁺-Ion sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Bezeichnungen der Sequenzmotive entsprechen Tabelle 1 und sind gelb hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt (verändert nach Pai *et al.* 1990).

Alle ras-Protoonkogene können durch Mutationen zu Onkogenen aktiviert werden; onkogenes Ras verursacht ein konstitutives Wachstumssignal, das über Effektor-Proteine weitergeleitet zur Transformation von Säugerzellen führt (Hall 1990). Substitutionen des Glycins 12 durch jede beliebige andere Aminosäure, mit Ausnahme von Prolin, und Mutationen in den für Glycin 13 und Glutamin 61 kodierenden Triplets, führen zu einer Erhöhung des tumorauslösenden Potentials (Barbacid 1987; Bos 1989; Reddy *et al.* 1982; Tabin *et al.* 1982). So ist das Glycin 12 die in K-Ras am häufigsten durch Punktmutationen des entsprechenden Triplets veränderte Aminosäure menschlicher Tumorzellen. Alle genannten Aminosäuren mit tumorauslösendem Potential sind in stark konservierten Sequenzmotiven der G-Domäne, im *p-loop* und der *switch II*-Region, lokalisiert (vgl. **Tabelle 1**). Die Onkogenität der Mutationen ist durch den Verlust der GTPase-Aktivierung begründet, dessen Mechanismus durch die Aufklärung der Struktur von Ras im Komplex mit der GTPase-aktivierenden Domäne von p120^{GAP} (GAP-334) in Anwesenheit von Aluminiumfluorid gezeigt werden konnte (Scheffzek *et al.* 1997). Die simultane Bindung von Aluminiumfluorid und GDP imitiert dabei den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse. Die Peptidkette von Ras im Bereich des Glycins 12 ist in räumlicher Nähe zur Seitenkette des auch als „Argininfinger“ bezeichneten Arginins 789 von GAP-334 positioniert. Eine Aminosäure-Substitution in Position 12 von Ras bewirkt eine sterische Hinderung des für die Ausbildung des Übergangszustandes der GTP-Hydrolyse essentiellen Arginins 789. Somit inhibiert eine Mutation des Glycins 12 die

GAP-katalysierte GTP-Hydrolyse (Adari *et al.* 1988; Gideon *et al.* 1992; Trahey und McCormick 1987). Das in der *switch II*-Region lokalisierte Glutamin 61 ist ebenfalls in die Katalyse involviert, indem es den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse stabilisiert (Bourne *et al.* 1991; Mittal *et al.* 1996), weshalb eine Mutation dieser Aminosäure ebenfalls zu einer Steigerung des onkogenen Potentials des Ras-Proteins führt.

1.4.1 Ras-Effektoren

Ras-Effektoren sind definitionsgemäß Proteine, die spezifisch an die aktivierte, GTP-gebundene Form von Ras binden. Die Interaktion der verschiedenen Effektor-Moleküle mit der Ras-Effektor-Region führt dabei zu deren Aktivierung und des weiteren zur Übertragung des empfangenen Signals auf weitere nachgeschaltete Moleküle des jeweiligen Signaltransduktionsweges (Marshall 1996b; Marshall 1995b; McCormick und Wittinghofer 1996). Der prominenteste und am besten charakterisierte Ras-Effektor ist die Serin/Threonin-Kinase c-Raf 1. Weitere bekannte Ras-Effektoren sind die Raf-Isoformen A-Raf und B-Raf, sowie die p110-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die Proteinkinase C ζ (PKC ζ), das GTPase-aktivierende Protein für Ras (RasGAP), der Ral-Guanosinnucleotid-Austauschfaktor (RalGEF), MEKK, AF6, Rin1 und Nore1. Die Ras-Effektoren und deren nachgeschaltete Signalwege sind in **Abbildung 1.5** dargestellt, wobei diese unterschiedliche zelluläre Antworten auf die Ras-Aktivierung bewirken.

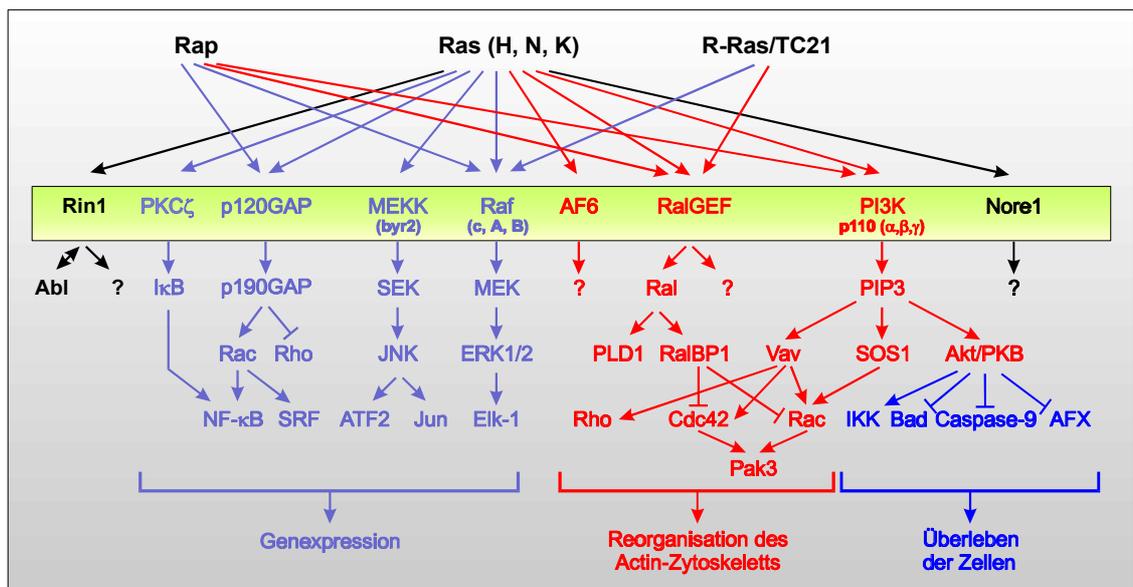


Abbildung 1.5 Interaktion von Ras (H-, N-, K-), Rap und R-Ras/TC21 mit verschiedenen Effektoren und deren nachgeschalteten Signalwegen

(Verändert nach Herrmann und Nassar 1996; King *et al.* 1998; Marshall 1996b; Marshall 1995b; Rebollo und Martinez 1999; Shields *et al.* 2000; Sun *et al.* 2000; Li *et al.* 2001; Vojtek und Der 1998; Wittinghofer und Herrmann 1995; Corbett und Alber 2002).

Die **Abbildung 1.5** macht dies weiterhin deutlich, daß nicht nur Ras selbst, sondern auch andere Mitglieder der Ras-Subfamilie (vgl. **Abbildung 1.2**), wie Rap oder R-Ras, an die Ras-Effektoren binden. Diese Promiskuität ist, wie die **Abbildung 1.6** verdeutlicht, dadurch zu erklären, daß die Kerneffektor-Region, welche für die Interaktion mit den Effektoren verantwortlich ist, unter den Mitgliedern der Ras-Subfamilie stark konserviert ist. Beiderseits der hochkonservierten Kerneffektor-Region sind jedoch Bereiche lokalisiert, von denen angenommen wird, daß sie für die Spezifität und die Modulation der Affinität für verschiedenen Effektoren verantwortlich sind (Herrmann und Nassar 1996; Nassar *et al.* 1996). Deshalb wird dieser Bereich auch als Aktivierungs-Region bezeichnet.

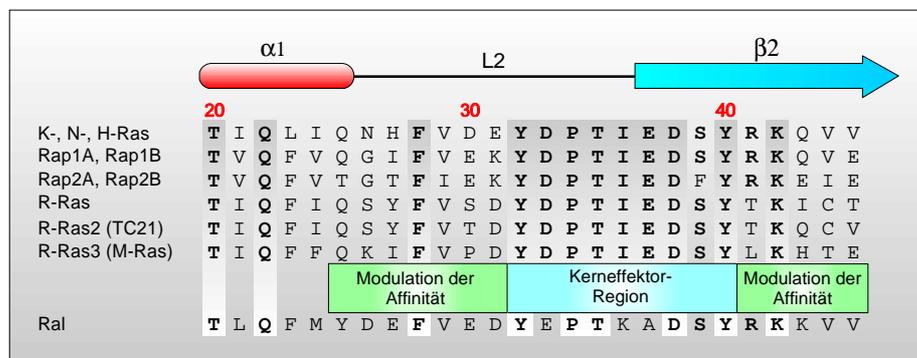


Abbildung 1.6 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mitgliedern der Ras-Subfamilie (Verändert nach Herrmann und Nassar 1996); nähere Erläuterungen im Text.

An dieser Stelle soll auf die starke Homologie zwischen Ras- und Rap-Proteinen (speziell von H-Ras und Rap1A) hingewiesen werden, da dies an anderer Stelle von Bedeutung sein wird (Bos 1998; Zwartkruis und Bos 1999). Bei der Suche nach Ras-verwandten GTPasen stieß man 1988 bei dem *screening* einer humanen cDNA-Bank aufgrund ihrer starken Sequenz-Homologie zu Ras auf die Rap-Proteine (Pizon *et al.* 1988). Rap1A ist dabei u.a. durch seine Fähigkeit zur Suppression des durch onkogenes Ras induzierten, transformierten Phänotyps charakterisiert, weshalb es auch als Krev-1 bezeichnet wird (Kitayama *et al.* 1989; Sakoda *et al.* 1992). Die Ras-supprimierende Wirkung von Krev-1/Rap1A wurde zunächst als die hauptsächliche Funktion dieses Proteins angenommen. Als möglicher Mechanismus wurde diskutiert, daß Rap die als Ras-Effektor fungierende Raf-Kinase in einem inaktiven Zustand hält. Da Krev-1/Rap1A eine deutlich stärkere Affinität zu RasGAP zeigt als Ras selbst, wurde vermutet, daß Rap die Ras-Funktion inhibiert, indem das als Ras-Effektor fungierende RasGAP präferentiell an Rap bindet (Frech *et al.* 1990; Hata *et al.* 1990). Die Blockierung der Inaktivierung von Ras durch fehlendes RasGAP sollte bei genauerer Überlegung jedoch eher zur Aktivierung von Ras führen. Andere Experimentatoren identifizierten (in Analogie zu

Ras/c-Raf 1) B-Raf als einen weiteren Rap-Effektor (Ohtsuka *et al.* 1996; Vossler *et al.* 1997). Dies wird jedoch, wie auch die beschriebene „Suppressor-Theorie“, kontrovers diskutiert. Ferner konnten verschiedene auch als Ras-Effektoren fungierende RalGEFs (RalGDS, Rgl, Rlf) sowie weitere Proteine als Rap-Effektoren charakterisiert werden (Bos *et al.* 2001; Kishida *et al.* 1997; Wolthuis *et al.* 1996; Zwartkruis *et al.* 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß eine intrazelluläre Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einem Anstieg der intrazellulären Rap1B•GTP-Konzentration und damit zur Aktivierung von Rap1B führt (Altschuler *et al.* 1995). Dabei wird dieser Effekt nicht durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A, sondern durch den cAMP-regulierten Rap-Austauschfaktor Epac vermittelt (de Rooij *et al.* 1998; Kawasaki *et al.* 1998). Die Proteinkinase A ist anderen Autoren zufolge jedoch an der Phosphorylierung von Rap bzw. Smg^{p21} beteiligt, wobei für Rap1A bzw. Rap1B das jeweils C-terminal lokalisierte Serin 180 bzw. Serin 179 als Substrat identifiziert wurde (Altschuler und Lapetina 1993; Hata *et al.* 1991; Hoshijima *et al.* 1988; Hu *et al.* 1999; Itoh *et al.* 1991; Kawata *et al.* 1989; Lerosey *et al.* 1991; Siess *et al.* 1990); vgl. auch **Abbildung 3.16**. Die Phosphorylierung soll Einfluß auf die Prozessierung bzw. Membranlokalisation (Altschuler und Lapetina 1993) oder auf die Interaktion mit anderen Proteinen, speziell der Raf-Kinase, haben (Hu *et al.* 1999). Auch für H-Ras bzw. K-Ras konnten Phosphorylierungen der Serine 177 bzw. 181 durch PKA und PKC festgestellt werden (Ballester *et al.* 1987; Jeng *et al.* 1987; Saikumar *et al.* 1988).

Der hohe Grad der Sequenz-Homologie zwischen Ras- und Rap-Proteinen, welcher bezogen auf deren vollständige Länge etwa 50 % und innerhalb der Kerneffektor-Region sogar 100 % beträgt, warf die Frage nach den für die jeweilige spezifische Funktion der beiden Proteine relevanten Aminosäuren auf. Zu diesem Zweck wurden weltweit in zahlreichen Arbeitsgruppen sowohl chimäre Ras/Rap-Proteine (Maruta *et al.* 1991; Zhang *et al.* 1990; Zhang *et al.* 1991) als auch Ras-Proteine mit Rap-homologen Aminosäure-Austausche unterschiedlicher Anzahl und Kombination untersucht (Marshall *et al.* 1991; Nur-E-Kamal *et al.* 1992; Shirouzu *et al.* 1992). Quintessenz dieser Untersuchungen ist, daß die identische Kerneffektor-Region für die molekulare GTPase/Effektor-Erkennung verantwortlich ist, während Aminosäurereste außerhalb dieser Region für die Spezifität dieser Interaktion relevant sind. Untersuchungen an einem Rap-Protein mit Aminosäure-Substitutionen zu Ras in den Positionen 30 und 31 (RapE30D/K31E) haben gezeigt, daß die zwischen Ras und Rap divergierenden Aminosäuren der Position 31 aufgrund ihrer entgegengesetzten Ladungen eine der Hauptdeterminanten für die Spezifität der Interaktion darstellen (Nassar *et al.* 1996; Shirouzu *et al.* 1992).

1.4.2 Die MAPK-Kaskade

Die Aktivierung des Ras-Proteins kann durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), durch Rezeptoren mit assoziierter Tyrosin-Kinase und durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgen. Einer der prominentesten und am besten charakterisierten Signalübertragungswege durch Ras ist die in der **Abbildung 1.7** schematisch dargestellte Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, die auch als MAPK-Kaskade bezeichnet wird.

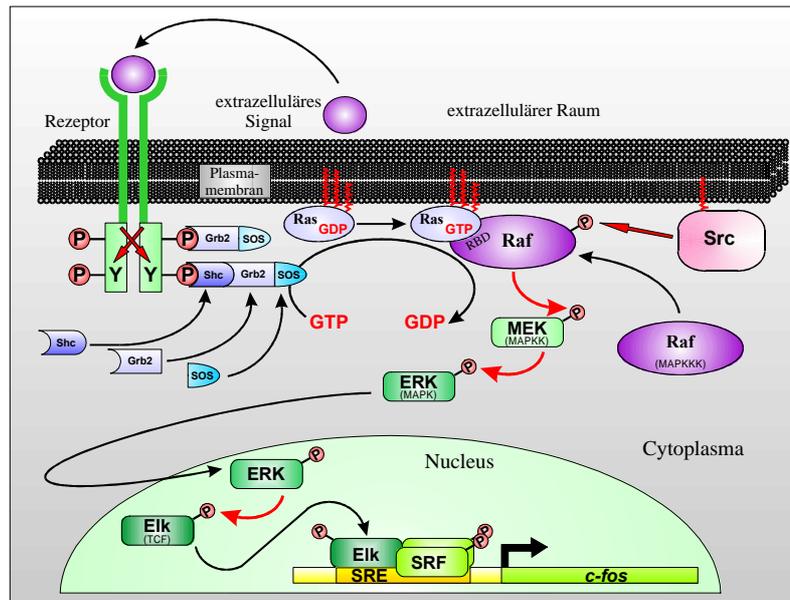


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade (Verändert nach Vojtek und Der 1998); nähere Erläuterungen im Text.

Die Bindung eines extrazellulären Signals, wie beispielsweise EGF, an die adäquate Rezeptor-Tyrosin-Kinase induziert deren Dimerisierung und resultiert in der Transphosphorylierung cytoplasmatischer Tyrosinreste. Nach Überwindung der Plasmamembran wird das Signal durch den nun aktivierten Rezeptor über eine Kaskade verschiedener Proteine durch deren sukzessive Phosphorylierung vom Cytoplasma zu Transkriptionsfaktoren im Zellkern weitergeleitet. Zunächst binden Adapterproteine wie Grb2, Shc, Ash, Nck oder Crk über ihre SH2-Domänen an das phosphorylierte Tyrosin und angrenzende Bereiche des Rezeptors (Moran *et al.* 1990; Gale *et al.* 1993; Pawson *et al.* 1993; Rozakis-Adcock *et al.* 1993). Diese Adapterproteine binden dann ihrerseits über SH3-Domänen an prolinreiche Regionen der Austauschfaktoren als regulatorische Proteine (Ren *et al.* 1993). In Säugern konnten mSOS und mCdc25 als Austauschfaktoren identifiziert werden (Boguski und McCormick 1993; Egan *et al.* 1993; Li *et al.* 1993; Tanaka *et al.* 1991). Die Austauschfaktoren binden Ras und stellen so die Verbindung zwischen aktiviertem Rezeptor und membranständigem Ras her

(Buday und Downward 1993; Egan *et al.* 1993; Gale *et al.* 1993; Li *et al.* 1993). Daraufhin beschleunigen sie den sonst nur sehr langsam ablaufenden Austausch von GDP gegen GTP durch Stabilisierung des nucleotidfreien Zustandes von Ras (Lenzen *et al.* 1998). In der aktivierten GTP-gebundenen Form interagiert Ras mit nachgeschalteten Effektor-Molekülen, wie beispielsweise der Raf-Kinase im Fall der MAPK-Kaskade, die ihrerseits aktiviert werden. Die MAPK-Kaskade ist eine Signalkette von sequentiell hintereinander geschalteten Proteinkinasen. Die aktivierte Raf-Kinase, auch als MAPKKK bezeichnet, phosphoryliert und aktiviert die dual-spezifische Kinase MEK, eine MAPKK. MEK wiederum aktiviert durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten ERK, die als MAPK fungiert (Ahn *et al.* 1992; Crews *et al.* 1992; Crews und Erikson 1993; Dent *et al.* 1992; Howe *et al.* 1992; Kyriakis *et al.* 1992; Moodie *et al.* 1993; Zwerger und Hirt 2001). Die aktivierte ERK gelangt in den Zellkern, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Elk, Fos, Jun und Myc durch Phosphorylierung aktiviert. Durch die geregelte Aktivierung der Transkription bestimmter Gene wird die Proliferation und Differenzierung der Zelle gesteuert.

Dieser hier vereinfacht linear dargestellte Signaltransduktionsweg stellt sich in der Zelle wesentlich komplexer dar. Auf allen Ebenen der Kaskade greifen anderer Faktoren regulierend ein und parallele Signalwege werden miteinander verknüpft (*crossstalk*; Hunter 1997; Salmeron *et al.* 1996; Treisman 1996). So gibt es beispielsweise eine Verbindung zwischen dem Raf/ERK- und dem PI3K/Akt-Signalweg. Die Akt-Kinase phosphoryliert und inaktiviert Raf und reguliert auf diese Weise ebenfalls die MAPK-Kaskade (Rommel *et al.* 1997; Rommel *et al.* 1999; Zimmermann und Moelling 1999). Durch diesen *crossstalk* der beiden Signalwege können divergierende biologische Effekte über die Aktivierung von Ras erzielt werden (Jun *et al.* 1999).

1.5 Die Raf-Kinase

Das erste als Ras-Effektor identifizierte Protein ist die Raf-Kinase, welche spezifisch an Ras•GTP bindet (Koide *et al.* 1993; Moodie *et al.* 1993; Van Aelst *et al.* 1993; Vojtek *et al.* 1993; Warne *et al.* 1993; Wittinghofer und Nassar 1996; Zhang *et al.* 1993). Das Raf-kodierende Gen wurde zunächst als Onkogen in transformierenden 3611-Maussarkom-Retroviren identifiziert (*v-raf*) (Rapp *et al.* 1983b). Von seinem zellulären Homolog, dem Protoonkogen *c-raf*, unterscheidet sich das virale Protein dadurch, daß ein für 200 bis 300 Aminosäuren kodierender Abschnitt des N-Terminus durch eine virale gag-Sequenz substituiert ist (Rapp *et al.* 1983a; Schultz *et al.* 1985). Da der N-Terminus für die Regulation der Kinaseaktivität

von c-Raf-1 essentiell ist, führt dessen Deletion zum Verlust der Autoinhibition der Kinaseaktivität und resultiert in einer konstitutiven Aktivität des Enzyms (Heidecker *et al.* 1990; Stanton *et al.* 1989). Außerdem vermittelt die virale gag-Sequenz die Myristoylierung der Kinase-Domäne der Raf-Kinase und bewirkt damit deren (Ras-unabhängige) Membranlokalisation.

Raf-Proteine spielen in der MAPK-Kaskade eine zentrale Rolle und sind sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten essentiell für Wachstum und Entwicklung (Avruch *et al.* 1994; Daum *et al.* 1994; Rapp *et al.* 1988). Die Raf-Kinasen sind gleich den verschiedenen Ras-Proteinen evolutiv stark konserviert, wobei in Invertebraten wie *C. elegans* und *D. melanogaster* jeweils nur ein Raf-Protein exprimiert wird (Dickson und Hafen 1994). In Säugerzellen konnten jedoch drei verschiedene Raf-Isoformen identifiziert werden, nämlich das ubiquitär exprimierte c-Raf und das präferentiell nur in bestimmten Gewebetypen exprimierte A-Raf- und B-Raf-Protein (Storm *et al.* 1990). Sie werden durch drei funktionelle raf-Gene kodiert, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Naumann *et al.* 1996). Alle drei Raf-Isoformen zeigen in bezug auf ihre Aminosäuresequenz einen hohen Grad an Homologie, werden aber unterschiedlich reguliert und üben verschiedenen Funktionen aus (Antonelli *et al.* 2000; Bosch *et al.* 1997; Hagemann und Rapp 1999; Kolch 2001; Marais *et al.* 1997; Mason *et al.* 1999; Ohtsuka *et al.* 1996; Okada *et al.* 1996; Papin *et al.* 1998; Vossler *et al.* 1997; York *et al.* 1998). Das Genprodukt des 3,4 kb großen c-raf 1-Gens, welches Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist, kodiert für die Serin/Threonin-spezifische Kinase c-Raf 1, bestehend aus 648 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 74 kDa.

1.5.1 Domänenstruktur der Raf-Kinase

Sämtliche Raf-Proteine zeigen eine vergleichbare Struktur und besitzen drei hoch konservierte, als CR1, CR2 und CR3 bezeichnete Regionen (Rapp *et al.* 1988). Die Domänenstruktur dieser Kinasen ist in **Abbildung 1.8** anhand der c-Raf-Kinase exemplarisch dargestellt.

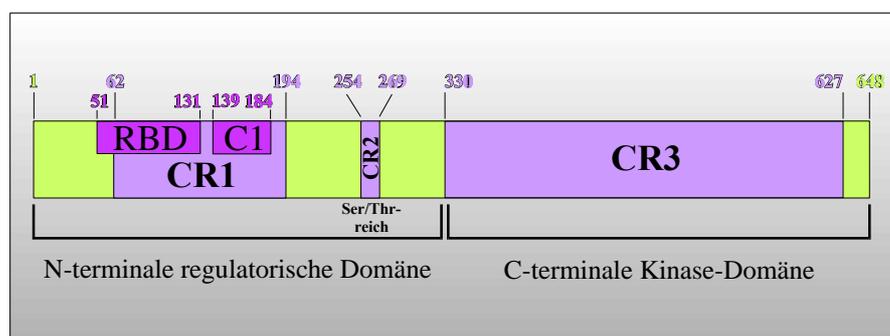


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung der Domänenstruktur der c-Raf-Kinase
 CR = conserved region, RBD = ras binding domain, C1 = protein kinase C homology 1.

Raf-Proteine können strukturell in zwei funktionelle Regionen unterteilt werden. Die N-terminale Domäne umfaßt die Regionen CR1 (Aminosäuren 62 bis 194) und CR2 (Aminosäuren 251 bis 269), welche eine regulatorische Funktion besitzen (Bruder *et al.* 1992; Heidecker *et al.* 1990). Die C-terminale Kinase-Domäne entspricht etwa der CR3-Region (Aminosäuren 330 bis 627) und erfüllt die katalytische Funktion des Enzyms, wobei sie sowohl ATP als auch das Substrat bindet (Daum *et al.* 1994; Goldsmith und Cobb 1994).

Die CR1-Region umfaßt zwei Domänen, die als Raf RBD bezeichnete Ras-bindende Domäne (Aminosäuren 51 bis 131) (Vojtek *et al.* 1993; Warne *et al.* 1993; Zhang *et al.* 1993) und die cysteinreiche, Zink-bindende Raf C1-Domäne (Aminosäuren 139 bis 184) (Ishikawa *et al.* 1988). Die Terminologie C1 beruht auf der Homologie dieser Region zur Proteinkinase C (Hurley *et al.* 1997). In der Literatur findet sich aber auch die Bezeichnung CRD für *cystein rich domain* (Morrison *et al.* 1988) und CRR für *cystein rich region* (Hu *et al.* 1995). Aufgrund der Ähnlichkeit der C1-Domäne zu DNA-bindenden Zinkfinger-Motiven von Transkriptionsfaktoren wie etwa TFIIIA wird diese auch als „Zinkfinger“ bezeichnet (Luo *et al.* 1997).

Die CR2-Region ist reich an Serin- und Threoninresten, von denen einige regulatorische Phosphorylierungsstellen darstellen, welche die Aktivierung der Kinase beeinflussen (Daum *et al.* 1994; Morrison *et al.* 1988). Die N-terminale Domäne hat eine autoinhibitorische Funktion auf die Kinaseaktivität, wobei angenommen wird, daß diese regulatorische Region die Kinase in einer inaktiven Konformation hält.

1.5.2 Interaktion zwischen c-Raf und Ras

Die Signalübertragung von Ras auf Raf basiert auf einer spezifischen Interaktion der beiden Proteine. Durch Untersuchungen der Ras/Raf-Bindung mittels Two-Hybrid-System konnte eine minimale Ras-Bindungsdomäne (Raf RBD) identifiziert werden (Vojtek *et al.* 1993). Die aus 80 Aminosäuren bestehende RBD ist eine kompakt gefaltete Domäne und ist in seiner Struktur der des Ubiquitin ähnlich (Chuang *et al.* 1994; Emerson *et al.* 1994; Fridman *et al.* 1994; Scheffler *et al.* 1994). Die GTP-abhängige Bindung von Ras an die regulatorische Domäne von Raf konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden (Herrmann *et al.* 1995; Koide *et al.* 1993; Moodie *et al.* 1993; Van Aelst *et al.* 1993; Vojtek *et al.* 1993; Warne *et al.* 1993; Wittinghofer 1998; Zhang *et al.* 1993; Zhang *et al.* 1995b). Die Rekrutierung der cytoplasmatischen Raf-Kinase an die Plasmamembran wird durch Bindung an das membranständige Ras vermittelt. Die dreidimensionale Struktur der c-Raf RBD im Komplex mit dem

Ras-homologen Rap1A-Protein konnte durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden (Nassar *et al.* 1995). Rap1A und Ras sind hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen zu 50 % identisch. Im Bereich der für die Ras/Raf-Interaktion essentiellen Effektor-Region besteht sogar völlige Übereinstimmung (vgl. **Abbildung 1.6**). Daher kann die Kontaktfläche zwischen Ras und der Raf RBD aus der in **Abbildung 1.9** gezeigten Struktur des Rap1A/Raf RBD-Komplexes abgeleitet werden.

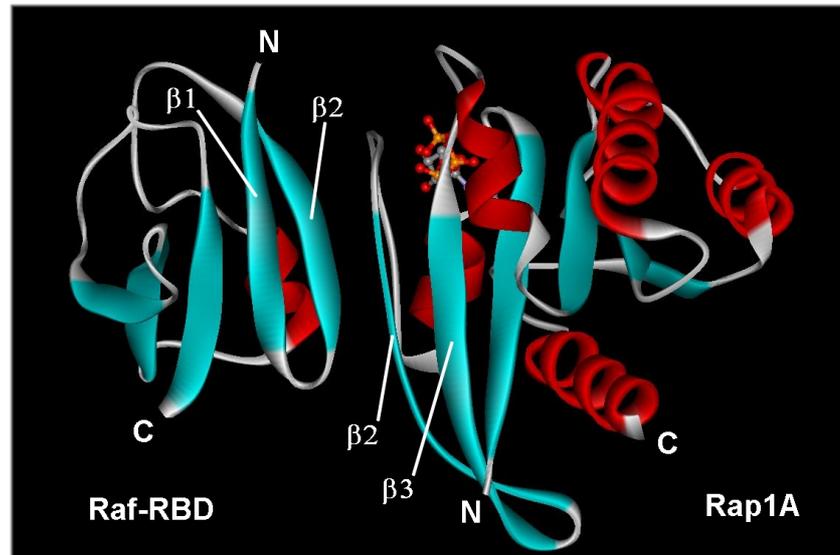


Abbildung 1.9 Tertiärstruktur des Rap1A/Raf RBD-Komplexes

Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt (gemäß Nassar *et al.* 1995).

Die Interaktion beider Proteine wird durch ein zentrales, antiparalleles β -Faltblatt vermittelt, bestehend aus den β -Strängen $\beta 1$ und $\beta 2$ der Raf RBD und $\beta 2$ und $\beta 3$ des Rap1A. Die Komplexbildung wird durch Haupt- und Seitenketteninteraktionen von Aminosäuren der Effektor-Region des Rap1A vermittelt. Genetische und biochemische Untersuchungen ergaben, daß die Mutation der Aminosäure Arginin 89 der Raf RBD zu Leucin (R89L) die Ras-Bindung und die Raf-Aktivierung unterbindet (Block *et al.* 1996; Fabian *et al.* 1994). Gestützt auf die Kristallstruktur des Rap1A/Raf RBD-Komplexes wurden einzelne Aminosäuren der RBD durch Alanin substituiert und der Beitrag der entsprechenden Seitenketten zur Ras/Raf-Bindungsaffinität *in vitro* und der Ras/Raf-regulierten Genexpression *in vivo* bestimmt (Block *et al.* 1996). Seitens der Raf RBD wird die Bindungsaffinität hauptsächlich durch die Aminosäuren Gln66, Lys84 und Arg89 vermittelt. Die Übereinstimmung zwischen den Dissoziationskonstanten respektive den Bindungsaffinitäten und den Raf-vermittelten Genaktivitäten zeigt, daß die Stärke der Ras/Raf-Interaktion das Ausmaß der Ras-induzierten Raf-Aktivierung entscheidend beeinflusst.

1.5.3 Aktivierung und Regulation der Raf-Kinase

Der Mechanismus der Raf-Aktivierung ist ein komplexer und bis heute nicht vollständig verstandener Prozeß. Als initialer Schritt kann die Rekrutierung der Raf-Kinase vom Cytoplasma an die Plasmamembran durch aktiviertes, GTP-gebundenes Ras angesehen werden. Danach finden an der Membrannenseite eine Reihe von Aktivierungsereignissen statt. Dazu gehören Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen, Aufhebung intramolekularer Interaktionen, Assoziation mit weiteren Proteinen und Komplexbildung mit nachgeschalteten Effektoren (Morrison und Cutler 1997). Die Vielzahl der mit Raf interagierenden Proteine (Kolch 2000) erschwert dabei das Verständnis des Aktivierungsprozesses erheblich.

Raf konnte *in vitro* weder mit gereinigtem Ras•GTP, noch mit gereinigter Src-Kinase aktiviert werden. Dagegen konnte jedoch festgestellt werden, daß Zellmembranen von Zellen, die konstitutiv aktives H-RasG12V und/oder Src-Kinase exprimieren, bei Vermischung mit der cytosolischen Fraktion Raf-Kinase exprimierender Zellen zu einer Erhöhung der Raf-Kinaseaktivität auf das 10- bis 20-fache führen. Das Ausmaß dieser Aktivierung entspricht dem, welches durch farnesyliertes, GTP-gebundenes K-Ras erzielt wird. GDP-beladenes K-Ras oder nicht farnesyliertes K-Ras•GTP führten dagegen nicht zu einer gesteigerten Raf-Aktivierung (Dent *et al.* 1995a; Dent und Sturgill 1994; Stokoe und McCormick 1997; Traverse *et al.* 1993). Des Weiteren kann bei der Koexpression von Ras und Raf *in vivo* eine Aktivierung der Raf-Kinase beobachtet werden (Fabian *et al.* 1993; Marais *et al.* 1995; Williams *et al.* 1992). Diese Experimente zeigen, daß neben Ras weitere membranständige Komponenten für den Raf-Aktivierungsprozeß essentiell sind. So wird die inaktive Raf-Kinase beispielsweise im Cytosol in einem großen Komplex mit den Chaperon-Proteinen Hsp90 und p50 (cdc37) und mit 14-3-3-Proteinen gefunden (Aitken 1996; Grammatikakis *et al.* 1999; Silverstein *et al.* 1998; Stancato *et al.* 1993; Wartmann und Davis 1994).

Ein wichtiges Kriterium für die Regulation der Raf-Kinaseaktivität ist der Phosphorylierungszustand der Raf-Kinase. Es konnten zahlreiche Phosphorylierungsstellen sowohl mit inhibitorischem als auch mit aktivierendem Charakter identifiziert werden (**Abbildung 1.10**). Die Aktivierung durch Wachstumsfaktoren führt hauptsächlich zur Phosphorylierung von Serinen, während Phosphothreonin und Phosphotyrosin nur in geringen Mengen nachzuweisen sind (Heidecker *et al.* 1992; Troppmair *et al.* 1992). Die Phosphorylierungen erfolgen durch Autophosphorylierung oder durch Serin/Threonin- oder Tyrosin-spezifische Kinasen (Daum *et al.* 1994; Morrison *et al.* 1988). Die Serine 43, 259 und 621 stellen die wichtigsten Phosphorylierungsstellen dar und werden im Gegensatz zu Serin 268 nicht durch Autophosphorylierung phosphoryliert. Die Serine 43 und 621 werden sowohl in nicht stimulierten als auch in PDGF-

stimulierten Zellen phosphoryliert, während das Serin 259 nur nach PDGF-Stimulation phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung des Serins 259 führt zu einer Reduktion der Raf-Kinaseaktivität, wogegen die Phosphorylierung des Serins 43 keinen Einfluß auf die Aktivität der Kinase hat. Das Serin 621 schließlich ist, wahrscheinlich durch kotranslationale Phosphorylierung bedingt, konstitutiv phosphoryliert und für die Ausbildung der korrekten, strukturellen Konformation der katalytischen Domäne und damit für die Aktivierung der Raf-Kinase essentiell (Morrison *et al.* 1993).

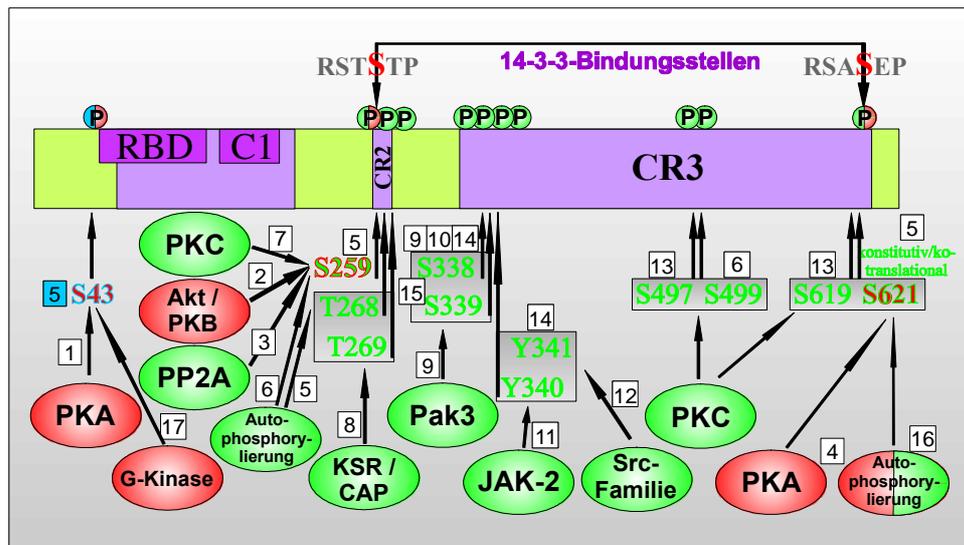


Abbildung 1.10 Phosphorylierungsstellen der c-Raf 1-Kinase

Phosphorylierungen mit inhibierenden Effekten sind rot, solche mit aktivierenden Effekten grün und solche ohne Einfluß auf die Kinaseaktivität blau hervorgehoben; nach (Avruch *et al.* 2001; Morrison und Cutler 1997; Slupsky *et al.* 1998; Yip-Schneider *et al.* 2000); nähere Erläuterungen im Text. **1)** (Chuang *et al.* 1994; Marshall 1995a; Ramstad *et al.* 2000; Wu *et al.* 1993) **2)** (Rommel *et al.* 1999; Zimmermann und Moelling 1999; Reusch *et al.* 2001) **3)** (Abraham *et al.* 2000; Jaumot und Hancock 2001) **4)** (Mischak *et al.* 1996) **5)** (Morrison *et al.* 1993) **6)** (Kolch *et al.* 1993) **7)** (Sendoh *et al.* 2000; Sozeri *et al.* 1992) **8)** (Xing und Kolesnick 2001; Yao *et al.* 1995) **9)** (King *et al.* 1998; King *et al.* 2001; Sun *et al.* 2000); **10)** (Chiloeches *et al.* 2001) **11)** (Xia *et al.* 1996) **12)** (Fabian *et al.* 1993; Marais *et al.* 1995) **13)** (Carroll und May 1994) **14)** (Mason *et al.* 1999) **15)** (Diaz *et al.* 1997) **16)** (Thorson *et al.* 1998) **17)** (Sahasini *et al.* 1998).

Entgegen den Ergebnissen von Morrison *et al.* können Kolch *et al.* eine Autophosphorylierung des Serins 259 feststellen, welche für die Raf-Aktivierung wichtig ist und für die eine vorausgehende Phosphorylierung des Serins 499 durch PKC α wesentlich ist (Kolch *et al.* 1993). Die von Schönwasser *et al.* publizierten Daten zeigen dagegen, daß die Raf-Aktivierung unabhängig von der Phosphorylierung der Serine 259 und 499 ist. Die Phosphorylierung des Serins 621 durch PKA oder durch langsame Autophosphorylierung führt gemäß Mischak *et al.* zu einer Abnahme der Raf-Kinaseaktivität. Thorson *et al.* stellen eine Autophosphorylierung des Serins 621 fest, welche für die Raf-Aktivierung essentiell ist. Die Resultate zur

Phosphorylierung und Funktion des Serins 621 sind damit widersprüchlich. Dies gilt auch für das Serin 259, welchem einerseits bedingt durch Autophosphorylierung (Kolch *et al.* 1993) oder aufgrund TPA-induzierter Phosphorylierung durch PKC (Sendoh *et al.* 2000; Sozeri *et al.* 1992) ein aktivierender Effekt zugeschrieben wird, andererseits aufgrund der Phosphorylierung durch Akt/PKB jedoch zu einer Inhibierung der Kinaseaktivität führt (Rommel *et al.* 1996; Rommel *et al.* 1997; Zimmermann und Moelling 1999).

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten durch die pp60v-Src-Kinase (Fabian *et al.* 1993; Marais *et al.* 1995) oder von Serin-/Threoninresten durch KSR/CAP-Kinase (Therrien *et al.* 1995; Therrien *et al.* 1996; Xing und Kolesnick 2001; Yao *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1997) führt zu einer Erhöhung der Raf-Kinaseaktivität *in vivo*. Die Phosphorylierung sowohl der Serine 338, 339 (Chiloeches *et al.* 2001; Diaz *et al.* 1997; King *et al.* 1998; King *et al.* 2001; Mason *et al.* 1999; Sun *et al.* 2000), 497, 499 und 619 (Carroll und May 1994; Kolch *et al.* 1993; Sozeri *et al.* 1992) als auch der Tyrosine 340 und 341 (Fabian *et al.* 1993; Marais *et al.* 1995; Marais *et al.* 1997; Mason *et al.* 1999; Xia *et al.* 1996) wurden als unabdingbar für die Raf-Aktivierung charakterisiert, wobei die Phosphorylierung des Tyrosins 341 für eine maximale Aktivierung von Bedeutung ist. Interessanterweise besitzt B-Raf in den zu 340 und 341 von c-Raf 1 äquivalenten Positionen keine Tyrosine, sondern Aspartate (D447 und D448). Die sauren Aspartate von B-Raf imitieren dabei in einer Art „molekularen Mimikry“ die im Fall von c-Raf 1 durch Phosphorylierung der Tyrosine eingeführten negativen Ladungen. Dies deutet darauf hin, daß Tyrosin-Kinasen (im Gegensatz zur c-Raf 1-Aktivierung) an der Aktivierung von B-Raf nicht beteiligt sind. Dies zeigt sich auch dadurch, daß für die Aktivierung von c-Raf 1 die Phosphorylierung des Tyrosins 341 durch Src essentiell ist, während B-Raf zwar durch onkogenes Ras, nicht jedoch durch Src aktiviert werden kann (Marais und Marshall 1996; Mason *et al.* 1999). King *et al.* und Sun *et al.* zeigen, daß die durch Pak3 vermittelte Phosphorylierung des Serins 338 über eine Aktivierung von PI3K verläuft. Chiloeches *et al.* hingegen finden eine Pak3- und PI3K-unabhängige Phosphorylierung des Serins 338. Die Serine 497 und 499 sind in der Aktivierungs-Schleife der Kinase-Domäne lokalisiert und werden wie das Serin 619 durch PKC phosphoryliert (Carroll und May 1994; Kolch *et al.* 1993; Sozeri *et al.* 1992). Andere Arbeitsgruppen können dagegen jedoch keinen Beitrag der Serine 497 und 499 zur Raf-Aktivierung feststellen (Barnard *et al.* 1998; Chong *et al.* 2001; Schönwasser *et al.* 1998).

Die Phosphorylierung des N-terminal, nahe der RBD lokalisierten Serinrestes 43 durch die Proteinkinase A (PKA) bzw. G-Kinase hat einen inhibitorischen Effekt, indem sie die Affinität von Raf zu Ras reduziert und damit die Ras-vermittelte Raf-Aktivierung beeinträchtigt

(Chuang *et al.* 1994; Marshall 1995a; Ramstad *et al.* 2000; Suhasini *et al.* 1998; Wu *et al.* 1993). Andere Autoren zeigen dagegen, daß die Inhibition der Raf-Kinase nicht von der Phosphorylierung des Serins 43 durch PKA abhängig ist (Sidovar *et al.* 2000).

Die Serinreste 259 bzw. 621, in der CR2-Region bzw. C-terminal der katalytischen Domäne lokalisiert, stellen im phosphorylierten Zustand Bindungsstellen für 14-3-3-Proteine dar (Morrison *et al.* 1993). 14-3-3-Proteine bilden 60 kDa-Dimere (Toker *et al.* 1990) und spielen eine Rolle bei der zellulären Signaltransduktion (Aitken *et al.* 1992; Aitken 1995), indem sie Phosphoserine im Kontext eines spezifischen Konsensusmotivs erkennen (Muslin *et al.* 1996). 14-3-3-Proteine sind an der Raf-Aktivierung beteiligt (Fantl *et al.* 1994; Irie *et al.* 1994; Li *et al.* 1995; McPherson *et al.* 1999) und unabhängig vom Aktivierungszustand der Raf-Kinase konstitutiv an dieser gebunden (Freed *et al.* 1994). Die Funktion der Serine 259 und 621 für die Raf-Aktivierung ist umstritten. Die bivalente Bindung von 14-3-3-Proteinen an diese phosphorylierten Serine scheint die Raf-Kinase in einer inaktiven Konformation zu halten (Rommel *et al.* 1997; Rommel und Hafen 1998; Tzivion *et al.* 1998). Die Phosphorylierung von Serin 259 reduziert die enzymatische Aktivität der Raf-Kinase durch Förderung der Assoziation mit 14-3-3-Proteinen (Morrison und Cutler 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß c-Raf einen stabilen Komplex mit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) bildet, welche durch Dephosphorylierung des Serins 259 die Raf-Kinase aktiviert (Abraham *et al.* 2000; Jaumot und Hancock 2001). Im Gegensatz dazu hat die Phosphorylierung des Serins 621 einen aktivierenden Effekt auf die Kinaseaktivität (Morrison *et al.* 1993). Die kontinuierliche Bindung von 14-3-3-Proteinen an Phosphoserin 621 ist für die Aufrechterhaltung der Aktivität der aktivierten Kinase notwendig (Yip-Schneider *et al.* 2000). Einem Modell zufolge bleibt das 14-3-3-Protein, nach Verdrängung von Phosphoserin 259, an Phosphoserin 621 (bedingt durch Autophosphorylierung) gebunden, wodurch die Dephosphorylierung durch Phosphatasen verhindert und die aktive Konformation der Raf-Kinase stabilisiert wird (Thorson *et al.* 1998). Einer anderen Studie zufolge ist die Raf/14-3-3-Interaktion für die Rekrutierung an die Plasmamembran wichtig. Nach Dephosphorylierung der Serine 259 und 621 dissoziiert das 14-3-3-Protein von diesem Komplex. Die kontinuierliche Bindung von 14-3-3-Proteinen an Raf ist zur Aufrechterhaltung der Kinaseaktivität an der Plasmamembran nicht notwendig. Rephosphorylierung der beiden Serine und nachfolgende Bindung von 14-3-3-Proteinen inaktiviert die Raf-Kinase und sorgt durch Dissoziation des Raf/14-3-3-Komplexes von der Plasmamembran für die Rekrutierung des inaktiven Komplexes in das Cytoplasma (McPherson *et al.* 1999; Roy *et al.* 1998). In zwei Artikeln (Fu *et al.* 2000; Kolch 2000) wird hinsichtlich der in der Literatur teilweise kontrovers diskutierten Funktion der 14-3-3-Proteine für die Raf-Aktivierung ausführlich eingegangen.

Als weiterer Beitrag zur Raf-Aktivierung wird die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung diskutiert (Marshall 1996a). Dazu wurde eine GyrB-Sequenz der bakteriellen DNA-Gyrase C-terminal an die Raf-Kinase fusioniert (Gilbert und Maxwell 1994). Da GyrB Coumermycin (aus *Streptomyces*) mit einer Stöchiometrie von 1:2 bindet, werden zwei Raf/GyrB-Fusionsproteine durch die Bindung von Coumermycin dimerisiert. Diese Dimerisierung führt zu einer Ras-unabhängigen Aktivierung von Raf (Farrar *et al.* 1996). In einer anderen Studie erfolgte eine Oligomerisierung der Raf-Kinase durch N-terminale Fusion des FK506-Bindungsprotein FKBP12 an Raf. Die Dimerisierung zweier FKBP/Raf-Moleküle erfolgt hier mit Hilfe des dimeren FK506-Derivats FK1012A (Luo *et al.* 1996). Die Aktivierung bleibt in diesem Fall jedoch Ras•GTP-abhängig. In der Zelle könnten auch 14-3-3-Proteine eine Dimerisierung von Raf vermitteln. Weitere, aktuellere Resultate belegen, daß eine Dimerisierung von Ras für die Aktivierung von c-Raf essentiell ist (Inouye *et al.* 2000). Neueste Untersuchungen zeigen, daß eine durch aktiviertes Ras induzierte Heterodimerisierung von c-Raf 1 und B-Raf für die Aktivierung wichtig ist, wobei ebenfalls eine Involvierung von 14-3-3-Proteinen angenommen wird (Weber *et al.* 2001; Mizutani *et al.* 2001). Diese Resultate werden unterstützt durch die Beobachtung, daß die Koexpression von B-Raf und c-Raf im Vergleich zu deren separater Expression sowohl zu einer höheren basalen, also Ras-unabhängigen Aktivierung als auch zu einer stärkeren RasG12V-vermittelten Transaktivierung führt (Lucas 2001). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch schwierig, wenn man die, hinsichtlich der Gewebespezifität, unterschiedliche Expression der beiden Raf-Isoformen berücksichtigt (Storm *et al.* 1990). Die Arbeiten zur Raf-Dimerisierung, -Heterodimerisierung bzw. -Oligomerisierung könnten aber darauf hindeuten, daß eine der Dimerisierung folgende Transphosphorylierung an dem Raf-Aktivierungsprozeß beteiligt ist.

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß auch Phosphatidylsäure (PA) für die Membrantranslokation und die Aktivierung der Raf-Kinase wichtig ist. Der PA-Bindungsereich konnte durch Deletions-Mutagenese-Untersuchungen auf eine Region zwischen Aminosäure 389 und 423 eingegrenzt werden (Ghosh *et al.* 1996).

Raf kann auch durch Fusion der 17 C-terminalen, das CaaX-Motiv umfassenden Aminosäuren von K-Ras an den C-Terminus von Raf artifiziell an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert werden (Leevers *et al.* 1994; Stokoe *et al.* 1994). Für die vollständige Aktivierung werden jedoch zusätzlich Wachstumsfaktoren (Hall 1994) bzw. die physikalische Interaktion mit Ras (Mineo *et al.* 1997) benötigt. Die Experimente unterstreichen jedoch die große Bedeutung der Membrantranslokation als einen der ersten Schritte des Raf-Aktivierungsprozesses.

Die Deletion der CR1- und CR2-Domäne des regulatorischen N-Terminus der Raf-Kinase führt zu deren konstitutiver Aktivierung (Heidecker *et al.* 1990). Der N-Terminus unterdrückt die Raf-Kinaseaktivität in unstimulierten Zellen. Diese Inhibition wird nach Stimulierung des MAPK-Signalweges aufgehoben (Bruder *et al.* 1992). Der autoinhibitorische Effekt des N-Terminus auf die katalytische Aktivität erklärt auch, daß der N-Terminus von Raf (Raf₁₋₂₅₇) dominant-negativ auf die Rezeptor-Tyrosin-Kinase-stimulierte Mitogenese (Kolch *et al.* 1991) und die MAPK-Aktivierung (Troppmair *et al.* 1994) wirkt. Essentiell für die Regulation der Raf-Kinase ist auch die CR2-Domäne. So bewirken sowohl Phosphorylierungen von Serinen und Threoninen als auch Mutationen in dieser Region eine Aktivierung der Raf-Kinase (Heidecker *et al.* 1990; Michaud *et al.* 1995; Morrison *et al.* 1993). Der Beitrag der C1-Domäne für die Aktivierung und Regulation der Raf-Kinase und speziell deren Wechselwirkung mit dem Membranlipid Phosphatidylserin soll später erläutert werden (siehe 1.5.4.2).

Der genaue Mechanismus der Raf-Aktivierung ist wie bereits dargelegt noch nicht völlig verstanden. In der Literatur finden sich zahlreiche schematische Darstellungen hypothetischer Aktivierungsmechanismen, welche in zum Teil unterschiedlich starkem Maß auf die Beteiligung von 14-3-3-Proteinen, Kinasen, Phosphatasen, Adapterproteinen, Kofaktoren *etc.* bei dem Raf-Aktivierungsprozeß abheben (Campbell *et al.* 1998; Daum *et al.* 1994; Fu *et al.* 2000; Jaumot und Hancock 2001; Morrison und Cutler 1997; Sternberg und Alberola-Laila 1998; Thorson *et al.* 1998; Tzivion *et al.* 1998; Zhang und Guan 2001). **Abbildung 1.11** zeigt das zur Zeit gängige Modell der Raf-Aktivierung.

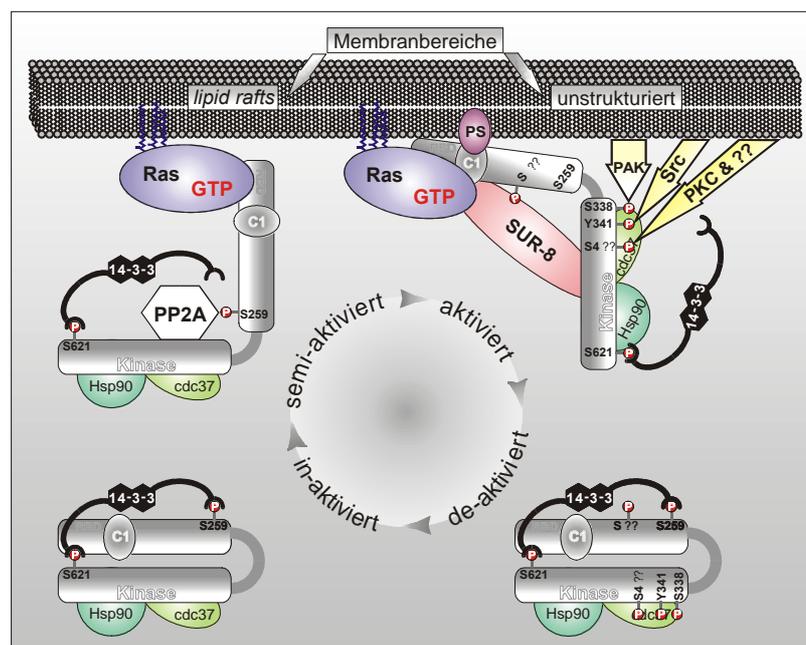


Abbildung 1.11 Modell der Raf-Aktivierung
cdc37 wird auch als p50 bezeichnet; weitere Erklärungen im Text (verändert nach Kolch *et al.* 2000).

1.5.4 Die c-Raf C1-Domäne

Die c-Raf C1-Domäne ist eine cysteinreiche, Zink-bindende Domäne, die unmittelbar C-terminal der RBD lokalisiert ist. Sie umfaßt die Aminosäuren 139 bis 184 (vgl. **Abbildung 1.8**) und bindet zwei Zn²⁺-Ionen in zwei Koordinationszentren, bestehend aus jeweils drei Cysteinen und einem Histidin (Ghosh *et al.* 1994; Mott *et al.* 1996). Die C1-Domäne stellt damit eine zweite unabhängige Faltungsdomäne innerhalb des regulatorischen N-Terminus dar. Die C1-Domäne wurde zuerst bei Mitgliedern der PKC-Familie beschrieben. Die Zink-bindenden Domänen der Raf-Kinasen und der PKCs stimmen in ihrer Gesamttopologie stark überein, haben jedoch weder strukturelle, noch funktionelle Ähnlichkeit mit den klassischen, Nucleinsäure-bindenden Zinkfingern. Die PKCs sind Serin/Threonin-Kinasen, die für ihre Aktivierung Kofaktoren wie Ca²⁺, Phospholipide und Diacylglycerol (DAG) benötigen. Die C1-Domänen der PKC-Isoenzyme werden in typische und atypische C1-Domänen unterteilt, je nachdem ob sie DAG und dessen strukturelles Analogon, den Tumorpromotor Phorbolster (TPA), binden oder nicht. **Abbildung 1.12** zeigt den Vergleich verschiedener PKC C1-Domänen und der c-Raf C1-Domäne (Zhang *et al.* 1995a).



Abbildung 1.12 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener C1-Domänen
 Die Zn²⁺-bindenden Histidine und Cysteine sind fett gedruckt; die grün bzw. rot nummerierten Aminosäuren binden das erste bzw. zweite Zn²⁺-Ion. Die Numerierung der Aminosäuren und die Darstellung der Sekundärstrukturelemente bezieht sich auf c-Raf 1. Die oberen drei Sequenzen repräsentieren typische C1-Domänen und stammen vom Rind (PKC α 1) bzw. von der Ratte (PKC β 1 und PKC γ 1). Die atypische PKC ζ 1-Sequenz stammt von der Maus; die c-Raf C1-Sequenz ist humanen Ursprungs (verändert nach Zhang *et al.* 1995a).

Die Bindungsstelle des natürlichen Aktivators DAG (Nishizuka 1988; Nishizuka 1992) bzw. des Tumorpromotors TPA (Castagna *et al.* 1982; Hannun und Bell 1986) wird in PKC von den Schleifen zwischen β 1 und β 2 und zwischen β 3 und β 4 gebildet. Diese zwei Schleifen bilden eine Bindungstasche auf der Oberfläche der C1-Domäne der PKC. **Abbildung 1.12** zeigt, daß die an der Phorbolster- bzw. DAG-Bindung beteiligten Aminosäuren der Schleife

zwischen den β -Faltblattsträngen $\beta 3$ und $\beta 4$ in der c-Raf C1-Domäne fehlen. Die c-Raf C1-Domäne ist daher nicht zur Bindung von DAG oder TPA befähigt und stellt somit eine atypische C1-Domäne dar.

Das saure Phospholipid Phosphatidylserin (PS) wird von den C1-Domänen aller PKC-Isoformen sowie der c-Raf C1-Domäne gebunden (McPherson *et al.* 1999). Den PKC C1-Domänen kommt durch deren Interaktion mit Phospholipiden der Plasmamembran eine wichtige Funktion bei der Translokation und Aktivierung der Kinase zu (Cho 2001). Die Bindung von in der Plasmamembran lokalisiertem DAG an die PKC C1-Domäne induziert eine Änderung der Oberfläche dieser Domäne und ermöglicht eine hydrophobe Interaktion mit der Membran (Zhang *et al.* 1995a). Eine ähnliche, wenn auch DAG- bzw. TPA-unabhängige Funktion ist auch für die Raf-Kinase denkbar. Neuesten Untersuchungen zufolge sind PKC C1-Domänen auch an der Detektion der physikalischen Eigenschaften der äußeren Zellmembran, insbesondere der durch Membran-destabilisierende Lipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Cholesterin bedingten Veränderungen der Plasmamembran-Krümmung beteiligt (Ho *et al.* 2001).

C1-Domänen kommen außer in der Raf-Kinase und den PKCs noch in weiteren an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen vor (Ron und Kazanietz 1999). So etwa in DAG-Kinasen (Schaap *et al.* 1990), PKD/PKC μ (Johannes *et al.* 1994; Valverde *et al.* 1994; Van Lint *et al.* 1995), Vav (Coppola *et al.* 1991), $\alpha 1(n)$ -Chimerin (Hall *et al.* 1990; Lee *et al.* 1992), β -Chimerin (Caloca *et al.* 1997), RasGRP (Ebinu *et al.* 1998), Unc-13 (Maruyama und Brenner 1991), und KSR/CAP-Kinase (Zhang *et al.* 1997). Sämtliche C1-Domänen binden Phosphatidylserin, nicht alle sind jedoch zur Bindung von DAG bzw. Phorbolster befähigt (Ahmed *et al.* 1991).

1.5.4.1 Struktur der c-Raf C1-Domäne

Die Struktur der c-Raf C1-Domäne konnte durch NMR-Analyse gelöst werden (Mott *et al.* 1996). Die Sekundärstruktur dieser Domäne wird von fünf β -Faltblattsträngen und von einer sehr kurzen α -Helix gebildet. Die C1-Domäne besteht aus zwei β -Faltblättern, die aus $\beta 1$, $\beta 4$ und $\beta 5$ respektive aus $\beta 2$ und $\beta 3$ gebildet werden. Die erste Zn^{2+} -Bindungsstelle wird von Aminosäureresten der Schleife zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$ und Aminosäureresten der Schleife zwischen $\beta 5$ und der C-terminalen Helix gebildet. Die C-terminale Helix befindet sich in räumlicher Nähe des $\beta 1$ -Strangs, so daß der N- und der C-Terminus nahe beieinander liegen und die zweite Zn^{2+} -Bindungsstelle bilden. (vgl. **Abbildung 1.12** und **Abbildung 1.13**). Die

Aminosäuren 146 bis 150 und die C-terminale Helix zeigen innerhalb der Struktur ein erhöhtes Maß an Flexibilität, aufgrund dessen diese an einer Liganden-Interaktion beteiligt sein könnten.

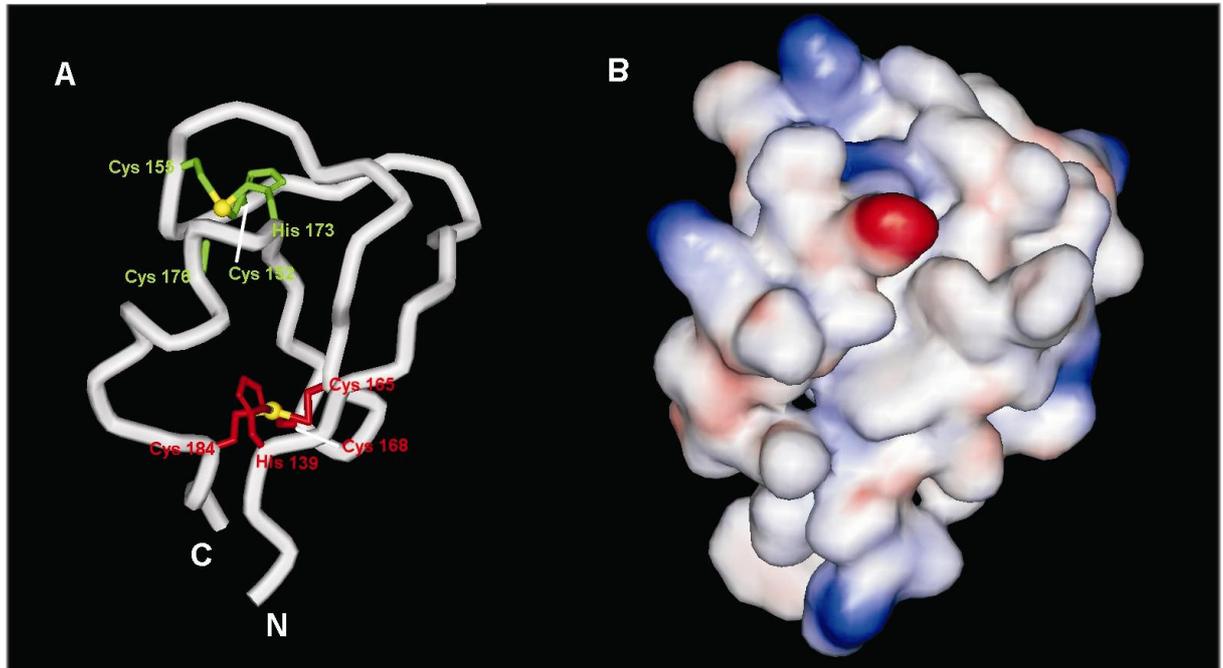


Abbildung 1.13 Struktur der c-Raf C1-Domäne

A: Gezeigt ist das Protein-Rückgrat der C1-Domäne. Die für die Komplexierung der Zn²⁺-Ionen (gelb) verantwortlichen Cysteine (Cys) und Histidine (His) sind entsprechend der Farbgebung der Abbildung 1.12 grün und rot dargestellt. **B:** Oberflächenmodell der C1-Domäne (rot = negatives Potential, blau = positives Potential, weiß = neutral). Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt (verändert nach Mott *et al.* 1996).

Die Strukturen zwei weiterer C1-Domänen konnten gelöst werden. Die der PKC α C1-Domäne durch NMR-Analyse (Ichikawa *et al.* 1995) und die der PKC δ C1-Domäne (Zhang *et al.* 1995a) mittels Röntgen-Kristallographie. Die drei C1-Domänen besitzen ein hohes Maß an Homologie, zeigen aber speziell in den ungefalteten Schleifen auch erhebliche Unterschiede. Dies wird bei einem Vergleich der Strukturen der C1-Domänen von c-Raf 1 und PKC δ deutlich (**Abbildung 1.14**). Die zwischen β 1 und β 2 lokalisierte Schleife beider C1-Domänen ist strukturell sehr ähnlich. Im Gegensatz dazu ist die zweite, zwischen β 3 und β 4 befindliche Schleife in c-Raf deutlich kürzer und im Vergleich zu PKC δ weniger flexibel. Außerdem sind einige der mit Phorbol ester interagierenden Aminosäurereste in c-Raf nicht vorhanden. Aus diesem Grund ist die C1-Domäne von c-Raf nicht in der Lage, Phorbol ester oder DAG zu binden, was sie als atypische C1-Domäne auszeichnet.

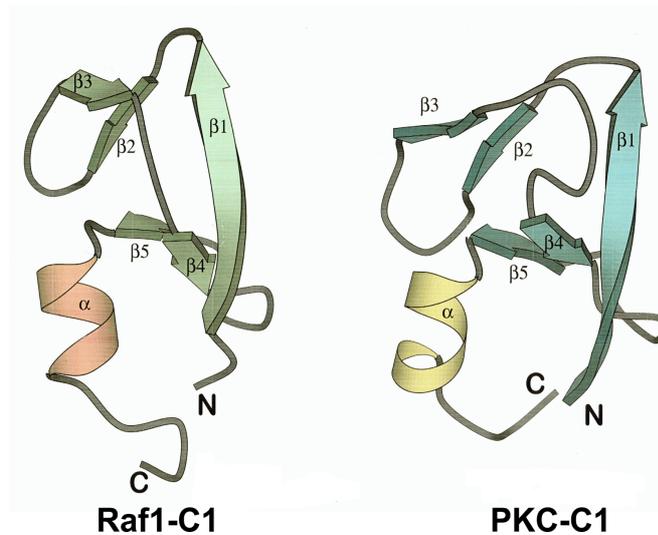


Abbildung 1.14 Vergleich der Struktur der C1-Domänen von c-Raf 1 und PKCδ

Die C1-Domänen sind als MOLSCRIPT-Bändermodell (KRAULIS 1991) dargestellt (verändert nach Mott *et al.* 1996 und Zhang *et al.* 1995a).

1.5.4.2 Interaktion und Funktion der c-Raf C1-Domäne

Die Interaktion der c-Raf C1-Domäne mit Ras und damit deren Funktion hinsichtlich der Ras-abhängige Raf-Aktivierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Ein N-terminales, sich bis zur CR2-Domäne erstreckendes, nicht katalytisch aktives Raf-Fragment (Raf₁₋₂₅₇) zeigt einen dominant-negativen Effekt in einem *CAT-Assay*, der vergleichbar mit dem durch die Raf-Kinase-Mutante K375W hervorgerufenen Effekt ist. Die Integrität der C1-Domäne ist für diesen Effekt essentiell. So bewirkt die Substitution des für die Strukturgebung der C1-Domäne wichtigen Cysteins zu Serin in der Position 168 von Raf₍₁₋₂₅₇₎ eine starke Abnahme dieses dominant-negativen Effekts. Das Raf₍₁₋₂₅₇₎C168S-Konstrukt zeigt eine partiell erhöhte Basalaktivität, die einerseits durch konstitutiv aktives Ras, TPA oder Serum-Stimulation nicht weiter erhöht und andererseits durch dominant-negative Ras-Mutanten nicht inhibiert werden kann (Bruder *et al.* 1992). Die C1-Domäne ist demnach für die Regulation der Raf-Kinaseaktivität bzw. für eine negative, regulatorische Funktion essentiell. Gemäß Bruder *et al.* interagiert die C1-Domäne mit einem unbekanntem Faktor der die Ras-vermittelte Raf-Aktivierung potenziert oder sie trägt zur korrekten Faltung des N-Terminus bei, welcher direkt mit Ras interagiert. Die beobachtete Inhibition der Ras-vermittelten Raf-Aktivierung bei Überexpression des Raf₍₁₋₂₅₇₎-Fragmentes könnte jedoch auch durch eine Konkurrenz endogener Raf-Kinase um die Ras-Bindung begründet sein (Vojtek *et al.* 1993).

Die Denaturierung des Raf₍₁₋₂₅₇₎-Fragmentes in Gegenwart eines Zn²⁺-bindenden Chelators bewirkt eine Depletion des für die Strukturgebung der C1-Domäne essentiellen Zn²⁺. Renaturierung des Raf₍₁₋₂₅₇₎-Fragmentes in Gegenwart von Zn²⁺ führt *in vitro* zu einer besseren Rekonstitution der Bindung dieses Raf-Fragmentes an GST-Ras•GTP als die Renaturierung ohne Zn²⁺, was die Notwendigkeit einer intakten C1-Domäne für die Ras/Raf-Interaktion unterstreicht (Warne *et al.* 1993).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß sowohl posttranslational modifiziertes als auch unmodifiziertes Ras an das Raf₍₁₋₂₅₇₎-Fragment bindet, die Lipidmodifikationen für eine Bindung also nicht essentiell sind. Dabei zeigen beide Ras-Formen eine Bindung an Raf₍₁₋₂₅₇₎ bzw. Raf₍₁₋₂₅₇₎C168S, jedoch mit deutlicher Präferenz für Raf₍₁₋₂₅₇₎. Die C168S-Mutation verhindert eine Interaktion des Raf-Fragmentes mit Ras im *Two-Hybrid-Assay* und inhibiert teilweise die Bindung von rekombinantem (prozessiertem) Ras aus Sf9-Zellen mit GST-Raf₍₁₋₂₅₇₎ *in vitro*. Weiterhin ist die Bindung von Raf₍₁₋₂₅₇₎ an Ras GTP-abhängig, also abhängig von dem an Ras gebundenem Nucleotid. GST-Raf₍₁₋₂₅₇₎ inhibiert darüber hinaus die durch p120GAP induzierte Ras-GTPase-Aktivität, während diese Inhibition durch Raf₍₁₋₂₅₇₎C168S deutlich geringer ist (Zhang *et al.* 1993).

Studien unter Verwendung der Doppelmutante Raf-C165S/C168S zeigen, daß *in vivo* und *in vitro* eine intakte C1-Domäne wichtig für die Bindung von Ras•GTP durch Interaktion mit einem von der Effektor-Region verschiedenen Ras-Epitop ist. Dieses Epitop ist jedoch nur bei prenyliertem, d.h. posttranslational modifiziertem Ras vorhanden (Luo *et al.* 1997).

In den Untersuchungen von Luo *et al.* wird jedoch nicht deutlich, ob die beobachteten Effekte auf eine verringerte Rekrutierung von Raf an die Plasmamembran oder auf eine Beeinträchtigung des Raf-Aktivierungsprozesses zurückzuführen ist. Weitere Experimente mit Raf-C165S/C168S, artifiziell in der Plasmamembran inseriertem Raf-CaaX-C165S/C168S und weiteren Varianten dieses Konstruktes zeigten, daß Die C1-Domäne für die Membranrekrutierung entbehrlich ist, die Raf-Aktivierung jedoch auf 25 % reduziert ist (Roy *et al.* 1997).

Die Interpretation der im Kontext des Raf-C165S/C168S-Konstrukts und dessen Varianten sowie durch Zn²⁺-depletierte Raf-Fragmente erhaltenen Daten ist schwierig. Die Resultate könnten Artefakte sein, die auf einer unspezifischen Faltung des N-Terminus beruhen, verursacht durch die beeinträchtigte Zn²⁺-Komplexierung der veränderten C1-Domäne (vgl. **Abbildung 1.12**). Als Folge kommt es zu einem Verlust spezifischer intra- und inter-

molekularer Interaktionen. Dies könnte eine Erklärung für die oft widersprüchlichen Resultate verschiedener Studien sein.

Untersuchungen legen nahe, daß Aminosäuren der sogenannten Aktivierungs-Region, welche C- und N-terminal der mit der *switch I*-Domäne überlappenden Effektor-Region lokalisiert ist, an der Interaktion der Raf C1-Domäne mit Ras involviert sind (vgl. **Abbildung 1.6**). Dabei wird speziell die Beteiligung der Aminosäuren der Positionen 26, 27 und 45 diskutiert (Akasaka *et al.* 1996; Chuang *et al.* 1994; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1991; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995; Hu *et al.* 1995; Hu *et al.* 1997; Shinkai *et al.* 1996; Shirouzu *et al.* 1994; Tamada *et al.* 1997). Die Resultate sind zuweilen gegensätzlich, was wahrscheinlich auf die Unterschiedlichkeit der verwendeten Systeme und Methoden zurückzuführen ist. Veränderungen der Aminosäuren 26 und 45 führen in allen Fällen zu einer Inhibition der Aktivierung bzw. Verlust der Transformationsfähigkeit. Dies geht jedoch nicht in allen Untersuchungen mit einer Beeinträchtigung der Ras/Raf-Interaktion einher. In einigen Untersuchungen wurden auch Mutationen in der Effektor-Region miteinbezogen (Chuang *et al.* 1994; Shirouzu *et al.* 1994). Auch Aminosäuren der *switch II*-Region werden in einigen Studien eine bedeutende Rolle zugewiesen. So werden in einer Studie die Effekte von Mutationen der *switch I* und *switch II*-Region untersucht (Drugan *et al.* 1996); in einer anderen wird je eine Ras-Mutante aus der *switch I*-Region (Effektor-Region), der *switch II*-Region und der Aktivierungs-Region untersucht (Shinkai *et al.* 1996).

Die Ansicht der verschiedenen Arbeitsgruppen, ob die Interaktion zwischen Ras und der C1-Domäne vom nucleotidgebundenen Zustand des Ras-Proteins abhängt, d.h. ob Ras in der GTP- bzw. GDP-gebundenen Form vorliegt, ist ebenfalls teilweise gegensätzlich. Brtva *et al.* können eine GTP-Abhängigkeit der Interaktion feststellen; diese scheint jedoch indirekt, als daß die GTP-abhängige Ras/Raf RBD-Interaktion Voraussetzung für die nachfolgende Ras/Raf C1-Interaktion ist. Auch Drugan *et al.* stellen eine Abhängigkeit vom nucleotidgebundenen Zustand fest. Dies ist jedoch zu erwarten, da sie Mutationen der *switch I*- und *switch II*-Region untersuchen, deren Konformation vom nucleotidgebundenen Zustand abhängig ist. Andere Studien zeigen eine GTP-Abhängigkeit bei Verwendung von nicht farnesylierten Ras; jedoch eine Unabhängigkeit vom nucleotidgebundenen Zustand bei Verwendung von lipidmodifiziertem Ras (Williams *et al.* 2000). Hu *et al.* zeigen, daß die Ras/Raf C1-Interaktion GTP-unabhängig ist, die posttranslationalen Modifikationen des Ras-Proteins jedoch wichtig sind. Andere Autoren gehen auf die Abhängigkeit der Interaktion von dem jeweils gebundenen GTP bzw. GDP nicht explizit ein.

Des Weiteren ist strittig, ob die posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins und hier insbesondere die Farnesylierung für diese Interaktion essentiell ist. Zahlreiche Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen unterstreichen die Notwendigkeit der Ras-Lipidmodifikationen für die Ras/Raf C1-Interaktion (Hu *et al.* 1995; Hu *et al.* 1997; Luo *et al.* 1997; Tamada *et al.* 1997; Williams *et al.* 2000). Bei Luo *et al.* ist das interagierende Ras-Epitop nur bei prenyliertem Ras vorhanden. Andere Experimentatoren können keine Beteiligung der Ras-Lipidmodifikationen hinsichtlich einer Interaktion feststellen (Shinkai *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1993).

Chuang *et al.* zeigen, daß einerseits die Mutationen N26G/H27I und V45E der Aktivierungs-Region keine Reduktion der Ras/Raf-Bindungsaffinität bewirken, andererseits jedoch nicht mehr zur Transformation fähig sind. Die Autoren vermuten eine Wechselwirkung dieser Aminosäurereste mit einem dritten, noch unbekanntem Faktor, der die Ras/Raf-Komplexierung und Raf-Aktivierung beeinflusst, schließen jedoch eine Rolle für die unmittelbare Ras/Raf-Bindung aus. Die Deletion der C1-Domäne führt in diesen Untersuchungen nicht zu einer Reduktion der Ras/Raf-Bindungsaffinität. Der Vergleich zweier unterschiedlicher Raf-Fragmente (Raf₅₁₋₁₃₁ und Raf₅₁₋₁₄₉) weist die Aminosäurereste 51-131 als minimale Ras-Bindungs-Domäne (Raf RBD) aus, wobei die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren der Raf C1-Domäne (Raf₅₁₋₁₄₉) die hochaffine Bindung deutlich erhöhen. Andere Untersuchungen zeigen ebenfalls, daß die Aminosäuren 131-147 der Raf-Kinase für eine Ras/Raf-Bindung mit hoher Affinität essentiell sind (Ghosh *et al.* 1994; Ghosh und Bell 1994). Im Gegensatz dazu weisen die Resultate der Arbeitsgruppe um Gorman diese Aminosäurereste als nicht essentiell für die Interaktion aus (Gorman *et al.* 1996). Gemäß den Ergebnissen von Vojtek *et al.* ist die C1-Domäne für eine Ras/Raf-Interaktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht essentiell.

In diesem Zusammenhang soll erwähnt sein, daß neben Proteinen auch Lipide als Kofaktoren für die Raf-Aktivierung in Betracht kommen. So konnte gezeigt werden, daß die c-Raf C1-Domäne analog zur C1-Domäne von PKC γ mit Phosphatidylserin (PS)-enthaltenden Liposomen in einer PS-Konzentration-abhängigen Weise interagiert (Ghosh *et al.* 1994; Ghosh *et al.* 1996). Für die PS-Interaktion konnten die auf der Oberfläche der C1-Domäne lokalisierten, basischen Aminosäuren R143, K144 und K148 als essentiell identifiziert werden (Improta-Brears *et al.* 1999), vgl. **Abbildung 1.11**.

Die Funktion basischer, aber auch aliphatischer und aromatischer Aminosäuren für die Membran/Protein-Interaktion ist in zahlreichen neueren Studien genauer analysiert und verifiziert worden (Gelb *et al.* 1999; Han *et al.* 1999; Stahelin und Cho 2001; Yau

et al. 1998). Untersuchungen von Winkler *et al.* zufolge soll die Substitution von R143 und K144 durch andere Aminosäuren (R143Q, R143W und K144E) die für die negative Regulation essentielle Interaktion zwischen dem C- und N-Terminus der Raf-Kinase beeinträchtigen (Winkler *et al.* 1998). Diese Interaktion kann intra- oder intermolekular sein und die Interaktion eines weiteren Faktors, eventuell von 14-3-3-Proteinen einschließen. Die genannten Mutationen beeinträchtigen die Interaktion und damit die negative Regulation, wodurch die Raf RBD besser zugänglich und daraus resultierend die Raf-Kinaseaktivität erhöht wird.

Während es zahlreiche und ausgedehnte Studien über den Beitrag verschiedener, einzelner Aminosäuren der verschiedenen Ras-Regionen (*switch I* / Effektor-Region, *switch II* und Aktivierungs-Region) hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Raf-Bindung und Raf-Aktivierung gibt, sind solche Untersuchungen auf Seiten der Raf-Kinase selten. Neben den oben dargestellten Resultaten von Ghosh *et al.* und Winkler *et al.*, sind die von Daub *et al.* erzielten Ergebnisse von besonderer Bedeutung. In letzterer Arbeit konnten durch ausgedehnte Alanin-Scanning-Mutagenese oberflächenexponierter Aminosäurereste der Raf C1-Domäne mehrere distinkte, funktionelle Epitope charakterisiert werden. Drei inhibitorische Epitope sind für den Erhalt der Autoinhibition der Kinaseaktivität essentiell. Eines der drei aktivierenden Epitope wird von den C-terminalen Aminosäuren S177, T182 und M183 der C1-Domäne gebildet und stellt ein potentielles Ras-Bindungsepitop dar.

Im Gegensatz dazu konnten Williams *et al.* mit L149 und F151 zwei hydrophobe Aminosäuren innerhalb eines hydrophoben Bereichs der Raf C1-Domäne identifizieren, die bei Substitution durch polare Aminosäuren (L149T/F151Q) die Fähigkeit der Bindung an Ras und die der Aktivierung durch Ras aufheben. Die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen und Phosphatidylserin ist jedoch nicht beeinträchtigt. Bei den Experimenten bleibt unklar, ob die Farnesylgruppe des posttranslational modifizierten Ras-Proteins unmittelbar mit der Raf C1-Domäne interagiert oder nicht. Möglicherweise strukturiert die Farnesylgruppe erst zusammen mit einer anderen Region des Ras-Proteins, beispielsweise mit dem C-Terminus von Ras, ein Epitop, daß zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität beiträgt. Der mögliche Beitrag der letzten 20 C-terminalen, in der Kristallstruktur fehlenden Aminosäuren muß hier in Betracht gezogen werden. Williams *et al.* benutzen in ihren Experimenten zum Teil unmodifiziertes, weil C-terminal verkürztes Ras₍₁₋₁₆₆₎ und zum Teil *in vitro*-farnesyliertes *full length* Ras₍₁₋₁₈₉₎, was eine Beurteilung der Resultate erschwert.

1.6 Zielsetzung

Die unter 1.5.4.2 angeführten und zum Teil widersprüchlichen Resultate erschweren die Formulierung eines genauen Mechanismus für die Ras-Aktivierung. Die damit verknüpften Problematiken sollen nachfolgend in sechs, sich teilweise überschneidende Fragenkomplexe untergliedert werden:

1. Welche über die initiale und essentielle Membranlokalisierung des Ras-Proteins und damit der Bildung des Ras/Raf-Komplexes hinausgehende Funktion haben die posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins hinsichtlich des Raf-Aktivierungsprozesses?
2. Sind die C-terminalen Lipidmodifikationen, und hier insbesondere die Farnesylgruppe des Ras-Proteins, an einer Interaktion mit der Raf-Kinase, speziell mit der c-Raf C1-Domäne beteiligt?
3. Existiert ein mit der C1-Domäne der Raf-Kinase interagierendes Ras-Epitop außerhalb der Effektor-Region, beispielsweise in der Aktivator- oder der *switch II*-Region, welches so eine zweite Interaktion neben der bereits bekannten Ras/RBD-Wechselwirkung definiert?
4. Falls ein zweiter Interaktionsbereich seitens des Ras-Proteins identifiziert werden kann; welches sind die für diese Interaktion relevanten Aminosäurereste auf der Seite der Raf-Kinase bzw. der c-Raf C1-Domäne?
5. Inwiefern ist die Interaktion eines solchen zweiten Interaktionsbereichs abhängig von den posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins?

Die vorliegende Arbeit zur Klärung der aufgeführten Punkte beitragen. Zur Untersuchung der beiden ersten Fragestellungen soll ein artifizielles Ras-Protein eingesetzt werden, dessen Membranlokalisation durch eine N-terminale Fusion einer Transmembran-Domäne statt durch die C-terminalen, posttranslationalen Lipidmodifikationen erfolgt. Die Frage nach einem weiteren mit der Raf-Kinase interagierenden Ras-Epitops soll durch eine ausgedehnte Mutagenese oberflächenexponierter Aminosäurereste des Ras-Proteins geklärt werden, wobei sich die Untersuchungen auf die Aktivierungs-Region konzentrieren. Dabei sollen *in vivo* sowohl Bindung als auch Aktivierung analysiert werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob das von Daub *et al.* charakterisierte potentielle Ras-Bindungsepitop S177/T182/M183 an einer solchen Interaktion beteiligt ist. Die Abhängigkeit von dem jeweils durch das Ras-Protein gebundenem Nucleotid kann aus experimentellen Gründen nicht näher untersucht werden, da alle in den *in vivo* Experimenten analysierten Mutanten den konstitutiv aktiven RasG12V-Hintergrund aufweisen.

LB-Agarplatten: 5 g Hefeextrakt
 10 g Bacto-Trypton
 15 g Bacto-Agar
 10 g NaCl
 auf 1 l mit dH₂O auffüllen
 pH 7,4 einstellen, autoklavieren und gießen

LB/Amp-Flüssigmedium und -Agarplatten: Nach dem Autoklavieren und Abkühlung der Nährmedien auf ca. 65°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

2.1.2.2 Hefen

SC-Medien: 6,7 g Hefe-Nitrogenextrakt ohne Aminosäuren
 2 g Aminosäuremix ohne
 Leucin (L), Histidin (H) und Tryptophan (T)
 2 % Glucose

SC^{LT}-Medium: 0,1 g/l SC-Medium mit
 Histidin (H)

SC^{LTH}-Medium: 25 mM SC-Medium mit
 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)

SC-Agarplatten: 20 g Agar (Difco, Augsburg)
 mit SC-Medium auf 1 l auffüllen

YPD-Medium: 10 g Bacto-Yeast (Difco, Augsburg)
 20 g Bacto-Pepton (Difco, Augsburg)
 auf 960 ml mit Wasser auffüllen
 autoklavieren und abkühlen lassen
 40 ml 50 %ige (w/v) Glucose-Lösung zufügen, sterilfiltriert

YPD-Agarplatten: 20 g Agar (Difco, Augsburg)
 mit SC-Medium auf 1 l auffüllen

2.1.2.3 Säugerzellen

Kulturmedium: MEM (Modified Eagle´s Medium)
 mit Glutamax-I und Earle´s Salzen (Gibco BRL, Paisley)
 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)
 5000 U/ml Penicillin
 5000 U/ml Streptomycin

Hungermedium: 0,3 % Kulturmedium mit
 (v/v) fötalem Kälberserum (FCS)

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht in den Methodenbeschreibungen gesondert vermerkt, wurden Chemikalien von höchstem Reinheitsgrad der folgenden Firmen verwendet: Aldrich (Steinheim), Amersham (Braunschweig), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg); [γ - ^{32}P]-ATP: ICN Biomedicals Inc. (Irvine, USA).

2.1.4 Antibiotika

Die Antibiotika Ampicillin bzw. Kanamycin wurden nach dem Autoklavieren der Nährmedien für Bakterien in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

2.1.5 Antikörper

Anti-FLAG [®] M5, monoklonal,	aus Maus	Sigma (Deisenhofen)
Anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt,	aus Schaf	Amersham (Braunschweig)
Anti-Raf (C-12), IgG ₁ , polyklonal,	aus Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc. (USA)
Anti-H-Ras (259), IgG ₁ , monoklonal,	aus Ratte	Santa Cruz Biotech. Inc. (USA)
Anti-Raf 1, IgG ₁ , monoklonal,	aus Maus	BD Transduction Laboratories (USA)
Anti-Ras, IgG ₁ , monoklonal,	aus Maus	BD Transduction Laboratories (USA)
Anti-Maus-IgG, AP-gekoppelt	Western Breeze [®] -Kit	NOVEX (San Diego, USA)
Anti-Kaninchen-IgG, AP-gekoppelt	Western Breeze [®] -Kit	NOVEX (San Diego, USA)
Anti-Ratte-IgG, AP-gekoppelt	Western Breeze [®] -Kit	NOVEX (San Diego, USA)

2.1.6 Enzyme

<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase	(2,5 U/ μl)	Stratagene (Heidelberg)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	(5 U/ μl)	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	(5-20 U/ μl)	New England Biolabs (Schwalbach)
T4-DNA-Ligase	(1 U/ μl)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
T4-Polynucleotidkinase	(10 U/ μl)	New England Biolabs (Schwalbach)
RNase A	(10 mg/ml)	Qiagen (Hilden)
Alkalische Phosphatase, CIP	(1 U/ μl)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Alkalische Phosphatase, SAP	(1 U/ μl)	USB (Ohio, USA)

2.1.7 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung:	30 %	Acrylamid
(Lämmli-Gele)	0,8 %	Bisacrylamid

Acrylamid-Lösung: (Tricin-Gele)	38,7 % 1,3 %	Acrylamid Bisacrylamid
Agarose-Lösung für DNA-Gele:	0,8-2 % 0,001 %	(w/v) Agarose (w/v) Ethidiumbromid in 1 × TAE
Anoden-Puffer: (Tricin-Gele)	200 mM	Tris/HCl; pH 8,9 einstellen
Anoden-Puffer: (Semi-Dry-Blotting)	300 mM 100 mM	Tris/HCl Tricin pH 8,7 – 8,8 einstellen
APS:	10 %	(w/v) Amoniumperoxodisulfat in dH ₂ O
ATP-Stock-Lösung:	10 mM 100 mM 50 mM 10 mM	ATP Tris/HCl; pH 7,5 MgCl ₂ DTE
β-Gal-Puffer: (Luciferase-Reportergen-Assay)	1 mM	Z-Puffer mit ONPG
Blockierungs-Puffer:	5 % 0,1 %	(w/v) Magermilchpulver und (v/v) Tween 20 in 1 × TBS
Blot-Puffer:	25 mM 250 mM 200 ml	Tris Glycin Methanol mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen, Lagerung bei 4°C
Coomassie-Färbelösung:	40 % 10 % 0,2 %	(v/v) Ethanol (v/v) Essigsäure Serva Blue R250
6 × DNA-Probenpuffer:	0,25 % 0,25 % 30 %	(w/v) Bromphenolblau (w/v) Xylencyanol (v/v) Glycerin in 1 × TAE
Elektrophorese-Puffer: (Lämmli-Gele)	25 mM 190 mM 0,2 %	Tris Glycin SDS
Entfärber-Lösung:	20 % 10 %	(v/v) Methanol (v/v) Essigsäure
Ethidiumbromid-Lösung:	10 µg/ml	Ethidiumbromid in 1 × TAE

Gel-Puffer: (Tricin-Gele)	3 M 0,3 % pH 8,45 einstellen	Tris/HCl SDS
2 × HEPES-Puffer:	140 mM 1,5 mM 50 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ Hepes pH 7,05 einstellen
Kathoden-Puffer: (Tricin-Gele)	100 mM 100 mM 0,1 %	Tris Tricin SDS
Kathoden-Puffer: (Semi-Dry-Blotting)	300 mM 30 mM	Capronsäure Tris pH 8,6 – 8,7 einstellen
2 × Kinase-Puffer:	50 mM 300 mM 50 mM 20 mM 2 mM	HEPES; pH 7,5 NaCl β-Glycerophosphat MgCl ₂ DTE
2 × Kinase-Puffer: (alternativ)	20 mM 300 mM 20 mM 0,5 mM	Tris; pH 7,4 NaCl MgCl ₂ DTT
Kinase-Reaktions-Lösung: (pro Ansatz)	0,3 µl 0,5 - 1,0 µl 0,5 - 3,0 µg 15 µl	ATP-Stock-Lösung (10 mM) [γ- ³² P]-ATP (10µCi/µl) Kinase-inaktive MEK mit dH ₂ O auf auffüllen.
Lösung I (Glucose-Mix):	50 mM 25 mM 10 mM	Glucose Tris/HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0
Lösung II (NaOH-SDS-Mix):	0,2 M 1 %	NaOH SDS
Lösung III (Acetat-Mix):	3 M 10 %	Kaliumacetat (v/v) Eisessig; pH 4,8 einstellen
Luciferase-Assay-Reagenz:	20 mM 1,07 mM 2,67 mM 0,1 mM 33,3 mM 270 µM 470 µM 530 µM 1 M	Tricin (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ MgSO ₄ EDTA, pH 8,0 DTT Coenzym A Luciferin ATP mit Tris-Base auf pH 7,8 einstellen

Lysis-Puffer: (Luciferase-Reporter-Gen-Assay)	25 mM	Tris/H ₃ PO ₄ , pH 7,8
	2 mM	EDTA
	10 %	(v/v) Glycerin
	1 %	(v/v) Triton X-100
	2 mM	DTT
Lysis-Puffer: (Kinase-Aktivitäts-Assay)	25 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1 %	Triton X-100
	150	mM NaCl
	25 mM	Natriumpyrophosphat
	50 mM	β-Glycerophosphat
	50 mM	NaF (optional)
	1 mM	Natrium-ortho-vanadat (Na ₃ VO ₄)
	2 mM	EDTA
	2 mM	EGTA
	10 %	Glycerin
	1 mM	PMSF
	0,1 %	β-Mercaptoethanol
	1 Tablette	Boehringer Complete pro 50 ml (statt 5 mM Benzamidin, 0,4 mg/ml Leupeptin und 0,5 mg/ml Aprotinin)
Lysis-Puffer: (Kinase-Aktivitäts-Assay, alternativ)	10 mM	Tris, pH 7,4
	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Nonidet P-40
	150 mM	NaCl
	20 mM	NaF (optional)
	0,2 mM	Natrium-ortho-vanadat (Na ₃ VO ₄)
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	0,2 mM	PMSF
	1 Tablette	Boehringer Complete pro 50 ml (statt 5 mM Benzamidin, 0,4 mg/ml Leupeptin und 0,5 mg/ml Aprotinin)
NB-Puffer:	150 mM	NaCl
	10 mM	Bicin, pH 8,35
10 × PBS:	160 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	1,5 M	NaCl
		pH 7,5 einstellen und autoklavieren
1 × PBS: (Zellkultur)	137 mM	NaCl
	2,6 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,2 - 7,4 einstellen und autoklavieren
PBST:	0,1 %	Tween 20 in 1 × PBS

PBSMT:	0,5 % 0,1 %	(w/v) Magermilchpulver und (v/v) Tween 20 in 1 × PBS
PEG-Lösung:	40 % 200 mM	PEG 1000 in Bicin; pH 8,35 einstellen und sterilfiltrieren
Ponceau S:	0,1 % 5 %	(w/v) Ponceau S (v/v) Essigsäure
Puffer A:	20 mM	Imidazol in 1 × PBS pH 7,5 einstellen
Puffer B :	500 mM	Imidazol in 1 × PBS pH 7,5 einstellen
Restriktionspuffer 2: (New England Biolabs)	10 mM 50 mM 1 mM 10 mM	MgCl ₂ NaCl DTT Tris/HCl pH = 7,9
RIPA-Puffer:	150 mM 0,5 % 1 % 0,1 % 0,1 μM 1 μM 1 mM	NaCl Natriumdesoxycholat Nonidet P-40 SDS Aprotinin Leupeptin PMSF in 1 × TBS; pH 8,0 einstellen
Sammelgel-Puffer:	0,4 % 0,5 M	SDS Tris/HCl pH 6,8 mit H ₃ PO ₄ einstellen und autoklavieren
SBEG:	1 M 10 mM 3 %	Sorbitol Bicin, pH 8,35 Ethylenglykol
5 × SDS-Probenpuffer:	108 mM 17 % 3 % 8 % 0,0015 %	Tris/HCl, pH 6,8 (v/v) Glycerin (w/v) SDS (v/v) β-Mercaptoethanol (w/v) Bromphenolblau
Stripping-Puffer:	100 mM 2 % 62,5 mM	β-Mercaptoethanol SDS Tris/HCl pH 6,7 einstellen

50 × TAE-Puffer:	2 M 50 mM	Tris EDTA pH 8,0 mit Essigsäure einstellen
1 × TBS:	10 mM 150 mM	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl
TBST:	0,1 %	Tween 20 in 1 × TBS
TBSMT:	0,5 % 0,1 %	(w/v) Magermilchpulver und (v/v) Tween 20 in 1 × TBS
TE-Puffer:	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA autoklavieren
Trenngel-Puffer:	0,4 % 1,5 M	SDS Tris/HCl pH 8,8 mit H ₃ PO ₄ einstellen und autoklavieren
TSS-Puffer:	10 % 5 % 50 mM	PEG 8000 DMSO MgCl ₂ ; pH 6,5 mit LB-Medium (ohne Antibiotikum und ohne NaOH) auffüllen
Trypsin/EDTA-Lösung:		(GIBCO BRL, Paisley)
10 × T4-DNA-Ligasepuffer:	500 mM 100 mM 100 mM 10 mM 250 µg/ml	Tris/HCl; pH 7,5 MgCl ₂ Dithiothreitol ATP BSA
Waschpuffer:	0,1 %	(v/v) Tween 20 in 1 × TBS
X-Gal-Stock-Lösung:	100 mg/ml	X-Gal in N,N'-Dimethylformamid
X-Gal-Puffer: (Qualitativer Two-Hybrid-Assay)	0,75 mg/ml	Z-Puffer mit X-Gal (aus Stock-Lösung)
Z-Puffer: (Semiquantitativer <i>Two-Hybrid-Assay</i>)	60 mM 40 mM 10 mM 1 mM 2 mM	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0 KCl MgSO ₄ DTT

Primer für Klonierungen	Sequenz (5'® 3')
	5 10 15 20 25 30 35 40
5'-Ras N-term × <i>SalI</i>	ACGC GTCGAC CATG ACAGAATACAAGCTTG
3'-Ras vk × <i>BglII</i>	GA AGATCTTA GTGCTGCCGGATCTCAC
5'-Ras N-term <i>BamHI</i>	C GGGATCC ATG ACAGAATACAAGCTTGTGTTGTTG
3'-Ras C-term <i>EcoRI</i>	CC GAATTCTC ATTA GGAGAGCACACACTTGCAGCT
3'-Ras C-term ₁₈₁ <i>SmaI</i>	TCC CCGGGTTACTA GCAGCCGGGGCCACTCTCATC
3'-Ras C-term ₁₇₁ <i>PstI</i>	AA CTGCAGGGATTACTA CAGCTTCCGCAGCTTGTGCTGCCG
3'-Ras C-term ₁₆₆ <i>SmaI</i>	GTCC CCCGGG GG ATTACTA GTGCTGCCGGATCTCACGGAC
5'-RapRas <i>BamHI/BstXI</i>	C GGGATCCCA TGGTGCTGG TTGGCAATAAATGTG

Primer für PCR-Mutagenese	Sequenz (5'® 3')
	5 10 15 20 25 30 35 40 45
5'-Ras N-term <i>NarI</i>	GTTGTT GGCGCC GTC GGTGTGGGC
3'-Ras C-term <i>ClaI</i>	CC ATCGAT GACCACCTGCTTCCGG
3'-Ras <i>ClaI</i> Q43 R	CC ATCGAT GACCAC CCG CTTCCGG
3'-Ras <i>ClaI</i> Q43 W	CC ATCGAT GACCAC CCA CTTCCGG
3'-Ras <i>ClaI</i> V45 R	CC ATCGAT GCG CACCTGCTTCCGG
3'-Ras <i>ClaI</i> V45 W	CC ATCGATCC ACACCTGCTTCCGG *
5'-Ras <i>ClaI</i> T50 R	GGTC ATCGAT GGGGAG AGG TGCCTGTTGG
5'-Ras <i>ClaI</i> T50 W	GGTC ATCGAT GGGGAG TGG TGCCTGTTGG
5'-Ras <i>ClaI</i> E49 R	GGTC ATCGAT GGG AGG ACGTGCCTGTTGG
5'-Ras <i>ClaI</i> E49 W	GGTC ATCGAT GGG TGG ACGTGCCTGTTGG
5'-Ras <i>ClaI</i> L52 R	GGTC ATCGAT GGGGAGACGTGC CGG TTGG
5'-Ras <i>ClaI</i> L52 W	GGTC ATCGAT GGGGAGACGTGC TGG TTGG
3'-Ras <i>ClaI</i> D47 R	GCACGTCTCCCC ACG GATGACCACC
3'-Ras <i>ClaI</i> D47 W	GCACGTCTCCCC CCA GATGACCACC
3'-Ras <i>ClaI</i> Q43 A	CC ATCGAT GACCAC CGC CTTCCGG
3'-Ras <i>ClaI</i> V45 A	CC ATCGATTGC CACCTGCTTCCGG
3'-Ras <i>ClaI</i> T50 A	CCAACAGGCA CGC CTCCCC ATCGAT GACC
3'-Ras <i>ClaI</i> Q43/V45 A	CC ATCGATGGC CAC CGC CTTCCGG

* **Achtung:** Dam-Methylierung an dem drei Nucleotide nach der *ClaI*-Schnittstelle lokalisiertem Cystein

ATG = Start-Codon; **TTA**, **CTA**, **TCA** = Stop-Anticodons (ochre, ambre, opal); **lila** = Schnittstellen für die Restriktionskontrollen; **grün** = flankierende Restriktionsschnittstellen; **orange hinterlegt** = mutierte Basen-Triplets; **GTC** = G12V-Triplett.

2.1.9 Vektoren und Plasmide

2.1.9.1 Hefe-Vektoren

pPC86	(Fusions-Vektor mit GAL4-Aktivierungsdomäne)	(Chevray & Nathans 1992)
pPC97	(Fusions-Vektor mit GAL4-DNA-Bindungsdomäne)	(Chevray & Nathans 1992)
pPC86 _{SS}		(Jaitner 1997)
pPC86 _{Xba}		(siehe 2.2.4.5.3)
pPC97 _{SS}		(Jaitner 1997)
pPC97 _{Xba}		(siehe 2.2.4.5.3)
pPC97 _{SS} -RasG12V ₍₁₋₁₆₆₎		(Jaitner 1997)
pPC97 _{Xba} -RasG12V ₍₁₋₁₆₆₎ -Mutanten		(siehe 2.2.4.5.3)
pPC86 _{SS} -c-Raf(Wt)		(Jaitner 1997)
pPC86 _{SS} -c-Raf(Δ C1)		(siehe 2.2.4.5.3)

2.1.9.2 Säuger-Expressionsvektoren

pBluescriptSK ⁺		Stratagene (Heidelberg)
pEQ176	(β -Galactosidase-Expression)	(Janknecht <i>et al.</i> 1993a)
pE74 ₃ -tk ₈₀ -luc	(Luciferase-Reportergen)	(Janknecht <i>et al.</i> 1993b)
p44MAPK	(ERK1-Expression)	(Meloche <i>et al.</i> 1992)
psG-ER81	(Ets-Transkriptionsfaktor ER81-Expression)	(Janknecht 1996)
pcDNA3		Invitrogen (Leek, NL)
pcDNA3 _{MCS}		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MXB		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MX-c-Raf(Wt)		(Block <i>et al.</i> 1996)
pcDNA3 Δ MX-FLAG-Raf(Wt)		(Daub <i>et al.</i> 1998)
pcDNA3 Δ MX-c-Raf(Δ C1)		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MX-c-Raf C1-Mutanten		(Daub <i>et al.</i> 1998)
pcDNA3 Δ MX-c-Raf RBD-Mutanten		(Jaitner 1997)
pcDNA3 Δ MX-RasG12V(<i>Cla</i> I)		(Daub <i>et al.</i> 1998)
pcDNA3 Δ MXB-QI-RasG12V.3S		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MXB-QI-RasG12V.3C		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MXB-QI-RasG12V.181		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MXB-QI-RasG12V.171		(siehe 2.2.5.9)
pcDNA3 Δ MXB-QI-RasG12V.166		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3		(Mongkolsuk 1988)
pSVK3 _{MCS}		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} -RasWt(<i>Cla</i> I)		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} -RasG12V		(Block <i>et al.</i> 1996)
pSVK3 _{MCS} -RasG12V(<i>Cla</i> I)		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} -RasG12V.3S		(Block <i>et al.</i> 1996)
pSVK3 _{MCS} -QI-RasG12V.3S		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} -QI-RasG12V.3C		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} Δ BamHI-RasG12V.3S		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.181		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.171		(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.166		(siehe 2.2.5.9)

pSVK3 _{MCSΔBamHI} -QI-RasG12V.V45E.3C	(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCSΔBamHI} -QI-RasG12V.V45E.3S	(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} -RasG12V-Mutanten	(siehe 2.2.5.9)
pSVK3 _{MCS} -RasG12V.E37G	(Jaitner 1997)

Bemerkung: die Zusätze „MCS“, „ΔMX“, „ΔMXB“ und „MCSΔBamHI“ werden in den dem Material- und Methodenteil folgenden Kapiteln zur Vereinfachung weggelassen.

2.1.10 DNA- und Proteinstandards

2.1.10.1 DNA-Standards

1 kb-DNA-Leiter	Gibco BRL (Paisley)
λ-III-Marker (<i>EcoRI/HindIII</i>)	Gibco BRL (Paisley)

2.1.10.2 Proteinstandards

SDS-6H-Proteinmarker	Sigma (Deisenhofen)
SDS-7-Proteinmarker	Sigma (Deisenhofen)
<i>Prestained</i> Proteinmarker, „broad range“	NEB (Schwalbach)

2.1.11 Reagenziensets („kits“)

ABI PRISM [®] BigDye [™]	Applied Biosystems
Terminators v3.0 Cycle Sequencing Kit	(ABI, Foster City, USA)
BCA Protein Assay Reagent	Pierce Chemical Company
	(Rockford, USA)
Coomassie [®] Protein Assay Reagens	BioRad (München)
ECL Plus Western blotting detection system	Amersham (Braunschweig)
Galacto-Star [™]	Tropix Inc.(Bedford, USA)
JETstar Plasmid Maxiprep Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Spin Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Spin PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA-Cloning Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)
Western Breeze [®] -Kit	NOVEX (San Diego, USA)

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Autoradiographiefilm Kodak X-OMAT-AR	Sigma (Deisenhofen)
Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	BD Falcon [™] (Heidelberg)
Hybond-P, PVDF Membranen	Amersham (Braunschweig)
Hyperfilm [™] , ECL [™]	Amersham (Braunschweig)

Luminometer-Röhrchen
 Mikrotiterplatten (96 wells)
 Reaktions-Röhrchen (14 ml)
 Sterilfilter 0,2 µm
 Whatman 2 MM Papier
 Zellkulturflaschen (70 ml, 250 ml und 750 ml)
 Zellkulturschalen (Ø 5,5 cm und 9 cm)

Sarstedt (Nümbrecht)
 Becton Dickenson (Heidelberg)
 Greiner (Frickenhausen)
 Schleicher & Schuell (Dassel)
 Schleicher & Schuell (Dassel)
 BD Falcon™ (Heidelberg)
 Greiner (Frickenhausen)

2.1.13 Laborgeräte

ABI PRISM® 373A DNA-Sequencer

Brutschrank WTB Binder
 Brutschrank Function line
 Brutschrank IR Autoflow
 Elektrophorese Mini Protean II Gelsystem
 ELISA-Photometer MR 5000
 Fast-Blot-Apparatur B44
 Feinwaage METTLER
 Gelscanner Bioprofil 5.0
 Heizblock Thermomixer 5436
 Inkubationsschüttler Multitron
 Luminometer Lumat LB 9501
 Mehrkanal-Pipette Titerman® 4908
 Multipette® pro
 Netzgerät, Elektrophoresis-EPS 3500
 pH-Meter 761 Calimatic
 Phosphoimager FLA3000
 Pipetus® -junior
 Power PAC 3.000
 Research® -Pipetten (variabel)
 Sonikator Sonifier 450
 Spektralphotometer Uvikon 933 UVA/VIS
 Sterilbank HERA Safe
 Thermocycler, Mastercycler
 TRIO-Thermoblock
 Zählkammern (Neubauer oder Thoma)
 Zentrifugen: RC-3B, Rotor H6000A
 J2-HC
 J2-HS
 Avanti J-30 I
 Rotoren: JS 4.3, JA 10, JA 12, JA 14, JA 17
 Zentrifuge: Avanti™ 30
 Rotoren: F0650, C0650
 Tischzentrifuge: Biofuge 13
 Centrifuge 5417
 Biofuge primo
 Vakuumkonzentrator 5301

Applied Biosystems
 (ABI, Foster City, USA)
 Heraeus Instruments (Düsseldorf)
 Heraeus Instruments (Düsseldorf)
 NuAire
 BioRad (München)
 Dynatech (Denkendorf)
 Biometra (Göttingen)
 Mettler (Gießen)
 Fröbel (Lindau)
 Eppendorf (Hamburg)
 Infors (Bottmingen, CH)
 Berthold (Wildbad)
 Eppendorf (Hamburg)
 Eppendorf (Hamburg)
 Pharmacia (Freiburg)
 Knick (Berlin)
 Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
 Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
 BioRad (München)
 Eppendorf (Hamburg)
 Branson Ultra. (Danbury, USA)
 Kontron (Neu-Fahrn)
 Heraeus Instruments (Düsseldorf)
 Eppendorf (Hamburg)
 Biometra (Göttingen)
 LO-Laboroptik (Friedrichsdorf)
 Sorvall, Dupont (Newtown, USA)
 Beckman (Palo Alto, USA)
 Heraeus Instruments (Hamburg)
 Eppendorf (Hamburg)
 Heraeus Instruments (Hamburg)
 Eppendorf (Hamburg)

2.1.14 Computer-Software

Acrobat Reader[®] 4.0

AIDA

Berkeley enhanced-RasMol 2.6-ucb-β

Corel Draw 7[™]

Corel Photo-Paint 7[™]

GCG

Graphit 3.01

Reference Manager 9.5

WebLabViewer 4.0

Word 2000

Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)

Raytest Inc (Wilmington, USA)

MultiCHEM Facility, (Berkeley, USA)

University of California, Berkeley, USA)

Corel Corporation (Ottawa, Ontario, Kanada)

Corel Corporation (Ottawa, Ontario, Kanada)

Accelrys Inc. (San Diego, USA)

Erithacus Software Ltd (Stainer, USA)

ISI ResearchSoft (Berkeley, USA)

Accelrys (Madison, USA)

Microsoft[®] Corporation (Redmond, USA)

2.1.15 Internet-Adressen

<http://www.embl.de/>

<http://www.mpg.de/>

<http://www.rcsb.org/pdb/>

<http://www.expasy.ch/>

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~c-cell-w/links.htm>

<http://www.nih.gov/~jun/research/body.html>

<http://www.cells.de/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.bibliothek.uni-regensburg.de/ezeit/>

<http://www.cbs.dtu.dk/gorm/modelorganisms.html>

<http://www.atcc.org/>

<http://www.belspo.be/bccm/>

<http://cgsc.biology.yale.edu/top.html>

<http://www.ccug.gu.se/>

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

<http://genprotec.mbl.edu/start>

<http://ecocyc.PangeaSystems.com/ecocyc/ecocyc.html>

<http://www.nmsu.edu/~molbio/bioABACUShome.htm>

<http://www.hum-molgen.de/companies/index5.html>

<http://gdbwww.gdb.org/gdb>

<http://www.sigma-aldrich.com/>

<http://mc2.CChem.Berkeley.EDU/Rasmol/v2.6/>

<http://www.accelrys.com/download/>

European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

Max-Planck-Gesellschaft

zur Förderung der Wissenschaften e.V.

Brookhaven Protein Data Bank

Molecular Biology Server

Molecular Biology Bookmarks

Research Tools

online-Dienst zur Zellbiologie

National Center for Biotechnology

Information

Elektronische Zeitschriften

WWW Resources for Model Organisms

American Type Culture Collection (ATCC)

Belgian Coordinated Collections of

Microorganisms (BCCM)

E.coli Genetic Stock Center (CGSC)

Culture Collection, University of Göteborg

Saccharomyces Genome Database

E.coli Genome und Proteome Database

Encyclopedia of E. coli Genes und

Metabolism

Database of Abbreviations und Acronyms in

Biotechnology

Biomedical Companies

The Genome Database

online-Kataloge von Aldrich, Fluka, Riedel-de-Haen, Sigma und Supelco

Download von Berkeley enhanced-

RasMol 2.6-ucb-β

Download von WebLabViewer Lite

und WebLabViewer Pro

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

2.2.1.1.1 Photometrisch

Die Konzentration von Nucleinsäure-Lösungen kann durch spektralphotometrische Messungen unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt werden:

$$c = E \cdot \frac{1}{e} \cdot \frac{1}{d}$$

E spezifischer Extinktionskoeffizient

c molare Konzentration der Lösung (mol/l)

e molarer Extinktionskoeffizient (1000 cm²/mol)

d Schichtdicke der Küvette (cm)

I₀ Intensität des einfallenden Lichts

I Intensität des austretenden Lichts

$$E = \log \frac{I_0}{I}$$

Bei einer Schichtdicke von $d = 1$ cm und der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm gelten folgende Näherungswerte:

doppelsträngige DNA:	1 OD ₂₆₀ = 50 µg/ml
einzelsträngige DNA/RNA:	1 OD ₂₆₀ = 40 µg/ml
Oligonucleotide:	1 OD ₂₆₀ = 33 µg/ml

Für die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA ergibt sich:

$$\text{Extinktion} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm kann als Maß für die Reinheit der DNA gelten. Bei reiner DNA liegt dieses Verhältnis bei 1,8 bis 2,0. Des Weiteren lassen sich bei $\lambda = 270$ nm Verunreinigungen, die auf Phenol zurückzuführen sind, detektieren; die auf solchen Verunreinigungen beruhende Extinktion überlagert die Absorption bei $\lambda = 260$ nm („Phenol-Schulter“) und führt dadurch zur Ermittlung höherer (falscher) Konzentrationen. Die Messungen wurden, abhängig von der zur Verfügung stehenden DNA-Menge, mit einem Uvikon 933 UVA/VIS-Spektralphotometer in einer 100 µl bzw. 1 ml-Quarzküvette durchgeführt.

2.2.1.1.2 Gelelektrophoretische Abschätzung

Die Konzentration von Nucleinsäure-Lösungen kann nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel durch einen Vergleich der Bandenintensität mit Markerbanden von

definierter Menge abgeschätzt werden (vgl. 2.2.1.10.1). Hierzu eignet sich unter anderem der λ HindIII- oder λ HindIII/EcoRI-Marker; auch definierte Mengen an unverdauter, genomischer *E. coli*- oder λ -DNA können zum Vergleich herangezogen werden.

2.2.1.2 DNA-Restriktion mit Restriktionsendonukleasen des Typs II

Restriktionsendonukleasen erkennen doppelsträngige DNA-Sequenzen und schneiden diese spezifisch. Dabei können je nach Enzym 3'- bzw. 5'-überhängende oder glatte DNA-Enden entstehen (*blunt ends*). Allgemein gilt, daß 1 μ g λ -DNA unter optimalen Bedingungen in 1 h von 1 U Enzym bei 37°C verdaut wird. Die Restriktion von DNA wird im allgemeinen mit 1 – 10 U Enzym/ μ g DNA unter den vom Hersteller angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen für 2 – 3 h durchgeführt; bei Verwendung ineffizienter Restriktionsendonukleasen, d.h. Enzymen mit naturbedingt geringer Aktivität können die Restriktionszeiten optional bis auf 12 h und mehr (ÜN) verlängert werden. Auch der Einfluß der die Restriktionsstelle umgebende DNA-Sequenz muß hinsichtlich ihrer Länge und Basenabfolge sowie potentieller Dam-Methylierungsstellen analysiert werden. Bei extrem terminal lokalisierten Restriktionsschnittstellen (z.B. bei hybridisierten Oligodesoxynucleotiden) muß der Einfluß 5'- oder 3'-überhängender Enden im Hinblick auf deren Größe und Zusammensetzung berücksichtigt werden. Die Enzyme befinden sich zur Stabilisierung in einem Puffer mit einem Glycerin-Gehalt von 50 %. Das Volumen des Reaktionsansatzes wird so gewählt, daß eine Glycerin-Konzentration von 5 % nicht überschritten wird und beträgt 20 – 60 μ l. Ist die Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen erforderlich, welche unterschiedliche Pufferbedingungen benötigen, wird ein Puffer gewählt, der bezüglich der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen eine gute Annäherung für beide Komponenten darstellt. Bei stark abweichenden, unvereinbaren Reaktionsbedingungen wird zunächst das Enzym mit niedrigeren Salzbedingungen eingesetzt und anschließend die Pufferbedingungen für das zweite Enzym eingestellt. Alternativ kann die DNA vor einem zweiten Restriktionsverdau gefällt, gewaschen, lyophilisiert und in dH₂O resuspendiert werden; noch einfacher erfolgt die Aufreinigung der DNA-Fragmente über die Silica-Säulchen des „PCR Purification Kits“ bzw. des „Gel Extraction Kits“. Je nach Verwendungszweck der geschnittenen DNA schließt sich eine Aufreinigung und Fällung der DNA an (vgl. 2.2.1.5). Der Erfolg der Restriktion wird mittels Gelelektrophorese kontrolliert (vgl. 2.2.1.10.1). Die DNA-Restriktion wurde angewandt, um doppelsträngige DNA zu klonieren und die korrekte Insertion eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid nachzuweisen.

2.2.1.3 Dephosphorylierung von DNA

Um die intramolekulare Religation eines restringierten Vektors während einer Ligation (vgl. 2.2.1.7) zu verhindern, werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen des linearen DNA-Doppelstranges entfernt. Diese sogenannte Dephosphorylierung wird durch eine alkalische Phosphatase (CIP oder SAP, vgl. 2.1.6) bewirkt. Der restringierte Vektor wird dazu in einem Endvolumen von 50 μl mit dem empfohlenen Reaktionspuffer gelöst und nach Zugabe von 1 μl des Enzyms für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Restriktion und Dephosphorylierung der Plasmid-DNA kann bei Zeitmangel auch simultan durchgeführt werden und erfolgt dann unter ausschließlicher Verwendung des DNA-Restriktionspuffers. Bei Verwendung von CIP schließt sich zum Zweck der Beseitigung der Phosphatase-Aktivität eine Aufreinigung der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gelelution an (vgl. 2.2.1.10.2). Alternativ kann die Aufreinigung auch unter Verwendung des „PCR Purification Kits“ erfolgen (vgl. 2.1.11). Bei einer Dephosphorylierung durch SAP erübrigt sich eine langwierige Aufreinigung; das Enzym kann durch eine Inkubation des Ansatzes von 1 h bei 65°C vollständig inaktiviert werden. Der Ansatz kann direkt nach der Hitzeinaktivierung in die Ligation eingesetzt werden (vgl. 2.2.1.7).

2.2.1.4 Beseitigung überhängender DNA-Einzelstränge (*blunt ending*)

In einigen Fällen ist aufgrund der erstellten Klonierungs-Strategie die Beseitigung einer bestimmten Restriktionsschnittstelle des zu verwendenden Vektors erforderlich. Hierzu wird das Plasmid mit dem entsprechenden Restriktionsenzym restringiert (vgl. 2.2.1.2). Je nach gewählter Endonuklease entstehen glatte DNA-Enden (*blunt ends*) oder kohäsive 3'- bzw. 5'-überhängende DNA-Stränge (*sticky ends*). Letztere werden wie folgt enzymatisch aufgefüllt und so in glatte DNA-Enden überführt:

x μl	DNA-Lösung (Restriktionsansatz)		Inkubation: 15 min, 25°C
6,6 μl	dNTP-Mix (jeweils 200 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
y μl	dH ₂ O		Inaktivierung: Zugabe von 2 μl EDTA- Lösung (0,1 M)
3 μl	10 \times Klenow-Puffer		
1,5 μl	Klenow-Fragmen		
30	μl Gesamtvolumen		

Bei 5'-Überhang kann statt des Klenow-Fragments optional auch *Pfu*-Polymerase (mit dem entsprechendem Puffer) verwendet werden. Bei 3'-Überhang kann dagegen ausschließlich das

Klenow-Fragment eingesetzt werden, welches die überhängenden 3'-Enden durch seine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität abbaut. Die dargestellte Methode wird auch angewendet, wenn die Ligation von *blunt ends* mit *sticky ends* erforderlich ist.

2.2.1.5 DNA-Extraktion

Zur Entfernung von Verunreinigungen durch Proteine wird die DNA-haltige Lösung sukzessiv mit ½Volumen Phenol, ½Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und abschließend mit ½Volumen Chloroform extrahiert. Zur Trennung der wässrigen (oberen) und phenolischen (unteren) Phase erfolgt jeweils eine Zentrifugation von 5 min in einer Tischzentrifuge bei RT und 13.000 rpm. Optional kann noch ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt angeschlossen werden, welcher der Entfernung von Resten des organischen Lösungsmittels Chloroform dient. Dazu wird die wässrige Phase des letzten Arbeitsschrittes mit Ether im Verhältnis 1:1 versetzt und gemischt. Nach erneuter Phasentrennung durch Zentrifugation kann die obere Ether-Phase durch eine an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossene Kanüle vorsichtig abgesaugt werden.

2.2.1.6 DNA-Ethanolpräzipitation

Ziel dieser Methode ist die Fällung von DNA als Natriumsalz aus wässrigen Lösungen. Die DNA wird durch Zugabe von 0,1 Volumen 3M NaAc-Lösung (pH 5,2) sowie 2,5 Volumen eiskaltem 96 %igem Ethanol für mindestens 20 min bei -20°C gefällt. Die Pelletierung der DNA erfolgt durch Zentrifugation für 45 min bei 13.000 rpm und 4°C. Das resultierende DNA-Pellet wird mit ca. 500 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, erneut für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend an der Luft oder unter Vakuum getrocknet. Das DNA-Pellet wird in 20 – 60 µl TE-Puffer oder dH₂O resuspendiert und gegebenenfalls mit RNase A (vgl. 2.1.6) in einer Endkonzentration von 20 µg/ml für 60 min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.7 DNA-Ligation

Der Einsatz von T4-DNA-Ligase ermöglicht die Verknüpfung zweier überhängender, zueinander komplementärer DNA-Stränge oder zweier stumpfer DNA-Enden (blunt end-Ligation) durch Bildung einer Phosphodiesterbindung. Die Ligation erfolgt in einem kleinen

Endvolumen von maximal 10 - 20 μl unter Verwendung von etwa 15 - 20 ng des dephosphorylierten Vektors. Nach Zugabe des Inserts in einem im Verhältnis zum Vektor 5- bis 10-fach molaren Überschuß und von 1 U Ligase erfolgt die Ligation standardmäßig ÜN bei 16°C. In Ausnahmefällen kann die Ligation auch durch eine Inkubation für ca. 1 h bis 3 h bei RT durchgeführt werden. Allgemein gilt für die bei einer Ligation einzusetzende Menge an Insert:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Insert [kb]} \cdot \text{Vektor [ng]} \cdot \text{molarer Überschuß}}{\text{Vektor [kb]}}$$

In einem gesonderten Ansatz wird zusätzlich die Vollständigkeit der Dephosphorylierung des Vektors durch Kontrolle seiner verbliebenen Fähigkeit zur intramolekularen Religation getestet. Der komplette Ligations- und Religationsansatz wird nachfolgend in kompetente Bakterien transformiert (vgl. 2.2.3.4). Je höher das Verhältnis der Anzahl von Kolonien auf der Ligations-Platte zur Anzahl von Kolonien auf der Religations-Platte, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Kolonien der Ligations-Platte tatsächlich rekombinante Plasmide enthalten. Der Erfolg der Ligation wird entweder nach Isolation der Plasmid-DNA durch DNA-Restriktionen (vgl. 2.2.1.2) oder durch PCR-Schnelltests (vgl. 2.2.1.13) mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Ansätze kontrolliert. Für eine **intramolekulare Ligation** (Religation) darf der Vektor im Voraus nicht (!) dephosphoryliert werden; zur Unterbindung der Bildung von DNA-Concatemeren ist des weiteren auf eine geringe DNA-Konzentration im Religations-Ansatz zu achten, die 4 ng/ μl nicht überschreiten sollte. Der Zusatz von PEG oder Hexamminkobalt(III)-trichlorid wirkt einer intramolekularen Reaktion entgegen (Sambrook *et al.* 1989). Bei einer **blunt end-Ligation** ist auf eine niedrige ATP-Konzentration (Ferretti und Sgaramella 1981) von maximal 0,5 mM und auf die Abwesenheit von Polyaminen wie Spermidin zu achten; weiterhin erfordert diese Reaktion eine hohe Konzentration an *blunt ends* und an Ligase (0,05 Weiss-units/ μl ; 0,015 Weiss-units = 1 U). Für eine **intramolekulare blunt end-Ligation** gilt zusammenfassend: keine Polyamine, PEG oder Hexamminkobalt(III)-trichlorid, eine geringe DNA-Konzentration und eine hohe Ligase-Konzentration.

2.2.1.8 Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynucleotide

Die Hybridisierung synthetisch hergestellter Oligodesoxynucleotide erfolgt durch Einsatz von jeweils 1 μg der beiden komplementären Oligodesoxynucleotide in Restriktionspuffer 2 mit

einem Endvolumen von 20 μ l. Der Ansatz wird 2 min auf 94°C erhitzt und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei die Hybridisierung der DNA-Einzelstränge erfolgt.

2.2.1.9 Phosphorylierung von Oligodesoxynucleotiden

Die 5'-Enden hybridisierter Oligonucleotide (vgl. 2.2.1.8) müssen vor der Ligation (vgl. 2.2.1.7) in einen dephosphorylierten Vektor (vgl. 2.2.1.3) an ihren 5'-Enden mit Phosphatgruppen verknüpft werden. Dies geschieht mit Hilfe einer Polynucleotidkinase. Dieses Enzym überträgt das γ -Phosphat des ATPs auf das 5'-Hydroxylende von Polynucleotiden. In einen Ansatz mit 1 μ g DNA und einem Endvolumen von 20 μ l wird die entsprechende Menge 10-fach T4-Polynucleotid-Kinase-Puffer und 1 μ l T4-Polynucleotidkinase (10 U) gegeben. Nach Inkubation von 1 h bei 37°C erfolgt die Termination der Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 65°C.

2.2.1.10 DNA-Gelelektrophorese

Methode zur Auftrennung von DNA und DNA-Restriktionsfragmenten zum Zweck der Kontrolle mittels PCR amplifizierter DNA-Sequenzen (vgl. 2.2.1.12) sowie zur DNA-Mengenabschätzung und -Größeneinschätzung (vgl. 2.2.1.1.2). Die entsprechende, von der Größe und der Prozentigkeit des Gels abhängige Menge Agarose wird in 1 \times TAE-Puffer bis zur vollständigen Auflösung gekocht und nach Abkühlung auf etwa 60°C mit 0,001 % (w/v) Ethidiumbromid versetzt. Die heiße, flüssige Agarose wird in eine sorgfältig abgedichtete Flachbett-Gelkammer gegossen und ein entsprechend der jeweiligen Anwendung gestalteter Kamm senkrecht am oberen Ende der Gelkammer plziert. Nach ca. 40 min wird das erkaltete und erhärtete Agarose-Gel mit 1 \times TAE-Puffer überschichtet und der Kamm vorsichtig entfernt. Nach Versetzung der aufzutragenden DNA-Proben mit 6 \times DNA-Probenpuffer werden diese sowie ein geeigneter DNA-Standard (vgl. 2.1.10.1) mit Hilfe einer Pipette in separate Geltaschen gefüllt und 20 - 40 min bei 100 - 120 V aufgetrennt. Je nach Anwendung und der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente werden Gele mit Prozentigkeiten von 0,8 - 2,5 % hergestellt. Aufgrund der DNA-Interkalation des Ethidiumbromids ist die DNA durch die unter UV-Licht auftretende Fluoreszenz detektierbar.

2.2.1.10.1 Analytische DNA-Gelelektrophorese

Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Proben wird das Agarose-Gel auf einem UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) betrachtet und mit einem Gelscanner dokumentiert. Durch Vergleich mit dem zusätzlich aufgetragenen, aus verschiedenen DNA-Fragmenten definierter Größe bestehenden DNA-Standards kann die Länge der aus einer Restriktion oder PCR-Amplifikation resultierenden DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

2.2.1.10.2 Präparative DNA-Gelelektrophorese

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Proben werden die zur Weiterverwendung benötigten DNA-Fragmente repräsentierenden Banden über einem UV-Transilluminator ($\lambda = 312 \text{ nm}$) mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Gel-Fragment erfolgt mit Hilfe des „Gel Extraction Kit“ (vgl. 2.1.11) gemäß den Angaben des Herstellers. Das Reinigungsprinzip beruht auf der Fähigkeit der DNA, bei hohen Salz-Konzentrationen an die Silica-Membran der Säule zu binden. Da Verunreinigungen nicht an das Säulen-Material binden, kann nach einem Waschschrift unter Niedrigsalz-Bedingungen saubere DNA von der Säule eluiert werden.

2.2.1.11 TOPO TA-Klonierung

Die Abspaltung von wenigen endständigen Basenpaaren eines PCR-Fragmentes durch DNA-Restriktionsenzyme ist häufig sehr problematisch oder zumindest unvollständig, was den Erfolg einer Klonierung stark minimiert. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das TOPO TA-Cloning Kit verwendet (vgl. 2.1.11). Bei diesem wird das PCR-Produkt, das restringiert werden soll, zunächst ungerichtet in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert. Dabei wird die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase ausgenutzt, die dazu führt, daß an das 3'-Ende der PCR-Produkte jeweils ein einzelnes Desoxyadenosin angehängt wird. Der pCR2.1-TOPO-Vektor liegt linearisiert vor und besitzt an beiden 5'-Enden ein überhängendes Desoxythymidin. Der Vektor ist außerdem bedingt durch die Ligase-Aktivität der an beiden seiner Enden kovalent gebundenen Topoisomerase I aktiviert. Bei der Ligation können die überhängenden Desoxyadenosine der PCR-Produkte mit den überhängenden Desoxythymidinen des Vektors hybridisieren. Die Topoisomerase I katalysiert dann die Ligations-Reaktion, wodurch die Ligation äußerst effizient verläuft, und dissoziiert anschließend vom

Vektor. Die TOPO TA-Klonierung und die anschließende Transformation der in dem Reagenzienset enthaltenen und bei -80°C gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen („TOP 10“) erfolgt strikt nach der Anleitung des Herstellers. Zum Schluß werden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB/Amp-Agarplatten, auf denen zuvor jeweils 40 µl „Bluo-Gal“ (40 mg/ml; BIOMOL, Hamburg) verteilt wurden, gleichmäßig ausgestrichen. Anschließend werden die Platten ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag können weiße Kolonien weiter analysiert werden. Bei diesen wird, im Gegensatz zu den blauen Kolonien, der Leserahmen des *lacZ*-Gens infolge einer DNA-Insertion zerstört, aufgrund dessen das farblose „Bluo-Gal“ nicht in einen blauen Farbstoff umgesetzt werden kann. Einige der weißen, putativ positiven Kolonien werden zur Animpfung einer ÜN-Kultur (vgl. 2.2.3.1.1) zwecks Isolierung von Plasmid-DNA (vgl. 2.2.3.6) herangezogen. Das zunächst ungerichtet klonierte PCR-Fragment kann nun durch die Restriktionsenzyme effizient aus dem TOPO-Vektor geschnitten und aufgrund der in den Bakterien erfolgten Amplifikation des Vektors auch in größerer Menge gewonnen werden.

2.2.1.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (Polymerase-Kettenreaktion) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifizierung von Nucleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz (Mullis *et al.* 1986; Mullis und Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988). Das Verfahren basiert auf der Nutzung thermostabiler DNA-Polymerasen, die von chemisch synthetisierten Oligodesoxynucleotiden („Primer“) ausgehend einen Einzel- zum Doppelstrang vervollständigen können. Die PCR ist ein zyklischer Prozeß bestehend aus Denaturierung einer DNA-Matrize (*template*), der Primer-Hybridisierung (*annealing*) und der Synthese des komplementären DNA-Stranges unter Einbau von dNTPs und führt zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten DNA-Fragments. Die aus den thermophilen Bakterien *T. aquaticus* bzw. *P. furiosus* gewonnene *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase übersteht die zur Denaturierung notwendigen Temperaturen von über 90°C weitgehend unbeschadet. Die *Taq*-Polymerase zeichnet sich im Vergleich zur *Pfu*-Polymerase durch eine erhöhte Prozessivität aus, was besonders für die Amplifikation langer DNA-Sequenzen günstig ist. Die Spezifität der Primer-Bindung ist abhängig von der Hybridisierungs-Temperatur, dem GC-Gehalt der Sequenz und der Anzahl an Basen. Die Primer sollten mindestens 18 bp lang sein; eine höhere Anzahl an Basen steigert bei nicht degenerierten Primern die Spezifität. Weiterhin dürfen die Primer nicht zur Ausbildung interner „hairpin“-Strukturen bzw. Primer-Dimere befähigt sein, da dies zur Verringerung der

Konzentration an freien Primern im Ansatz führen würde. Mit folgender „Laborformel“ kann die spezifische Bindungs-Temperatur (Annealing-Temperatur) abgeschätzt werden. Diese muß jedoch meist durch zahlreiche experimentelle Ansätze genauer bestimmt werden:

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

Die Neusynthese der DNA durch die *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase erfolgt bei 72°C, da die Aktivität der Enzyme bei dieser Temperatur ihr Optimum besitzt. Die Höhe der Annealing-Temperatur und die Dauer der einzelnen Phasen sind je nach Experiment, Intention des Versuchs und dem verwendeten Thermocycler unterschiedlich. Nach 25 bis 35 Wiederholungen des Zyklus kann sich optional ein terminaler Elongations-Schritt von 5 min bei 72°C anschließen. Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl setzt sich wie folgt zusammen; die PCR findet in einem Thermocycler mit einem Temperatur-Profil ähnlich dem nachstehend angegebenen statt:

x µl	DNA als <i>template</i> (200 pg)	Denaturierung (initiale): 5 min 96°C 25 –35 Zyklen: $\left\{ \begin{array}{l} 1 - 2 \text{ min } 96^\circ\text{C} \\ x \text{ min } x^\circ\text{C} \\ y \text{ min } 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$ Elongation (optional): 5 min 72°C
y µl	5'-Primer (250 pmol)	
y' µl	3'-Primer (250 pmol)	
5 µl	dNTP-Mix (jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	
z µl	dH ₂ O	
5 µl	10 × Polymerase-Puffer	
5 µl	DMSO	
1 µl	<i>Taq</i> - bzw. <i>Pfu</i> -Polymerase	
50 µl	Gesamtvolumen	

Bei Benutzung von Thermocyclern ohne beheizten Deckel werden die Ansätze mit sterilem Mineralöl überschichtet, um eine Verdampfung der Ansätze zu unterbinden. Aliquots der PCR-Ansätze von 5 µl bis 10 µl werden auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Amplifikations-Produkte so nachgewiesen.

2.2.1.13 PCR-Schnelltest

Vor der Aufarbeitung größerer Mengen Bakterien ist eine Überprüfung des Erfolgs der durchgeführten Ligation einschließlich der nachfolgenden Transformation durchzuführen um zu gewährleisten, daß die transformierte DNA den korrekten Vektor mit dem entsprechenden Insert repräsentiert. Hierzu können die nachstehend beschriebenen Methoden angewendet werden: durch eine Isolation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (vgl. 2.2.3.6) mit an-

schließender Restriktionskontrolle (vgl. 2.2.1.2), einer DNA-Sequenzierung mit geeigneten Primern (vgl. 2.2.1.15) oder durch einen PCR-Schnelltest. Für letzteren werden einzelne putativ positive Kolonien mit einer sterilen Einmalspitze von der Agarplatte abgenommen und ein kleiner Teil der Zellen in ein steriles PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die Einmalspitze selbst wird dann parallel zur Animpfung einer ÜN- oder ÜT-Kultur eingesetzt. Die PCR wird unter den nachfolgenden Bedingungen durchgeführt:

1 Kolonie	DNA als <i>template</i>	Denaturierung (initiale):	5 min	96°C
x µl	5'-Primer (40 pmol)	25 Zyklen: {	30 s	96°C
x' µl	3'-Primer (40 pmol)		30 s	56°C
2 µl	dNTP-Mix (jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		1 min	72°C
y µl	dH ₂ O	Elongation (optional): 5 min 72°C		
2 µl	10 × Polymerase-Puffer			
0,15 µl	<i>Taq</i> -Polymerase			
20 µl	Gesamtvolumen			

Bei den Primern handelt es sich um Oligodesoxynucleotide, die mit dem Vektor bzw. dem Insert hybridisieren. Daher kann die PCR nur bei Vorhandensein des Vektors sowie des Inserts in der korrekten Orientierung ablaufen. Der Erfolg der PCR-Amplifikation wird durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze in einem Agarose-Gel überprüft (vgl. 2.2.1.10). Die ÜT- bzw. ÜN-Kulturen der auf diese Art als positiv identifizierten Kolonien werden nachfolgend aufgearbeitet (vgl. 2.2.3.6). Durch den PCR-Schnelltest kann eine große Anzahl Kolonien einfach und schnell getestet werden.

2.2.1.14 PCR-*in vitro*-Mutagenese

Zur gezielten Einführung von Punktmutationen in das Ras-Gen wurde eine in **Abbildung 2.1** dargestellte Mutagenese-Methode, bestehend aus zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten, angewendet (Barettino *et al.* 1994). Für diese Methode wird ein 3'-Mutagenese-Primer und jeweils ein 5'- und 3'-flankierender Primer (Primer A und Primer B) benötigt. Weiterhin muß die zu verändernde DNA-Sequenz in zwei verschiedenen Vektoren vorliegen, so daß der 5'-Primer des ersten PCR-Schrittes nicht mit der *template*-DNA des zweiten PCR-Schrittes hybridisieren kann. Der erste Amplifikationsschritt dient der Erzeugung eines sogenannten „Mega-Primers“. In diesem ersten Schritt wird der mit dem DNA-Insert hybridisierende 3'-Mutagenese-Primer und der mit dem Vektor 1 (hier pcDNA3) hybridisierende 5'-Primer eingesetzt. Der so entstehende, die gewünschte Mutation aufweisende „Mega-Primer“ wird

mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.1.10.2) isoliert und gereinigt. In die zweite PCR wird der das DNA-Insert enthaltende und als *template*-DNA fungierende Vektor 2 (hier pSVK3), der „Mega-Primer“ und der flankierende 5'- und 3'-Primer eingesetzt. In den ersten 10 Zyklen der zweiten PCR wird aufgrund einer langen Annealing-Phase von 10 min die Bindung des langen „Mega-Primers“ ermöglicht; es erfolgt zunächst eine exponentielle Amplifikation von DNA-Strängen, welche die Sequenz des „Mega-Primers“ inklusive der Punktmutation und des 3'-Primers umfassen; diese fungieren in den folgenden 25 Zyklen als DNA-Matrize. DNA-Stränge, welche in den sich anschließenden Zyklen nicht als *template*-DNA fungieren können und folglich den Hintergrund bilden, werden in dieser ersten Phase der zweiten PCR lediglich linear amplifiziert. In den folgenden 25 Zyklen wird aufgrund der stark verkürzten Annealing-Phase die Hybridisierung des kürzeren 5'-Primers, welcher keine Sequenz-Komplementarität mit dem Vektor 2 aufweist, gegenüber der des längeren „Mega-Primers“ bevorzugt, so daß es nun ausschließlich zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten Sequenz-Bereichs ohne störende Hintergrund-Amplifikation kommt.

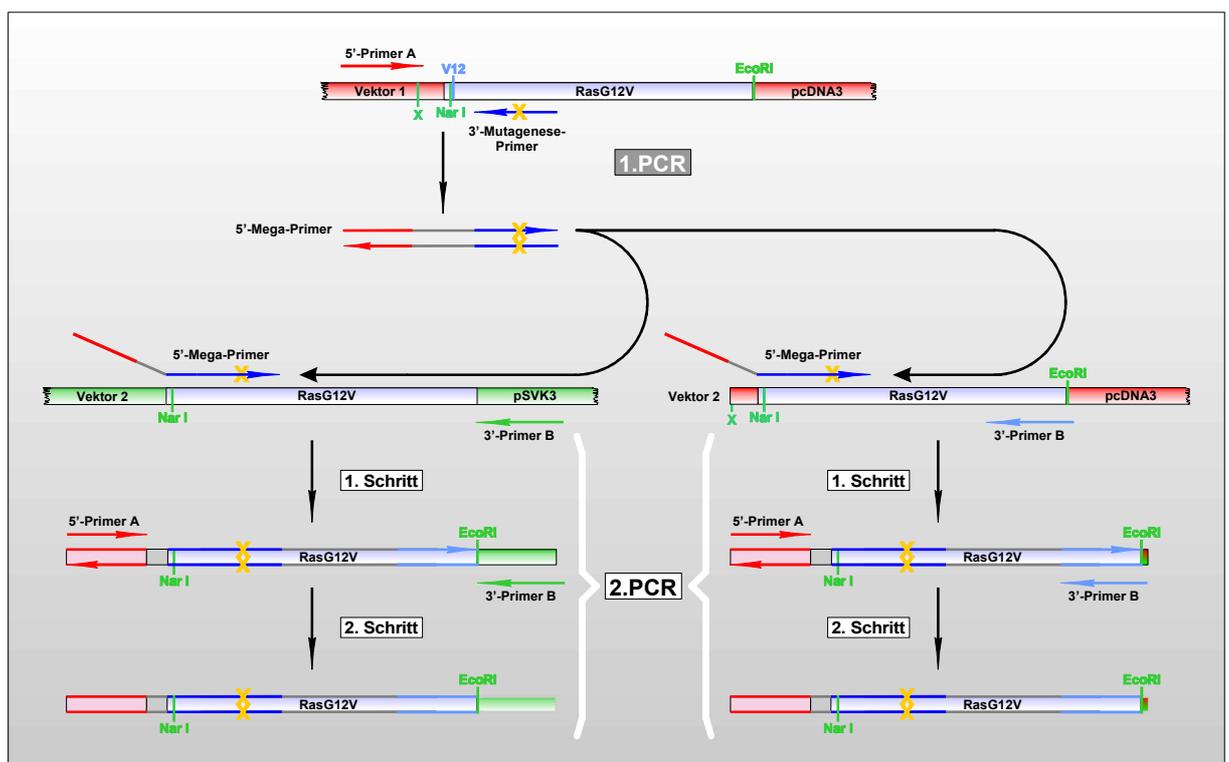


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese

Die gezielte Einführung von Punktmutationen in das RasG12V-Konstrukt erfolgte in zwei PCR-Schritten (verändert nach Baretino *et al.*); Primer A = 5'-Seq-pcDNA3 / Primer B = 3'-Seq-pSVK3 bzw. 3'-Ras C-term EcoRI (vgl. Abbildung 2.10); nähere Erläuterungen im Text.

Liegt die zu verändernde DNA-Sequenz nicht in zwei verschiedenen Vektoren vor, so kann in die zweite PCR als DNA-Matrize alternativ auch die durch DNA-Restriktion *upstream* (5'-wärts) des DNA-Inserts im Bereich des Vektors linearisierte *template*-DNA der ersten PCR verwendet werden. Voraussetzung ist die Existenz einer Erkennungs-Sequenz für eine Restriktionsendonuklease in diesem Bereich, welche jedoch nicht innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Inserts vorkommt. Typische Reaktionsansätze von 50 µl für die beiden PCR-Schritte setzen sich wie folgt zusammen; für beide PCR-Amplifikationen wird die *Pfu*-Polymerase verwendet, welche sich im Vergleich zur *Taq*-Polymerase durch eine deutlich geringere Fehlerrate auszeichnet; die PCRs finden in einem Thermocycler mit den nachstehend angegebenen Temperatur-Profilen statt:

1. PCR

x	µl	Vektor 1 (<i>template</i> -DNA, 200 pg)
y	µl	5'-Primer A (200 pmol)
y'	µl	3'-Mutagenese-Primer (200 pmol)
5	µl	dNTP-Mix (jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
z	µl	dH ₂ O
5	µl	10 × Polymerase-Puffer
5	µl	DMSO
1	µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
<hr/>		
50	µl	Gesamtvolumen

Denaturierung (initiale): 5 min 96°C

30 Zyklen: $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ min} \quad 96^\circ\text{C} \\ x \text{ min} \quad 53 - 62^\circ\text{C} \\ y \text{ min} \quad 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$

2. PCR

x	µl	Vektor 2 (<i>template</i> -DNA, 200 pg)
y	µl	5'-Primer A (200 pmol)
y'	µl	3'-Primer B (200 pmol)
y''	µl	„Mega-Primer“ aus der 1. PCR
5	µl	dNTP-Mix (jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
z	µl	dH ₂ O
5	µl	10 × Polymerase-Puffer
5	µl	DMSO
1	µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
<hr/>		
50	µl	Gesamtvolumen

Denaturierung (initiale): 5 min 96°C

10 Zyklen: $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ min} \quad 96^\circ\text{C} \\ 10 \text{ min} \quad 53^\circ\text{C} \\ 2 \text{ min} \quad 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$

20 - 25 Zyklen: $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ min} \quad 96^\circ\text{C} \\ 1 \text{ min} \quad 53^\circ\text{C} \\ 2 \text{ min} \quad 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$

Elongation (optional): 5 min 72°C

2.2.1.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels zyklischer Sequenzierung unter Benutzung des „ABI PRISM® BigDye™ Terminators v3.0 Cycle Sequencing Kits“ (vgl. 2.1.11) mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs und beruht auf der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*

1977). Die Sequenzierungs-Ansätze setzen sich wie folgt zusammen; die Sequenzierungs-Reaktion fand in einem Thermocycler mit nachstehendem Temperatur-Profil statt:

x μ l	Plasmid-DNA (0,5 μ g)	Denaturierung: 30 s 96°C 25 Zyklen: $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ s } 96^\circ\text{C} \\ 15 \text{ s } 50^\circ\text{C} \\ 4 \text{ min } 60^\circ\text{C} \end{array} \right.$
2,0 μ l	„Terminator-Mix“	
y μ l	dH ₂ O	
<u>2,0 μl</u>	<u>Sequenzierungs-Primer [3,2 pmol/μl]</u>	
10 μ l	Gesamtvolumen	

Der Terminator-Mix enthält neben den vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten ddNTPs die thermostabile *AmpliTaqFS*-DNA-Polymerase und dNTPs. Nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTPs werden im Anschluß an die Sequenzierungs-Reaktion durch eine Ethanol-Präzipitation der DNA-Produkte entfernt. Dazu werden die Sequenzierungs-Ansätze mit 1 μ l Dextran-Blau als Fällungshilfe, 2 μ l 3M NaAc (pH 5,2) sowie 50 μ l absolutem Ethanol (-20°C) versetzt und 20 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird das DNA-Präzipitat zur Entfernung kopräzipitierter Salze, welche das Laufverhalten der Proben bei der späteren gelelektrophoretischen Auftrennung stark beeinträchtigen würden, dreimal durch Zugabe von 70 %igem Ethanol und erneuter Zentrifugation gewaschen. Die DNA wird durch Inkubation für 2 min bei 65°C oder unter Vakuum getrocknet. Die Sequenzanalysen wurden mit dem ABI PRISM® 373A DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems (ABI) in der „Zentralen Einrichtung Synthese und Sequenzierung“ des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie, Dortmund durchgeführt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

2.2.2.1.1 mit Bicinchoninsäure (BCA)

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration wurde unter anderem das *BCA Protein Assay Reagent* verwendet (vgl. 2.1.11). Das als wasserlösliches Natriumsalz vorliegende BCA bildet mit Cu¹⁺-Ionen in einer Stöchiometrie von 2:1 einen stabilen, wasserlöslichen, violetten Komplex, der bei 562 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. Peptidbindungen und die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan sowie Tyrosin sind in alkalischen Protein-Lösungen für die Reduktion des zweiwertigen Cu²⁺ zu Cu¹⁺ verantwortlich. In dem Reagenz A sind

Na_2CO_3 , NaHCO_3 , BCA-Detektions-Reagenz und Natriumtartrat (pH 11,25) enthalten; Reagenz B ist eine 4 %ige CuSO_4 -Lösung. Die Arbeitslösung wird durch Mischen von Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1 hergestellt. Danach werden 2 ml der Arbeitslösung mit 0,1 ml der Protein-Lösung gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wird die OD_{562} der Proben bestimmt. Die Auswertung erfolgt gegen eine Blindprobe und anhand einer für jeden Test neu erstellten Eichgeraden. Hierzu wurde mittels BSA-Standard eine Konzentrationsreihe von 15, 30, 60 und $120\ \mu\text{g}$ BSA/ml hergestellt und wie oben beschrieben behandelt (Smith *et al.* 1985; Wiechelman *et al.* 1988).

2.2.2.1.2 nach Bradford

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford wurde das *Coomassie Protein Assay Reagens* verwendet (vgl. 2.1.11). Diese Bestimmungs-Methode beruht auf den Absorptionseigenschaften des Farbstoffes Coomassie[®]-Brilliant Blue G250, dessen Absorptionsmaximum sich bei der Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Zu 1 ml Bradford-Lösung werden 1 - 10 μl der zu messenden Protein-Lösung gegeben, gemischt und nach 5 min die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt gegen eine Blindprobe und anhand einer für jeden Test neu erstellten Eichgeraden. Hierzu wurde mittels BSA-Standard eine Konzentrationsreihe von 15, 30, 60 und $120\ \mu\text{g}$ BSA/ml hergestellt und wie oben beschrieben behandelt (Bradford 1976).

2.2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.2.2.2.1 SDS-PAGE

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus Zell-Lysaten unter denaturierenden Pufferbedingungen wurde unter anderem das System nach Lämmli (Lämmli 1970) verwendet. Hierbei werden Proteine proportional ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld vertikal aufgetrennt. Es werden Stufen-Gele mit den Abmessungen $9\ \text{cm} \times 6\ \text{cm} \times 1\ \text{mm}$ hergestellt. In die Apparatur wird bis etwa 1 cm unterhalb der Unterkante des später einzusetzenden Probenkamms Trenngel-Lösung eingefüllt und mit einer 0,1 %igen SDS-Lösung oder 70 %igem Ethanol überschichtet, welcher nach Beendigung der Polymerisation entfernt wird. In den noch verbleibenden, mittels Filterpapier getrockneten Spalt, wird die Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Probenkamm unmittelbar eingesteckt. Nach er-

folgt der Aushärtung des Sammelgels wird der Probenkamm vorsichtig entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Probenaschen nach der Befüllung der oberen Pufferkammer mit Elektrophorese-Puffer mit Hilfe einer Hamilton-Spritze sorgfältig ausgespült. Die Probenaschen werden nun jeweils mit bis zu maximal 35 µl der proteinhaltigen Proben, welche kurz zuvor mit 5 × SDS-Probenpuffer versetzt und durch Inkubation für 10 min in einem 96°C-Heizblock denaturiert wurden, beladen. Zum Zweck der späteren Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wird ein Protein-Standard mit aufgetragen. Die aufgetragenen Proben läßt man nun zunächst bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel in das Gel einlaufen, um danach die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 35 mA/Gel fortzusetzen. Die nachfolgende Tabelle zeigt ein Pipettierschema zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen verschiedener Prozentigkeiten. Durch Zugabe von APS wird die Polymerisierung gestartet. Daher wird dieses erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben.

[ml]	Sammelgel-Lösung (10 ml)				Trenngel-Lösung (30 ml)									
	3 %	3,6 %	3,9 %	4,5 %	6,5 %	7 %	7,5 %	8 %	9 %	10 %	11 %	12 %	15 %	18 %
AA	1,0	1,2	1,3	1,5	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	15,0	18,0
Puffer	2,5	2,5	2,5	2,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
dH ₂ O	6,5	6,3	6,2	6,0	15,8	15,3	14,8	14,3	13,3	12,3	11,3	10,3	7,3	4,3
TEMED	0,003	0,003	0,003	0,003	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
APS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tabelle 2.1 SDS-PAGE (nach Lämmli *et al.*)

Pipettierschema zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen verschiedener Prozentigkeiten. AA = Acrylamid-Lösung; Puffer = Sammelgel- bzw. Trenngel-Puffer.

2.2.2.2.2 Tricin-Gele

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus Zell-Lysaten unter denaturierenden Pufferbedingungen wurde unter anderem das System nach Schagger und Jagow (Schagger und Von Jagow 1987) verwendet. Wie bei der SDS-PAGE (vgl. 2.2.2.2.1) werden auch hier Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld vertikal aufgetrennt. Dieses Gel-System unterscheidet sich von dem nach Lämmli (vgl. 2.2.2.2.1) vor allem durch seine abweichenden Pufferbedingungen bzw. -systeme. Hier wird zur Herstellung von Sammelgel- und Trenngel-Lösung ein einheitlicher Gel-Puffer verwendet; bei der Elektrophorese jedoch werden zwei unterschiedliche Elektrophorese-Puffer (Anoden-

Puffer und Kathoden-Puffer) benutzt. Die Auftrennung der proteinhaltigen Proben erfolgt bei 30 V für 1 h und danach etwa weitere 5 h bei 110 V. Das übrige Prozedere stellt sich wie unter 2.2.2.2.1 beschrieben dar. Tricin-Gele liefern im Vergleich zu der SDS-PAGE deutlich schärfere Protein-Banden; der zeitliche Aufwand ist jedoch beträchtlich höher. Die nachfolgende Tabelle zeigt ein Pipettierschema zur Herstellung des Sammelgels und der Trenngele verschiedener Prozentigkeiten.

[ml]	Sammelgel-Lösung (12 ml)	Trenngel-Lösung (20 ml)				
	4 %	6 %	9 %	12 %	15 %	18 %
Acrylamid-Lösung	1,2	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0
Gel-Puffer	3,0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
Glycerin (86 %)	-	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
dH ₂ O	7,8	7,2	5,7	4,2	2,7	1,2
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabelle 2.2 Tricin-Gele (nach Schagger und Jagow)
Pipettierschema zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen verschiedener Prozentigkeiten.

2.2.2.3 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen

Die SDS- bzw. Tricin-Gele werden zur Färbung über Nacht in Coomassie-Färbelösung bewegt und am nachfolgenden Tag durch Schwenken in Entfärbelösung bei Raumtemperatur sukzessive bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Proteinbanden und gleichzeitiger Minimierung der blauen Hintergrundfärbung entfärbt. Dazu wird die Entfärbelösung regelmäßig gegen unverbrauchte, farblose oder über Aktivkohle regenerierte Lösung ersetzt. Der Vorgang der Entfärbung kann durch vorsichtige Erwärmung des in der Entfärbelösung befindlichen Gels in der Mikrowelle beschleunigt werden, wobei das Einatmen der entstehenden Methanol-Dämpfe zu vermeiden ist.

2.2.2.4 Protein-Transfer auf Membranen (Western-Blot)

Zur weiteren Untersuchung der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können diese unter Anwendung des sogenannten Western-Blot-Verfahrens auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert werden. Die auf der Membran fixierten Proteine sind dort immunologischen Nachweisverfahren zugänglich.

2.2.2.4.1 Tank-Blotting

Für den Protein-Transfer wurde unter anderem eine standardmäßige Blot-Apparatur (Biorad) verwendet. Die PVDF-Membran wird nach eindeutiger, randständiger Beschriftung mit Kugelschreiber und einer der Orientierung dienenden Abtrennung eines kleinen Eckstückes der Membran bis zur ihrer vollständigen Benetzung in Methanol geschwenkt. Im Anschluß erfolgt eine jeweilige Inkubation für 5 min in dH₂O und zur Äquilibration in Blot-Puffer. Bei der Handhabung der Membran sind Handschuhe zu tragen. Die Whatman-Papierfilter sowie die Kunststoffnetze der Blot-Apparatur werden vor dem Aufbau mit Blot-Puffer durchtränkt. Auf der Kathodenseite der Haltekassette wird zunächst ein Kunststoffnetz gefolgt von einem Whatman-Papierfilter positioniert. Anschließend wird das Protein-Gel gefolgt von der Membran vorsichtig und luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Membran wird wiederum ein Whatman-Papierfilter und ein weiteres Kunststoffnetz gelegt. Nach dem Verschließen der Haltekassette wird diese in die Blot-Apparatur eingespannt und der Tank mit vorgekühltem Blot-Puffer gefüllt, wobei innerhalb des Tanks platzierte, mit Eis gefüllte 50 ml-Falcon-Röhrchen eine ausreichende Kühlung während des für 1 h bei 96 V ablaufenden Transfers gewährleisten. Zusätzlich kann die gesamte Blot-Apparatur in einem 4°C-Kühlraum aufgebaut werden. Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Protein-Transfers kann die Membran nach Beendigung der Prozedur mit Ponceau S gefärbt werden (vgl. 2.2.2.5). Zur zusätzlichen Kontrolle ist parallel auch die Färbung des Protein-Gels durch Coomassie möglich (vgl. 2.2.2.3).

2.2.2.4.2 Semi-Dry-Blotting

Für den Protein-Transfer wurde unter anderem eine Fast-Blot-Apparatur (vgl. 2.1.13) benutzt. Die Handhabung der Apparatur sowie die Anordnung der verschiedenen Blot-Komponenten erfolgt dabei gemäß den Angaben des Herstellers. Wie beim Tank-Blotting (vgl. 2.2.2.4.1) werden die Whatman-Papierfilter und die PVDF-Membran durch Benetzung mit Methanol und anschließender Inkubation in dH₂O vorbehandelt. Zum Abschluß dieser Vorbehandlung wird eine Hälfte der Whatman-Papierfilter sowie die PVDF-Membran in Anoden-Puffer, die andere Hälfte der Whatman-Papierfilter in Kathoden-Puffer äquilibriert. Auf die als Anode fungierende untere Graphit-Platte werden zwei in Anoden-Puffer getränkte Whatman-Papierfilter positioniert und anschließend die äquilibrierte PVDF-Membran, gefolgt von dem Protein-Gel, vorsichtig und luftblasenfrei aufgelegt. Nachfolgend werden die übrigen, in Kathoden-Puffer getränkten Whatman-Papierfilter aufgelegt und die Apparatur durch Auflegen der oberen Kathoden-Platte geschlossen. Der Transfer erfolgte abhängig vom Moleku-

largewicht der zu transferierenden Proteine für 15 - 30 min mit einer konstanten Stromstärke von 5 mA/cm^2 Gelfläche. Während des gesamten Transfers wird die Apparatur durch ein aufgelegtes -20°C -Kühlkissen gekühlt. Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Protein-Transfers kann die Membran nach Beendigung der Prozedur mit Ponceau S gefärbt werden (vgl. 2.2.2.5). Zur zusätzlichen Kontrolle ist parallel auch die Färbung des Protein-Gels durch Coomassie möglich (vgl. 2.2.2.3). Das *Semi-Dry-Blotting* ist verglichen mit dem Tank-Blotting bei vergleichbarer Qualität des Protein-Transfers wesentlich schneller und von der Handhabung deutlich bequemer.

2.2.2.5 Ponceau S-Färbung membrangebundener Proteine

Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Protein-Transfers kann die Membran nach Beendigung der Prozedur für etwa 5 min mit Ponceau S gefärbt und anschließend bis zur vollständigen Entfernung der Hintergrundfärbung und des deutlichen Hervortretens der Protein-Banden mit dH_2O entfärbt werden. Soweit bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben kein vorgefärbter Marker verwendet wurde, wird der mit aufgetragene Protein-Standard nun ebenfalls sichtbar und kann durch Kugelschreiber nachgezeichnet werden.

2.2.2.6 Immundetektion membrangebundener Proteine

Nach dem Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran können diese selektiv durch Antigen-spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

2.2.2.6.1 mittels „ECL Plus Western blotting detection system“

Zur Verhinderung unspezifischer Bindung von Antikörpern an die Membran müssen freie Bindungsstellen zunächst durch Inkubation in Blockierungs-Puffer über Nacht bei 4°C abgesättigt werden. Nach Entfernung des Blockierungs-Puffers wird die Membran am nächsten Tag für 1 h bei RT mit dem 1:10000 in Blockierungs-Puffer verdünntem Erst-Antikörper inkubiert. Zur Erhöhung der Spezifität der Antikörper-Bindung und damit zur Minimierung des Hintergrundes, kann alternativ auch eine ÜN-Inkubation bei 4°C erfolgen. Nachfolgend wird die Membran dreimal kurz, dreimal 5 min und nochmals dreimal für 15 min mit PBSMT gewaschen. Im Anschluß wird die Membran wiederum für 1 h bei RT mit einem spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichteten, Peroxidase-gekoppelten und

1:2000 in Blockierungs-Puffer gelösten Zweit-Antikörper inkubiert. Auch hier kann bei Problemen mit störendem Hintergrund die Stringenz der Antikörper-Bindung durch eine verlängerte Inkubationszeit bei 4°C erhöht werden. Überschüssige, nicht gebundene Zweit-Antikörper werden durch einen ausgiebigen Waschschrift durch PBST mit mindestens fünfmaligem Lösungswechsel entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper geschieht unter Verwendung des „ECL Plus Western blotting detection systems“ und gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Membran wird möglichst vollständig, ohne jedoch anzutrocknen, von dem sie benetzenden Puffer befreit. Im Anschluß wird die proteinständige Seite der Membran gleichmäßig mit einer 1:40-Mischung der beiden Reaktions-Reagenzien überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wird die Flüssigkeit wiederum möglichst vollständig und ohne Antrocknung entfernt. Die Membran wird daraufhin in Klarsichtfolie eingeschlagen und mit der proteinständigen Seite nach oben weisend in eine Expositions-Kassette gelegt. In einer Dunkelkammer wird nachfolgend ein ECL-Hyperfilm™ aufgelegt und dieser nach einer variablen Expositionsdauer von etwa 10 s bis 10 min entwickelt. Dazu wird der Film 5 min in Entwickler gelegt, mit Wasser gewaschen, für weitere 5 min in Fixierer gehängt und nach erneutem Waschen mit Wasser und abschließendem Abspülen mit dH₂O an der Luft getrocknet. Das Erscheinungsbild des entwickelten Films läßt sich auch durch Verkürzung der Entwickler-Inkubationszeit beeinflussen. Das hier verwendete System basiert auf der enzymatischen Erzeugung eines Acridinium-Esters, der mit Peroxiden in einem schwach alkalischen Milieu hydrolysiert wird und eine intensive Chemilumineszenz mit maximaler Emission bei 430 nm erzeugt. Das emittierte Licht führt zur Belichtung und nachfolgend zur Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms.

2.2.2.6.2 mittels „Western Breeze[®]-Kit“

Für die Immundetektion membrangebundener Proteine wurde unter anderem auch das „Western Breeze[®]-Kit“ benutzt. Die Prozedur entspricht grundsätzlich der unter 2.2.2.6.1 geschilderten, wobei hier jedoch die im Lieferumfang enthaltene Blockierungs-, Wasch- und Zweit-Antikörper-Lösung verwendet wurde. Der Zwei-Antikörper dieses Detektions-Systems ist jedoch an alkalische Phosphatase gekoppelt. In der Praxis hat sich gezeigt, daß die durch Verwendung des „Western Breeze[®]-Kit“ produzierten Resultate im Vergleich zu den bei Nutzung des „ECL Plus Western blotting detection systems“ in Kombination mit eigenen Komponenten erzielten Ergebnissen von deutlich höherer Qualität sind.

2.2.2.7 Entfernung proteingebundener Antikörper

Falls eine zweite Inkubation einer Membran mit Antikörpern erforderlich ist, können die Antikörper des vorausgegangenen Experiments von der Membran entfernt werden. Dazu wird die Membran mindestens 30 min bei 60°C in Stripping-Puffer bewegt. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Antikörper-Ablösung wird die Membran vor einer erneuten Antikörper-Inkubation nochmals mit ECL-Plus-Detektionsreagenz behandelt (vgl. 2.2.2.5) und ein Film zur Exposition über Nacht aufgelegt, welcher am nächsten Tag entwickelt wird.

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.2.3.1 Anzucht von Bakterien

2.2.3.1.1 Vorkultur / ÜN-Kultur

Von einer bei 4°C gelagerten Stammpatte oder aus einer bei -80°C gelagerten Glycerin-Kultur werden Bakterien mit einer sterilen Impföse in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium oder einen Glaskolben mit 10 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum in geeigneter Konzentration zugesetzt wurde (vgl. 2.1.2.1), überführt. Die Kulturgefäße werden über Nacht (ÜN) bei 37°C geschüttelt. Bei Verwendung des *E. coli*-Stammes TG1 ist eine deutlich geringere Inkubationszeit von ca. 6 - 8 h zu wählen.

2.2.3.1.2 Hauptkultur

Bei Bedarf größerer Bakterienmengen können wenige µl einer Vorkultur zur Animpfung eines größeren Kulturvolumens von 100 ml bis 500 ml verwendet werden. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler.

2.2.3.2 Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Aufbewahrung von (rekombinanten) Bakterienstämmen werden Glycerinstocks angelegt. Dazu werden 150 µl steriles Glycerin in ein sterilisiertes Serumgläschen gegeben, mit 850 µl einer Übernacht-Kultur gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wird ausgehend von einer 5 ml-Vorkultur (vgl. 2.2.3.1.1) eine 100 ml-Hauptkultur angeimpft. Dazu wird 1 ml der Vorkultur in 100 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) überführt. Die Kultur wird auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert bis die $OD_{600} = 0,4$ oder $0,95$ beträgt und anschließend für 20 min auf Eis gestellt. Nach ca. 5 min wird die Bakterien-Suspension mit $1200 \times g$ für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien werden in 10 ml frisch hergestelltem, eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert, mit 15 % Glycerin versetzt und in Aliquots von 100 µl bei -80°C eingefroren (Chung *et al.* 1989; Tang *et al.* 1994). Die Kompetenz der Zellen zur Aufnahme von Plasmid-DNA wird anschließend mit einigen der Aliquots überprüft (vgl. 2.2.3.5).

2.2.3.4 Transformation kompetenter Bakterien

Ziel der Transformation ist das Einschleusen rekombinanter Plasmid-DNA in das Bakterium. Dazu wird ein 100 µl-Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen (vgl. 2.2.3.3) auf Eis aufgetaut und mit 5 - 20 µl des Ligationsansatzes (vgl. 2.2.1.7) bzw. mit 1 - 5 ng Plasmid-DNA (*supercoiled*) versetzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42°C und anschließender Abkühlung auf Eis für 5 min werden 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Zellen unter leichtem Schütteln für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß werden die Zellen in einer Tischzentrifuge für 2 min bei 8000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Bakterien in 50 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert. Der gesamte Ansatz wird mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Das zu transformierende Plasmid besitzt ein als Selektionsmarker fungierendes Antibiotika-Resistenzgen, das ausschließlich den positiv transformierten Bakterien das Wachstum auf dem antibiotikahaltigen Medium ermöglicht. Nach Inkubation der Agarplatten bei 37°C über Nacht können die positiven Transformanten aufgrund ihres Wachstums identifiziert werden. Die Agarplatten werden mit Parafilm versiegelt und bei 4°C gelagert (Sambrock *et al.* 1989).

2.2.3.5 Bestimmung der Transformationseffizienz

Die Effizienz, mit der kompetente Zellen transformiert werden können, wird durch Auszählung der aus der Transformation eines Aliquots kompetenter Zellen erhaltenen Anzahl an Transformanten ermittelt. Dazu werden äquivalente Volumina kompetenter Zellen mit 0,1-

10 ng Plasmid-DNA (*supercoiled*) transformiert (vgl. 2.2.3.4). Die Transformationsrate ergibt sich wie nachstehend dargestellt und sollte zwischen 10^7 cfu/ μ g und 10^8 cfu/ μ g liegen:

$$\text{Transformationsrate} = \frac{\text{Kolonienzahl [cfu]}}{\text{transformierte Plasmid - DNA [ng]}}$$

2.2.3.6 Isolation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

2.2.3.6.1 ohne Reagenzienset

Die plasmidhaltigen Bakterien-Zellen einer unter Selektionsbedingungen angezogenen 5 ml-ÜN-Kultur (vgl. 2.2.3.1.1) werden für 5 min bei $1000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und das Bakterien-Pellet in 100 μ l Lösung I (Glucose-Mix) resuspendiert. Nachfolgend werden die osmotisch geschockten Zellen zwecks Lyse mit 200 μ l der Lösung II (NaOH-SDS-Lösung) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach maximal 5 min Inkubation bei RT wird die Denaturierung durch Zugabe von 150 μ l der Lösung III (Acetat-Mix) terminiert. Aufgrund der schnellen Folge von Denaturierung und Renaturierung fällt die chromosomale Bakterien-DNA als Netzwerk aus, während die kleinen Plasmide renaturieren. Direkt im Anschluß werden die Ansätze zur Entfernung von Verunreinigungen durch Proteine mit je 200 μ l Chloroform versetzt und mit einem Vortexer kurz gemischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation von 5 min bei $15000 \times g$ wird die obere plasmidhaltige Phase abgenommen und mit 1 ml eiskaltem 96 %igen Ethanol versetzt. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA werden die Ansätze mit einer Tischzentrifuge für 5 min bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit zentrifugiert. Das resultierende Nucleinsäure-Pellet wird mit ca. 500 μ l eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 5 min wie oben zentrifugiert und anschließend an der Luft oder unter Vakuum getrocknet. Nach Resuspendierung in 20 - 60 μ l TE-Puffer oder dH_2O werden die Ansätze zum Abbau der kopräzipitierten RNA mit RNase A in einer Endkonzentration von 20 μ g/ml versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert (Birnboim und Doly 1979; Le Gouill *et al.* 1994).

2.2.3.6.2 mit Reagenzienset

Die Isolierung von bis zu 20 μ g Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (vgl. 2.1.11) und basiert zum einen wie auch die Isolierung ohne Reagenzienset (vgl. 2.2.3.6.1) auf der alkalischen Lyse und zum anderen auf der selek-

tiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Silika-Matrix. 2×2 ml einer 5 ml-ÜN-Kultur, angeimpft durch eine vereinzelt *E. coli*-Kolonie (vgl. 2.2.3.1.1), werden in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 30 s bei 13.000 rpm pelletiert. Die weitere Isolation erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA ist aufgrund ihres hohen Reinheitsgrades sehr gut für weitere Anwendungen wie unter anderem Restriktionen, Ligationen und Sequenzierungen geeignet.

2.2.3.7 Isolation von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA, wie sie beispielsweise für die Transfektion eukaryontischer Zellen benötigt wird (vgl. 2.2.5.3), wurde das „JETstar Plasmid Maxiprep Kit“ (vgl. 2.1.11) verwendet. Dazu werden 200 - 400 ml LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt, mit 100 µl einer ÜN-Kultur (vgl. 2.2.3.1.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 rpm und 4°C werden die Bakterien am nächsten Tag pelletiert und anschließend in 15 ml E1-Puffer resuspendiert. Die weitere Prozedur erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers mit den entsprechend angepaßten, größeren Volumina an Lösungen. Nach der Isopropanol-Präzipitation der Plasmid-DNA wird die DNA kurz mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation bei 3600 rpm im Ausschwing-Rotor (JS 4.3) pelletiert. Nach der Trocknung kann die saubere Plasmid-DNA je nach Ausbeute in einer adäquaten Menge TE-Puffer oder dH₂O (pH = 7,5 - 8,5) aufgenommen werden.

2.2.4 Arbeiten mit Hefe

2.2.4.1 Anzucht von Hefen

2.2.4.1.1 Vorkultur / ÜN-Kultur

Die nicht transformierten Hefen einer bei 4°C gelagerten Stammplatte oder eines bei -80°C gelagerten Aliquots werden mit einer sterilen Impföse in ein Reagenzglas mit 5 ml YPD-Medium oder einen Glaskolben mit 10 ml YPD-Medium überführt. Die Kulturgefäße werden ÜN bei 30°C geschüttelt. Erfolgreich transformierte Hefen können bei Bedarf auch auf den entsprechenden SC-Medien (SC^{LT-} - bzw. SC^{LTH-}-Medium) wachsen (vgl. 2.2.4.4).

2.2.4.1.2 Hauptkultur

Bei Bedarf größerer Menge von Hefen können wenige ml einer Vorkultur zur Animpfung eines größeren Kulturvolumens von 100 - 250 ml verwendet werden. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler.

2.2.4.2 Lagerung von Hefen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Hefen können diese in SBEG suspendiert bei -80°C eingefroren und gelagert werden (vgl. 2.2.4.3). In SC^{LTH}-Medium gelöste Hefen können in dieser Form in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 4°C mittelfristig aufbewahrt werden und später gegebenenfalls für eine erneute Ausplattierung herangezogen werden (vgl. 2.2.4.5). Für eine dauerhafte Aufbewahrung ist außerdem die Anlegung einer Stammpatte empfehlenswert, die jeweils nach zwei bis drei Monaten umgestrichen werden sollte. Dazu wird eine einzelne Kolonie der alten Stammpatte mit einer sterilen Impföse abgenommen und in etwas YPD-Medium verdünnt. Von dieser verdünnten Suspension oder von einem Aliquot kompetenter Hefen ausgehend wird eine neue Stammpatte angelegt. Dazu werden die vier Viertel einer unterteilten YPD-Agarplatte in charakteristischer Weise sukzessiv von der Peripherie zum Zentrum hin zickzackartig mit der Impföse bestrichen.

2.2.4.3 Herstellung kompetenter Hefen

Von einer Stammpatte wird zunächst eine einzelne Kolonie des Hefe-Stammes Y190 zur Animpfung einer Vorkultur in 5 ml YPD-Medium überführt und ÜT bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wird am Abend in 15 ml YPD-Medium überimpft und ÜN bei 30°C auf einem Schüttler kultiviert. Am folgenden Tag wird die ÜN-Kultur mit 250 ml vorgewärmtem YPD-Medium versetzt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 auf einem Schüttler bei 30°C bewegt. Die Hefe-Zellen werden anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 8000 × g in 50 ml-Falcon-Röhrchen abzentrifugiert und die Zell-Pellets nachfolgend in jeweils 25 ml sterilem SBEG vorsichtig resuspendiert und nochmals wie zuvor pelletiert. Die Hefe-Zellen werden zum Schluß in 2,5 ml SBEG gelöst und in 100 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren (Klebe *et al.* 1983).

2.2.4.4 Transformation kompetenter Hefen

Die entsprechenden benötigten Aliquots kompetenter Hefen werden in einem Thermoblock bei 30°C zügig aufgetaut. Jeweils 1,5 µg der gemeinsam zu transformierenden Plasmide (beispielsweise von pPC86- und pPC97-Konstrukten) werden in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 50 µl der aufgetauten kompetenten Hefen vorsichtig vermischt. Die Ansätze werden mit jeweils 750 µl PEG-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und bei zeitweiliger Invertierung für 1 h bei 30°C in einem Thermoblock inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock von 5 min bei 45°C. Nach Zentrifugation für 2 min bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge werden die sedimentierten Hefen in sterilem NB-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 4000 rpm werden 900 µl des Überstandes mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und die Hefen in der restlichen, im Eppendorf-Reaktionsgefäß zurückgebliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Im Anschluß werden mit Hilfe steriler Glaskügelchen jeweils 20 µl eines jeden Transformations-Ansatzes auf einer LT⁻-Platte und die jeweils verbleibenden 80 µl auf einer LTH⁻-Platte verteilt. Die Platten sollten dazu vorgewärmt sein und werden anschließend für etwa 3 - 6 Tage bei einer Temperatur von 30°C inkubiert, bis Kolonien identifiziert werden können. Wachstum auf den LT⁻-Platten zeigt die erfolgreiche Kotransformation der zwei verschiedenen Plasmide an. Wachstum auf den LTH⁻-Platten zeigt dagegen, daß die von den beiden kotransformierten Vektoren kodierten Proteine miteinander interagieren.

2.2.4.5 Two-Hybrid-Interaktions-Assay

Das GAL4-Two-Hybrid-Systems der Hefe *S. cerevisiae* ermöglicht die Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen *in vivo* und basiert auf dem aus zwei verschiedenen, physisch getrennten Protein-Domänen bestehenden Aufbau eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Die DNA-bindende Domäne (GAL4-DB) interagiert mit dem als "Upstream Activating Sequence" (UAS) bezeichneten DNA-Bereich. Die als "Activation Domain" (GAL4-AD) bezeichnete zweite Domäne aktiviert die Transkription durch Interaktion mit dem RNA-Polymerasekomplex. Im Hefe-Stamm Y190 wurde ein Teil des GAL4-Locus deletiert, so daß kein funktioneller Transkriptionskomplex gebildet werden kann. Fusioniert man die N-terminalen Aminosäuren 1 - 147 des GAL4-Proteins mit einem zu untersuchenden Protein X im korrekten Leserahmen und in gleicher Weise die C-terminalen Aminosäuren 768 - 881 mit einem zweiten Protein Y, so entsteht nur dann ein funktioneller Transkriptionskomplex, wenn Protein X und Protein Y mit ausreichender Affinität interagieren (Chien *et al.* 1991;

Fields und Song 1989; Fields und Sternglanz 1994; Iwabuchi *et al.* 1993; Li und Fields 1993). Der gebildete Transkriptionsaktivator ist dann in der Lage, die Expression eines oder mehrerer Reportergene zu initiieren (**Abbildung 2.2**). In dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Two-Hybrid-System sind dies die Gene *GAL-HIS3* und *GAL-lacZ*. Das *HIS3*-Gen ermöglicht Hefen des Stammes Y190 bei Interaktion der exprimierten, putativ interagierenden Proteine X und Y das Wachstum auf Medien ohne Histidin. Dem Medium wird zum Zweck der Kompensation der latenten, minimalen endogenen Transkription (*leaky promoter*) des *HIS3*-Reportergens 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol), ein kompetitiver Inhibitor der *HIS3*-kodierte Imidazolglycerolphosphatdehydrogenase, zugesetzt. So kann mit höherer Stringenz auf eine putative Protein/Protein-Interaktion hin selektiert werden. Das *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym β -Galactosidase und ermöglicht es, die Aktivität dieses Enzyms als Indikator für die Stärke einer Protein/Protein-Interaktion zu nutzen. Die häufigste Anwendung dieses Systems ist die Suche nach neuen Protein/Protein-Interaktionen durch die Untersuchung der Genprodukte einer cDNA-Bank hinsichtlich ihrer möglichen Interaktion mit einem sogenannten Köderprotein. In einem modifizierten Verfahren können beispielsweise Effekte von Punktmutationen im Bereich von Protein/Protein-Kontaktflächen auf die Affinität zweier Proteine untersucht werden. Diese Effekte können dabei anhand der durch das Reportergen vermittelten β -Galactosidase-Aktivität qualitativ oder semiquantitativ bestimmt werden (Daub *et al.* 1998; Jaitner *et al.* 1997).

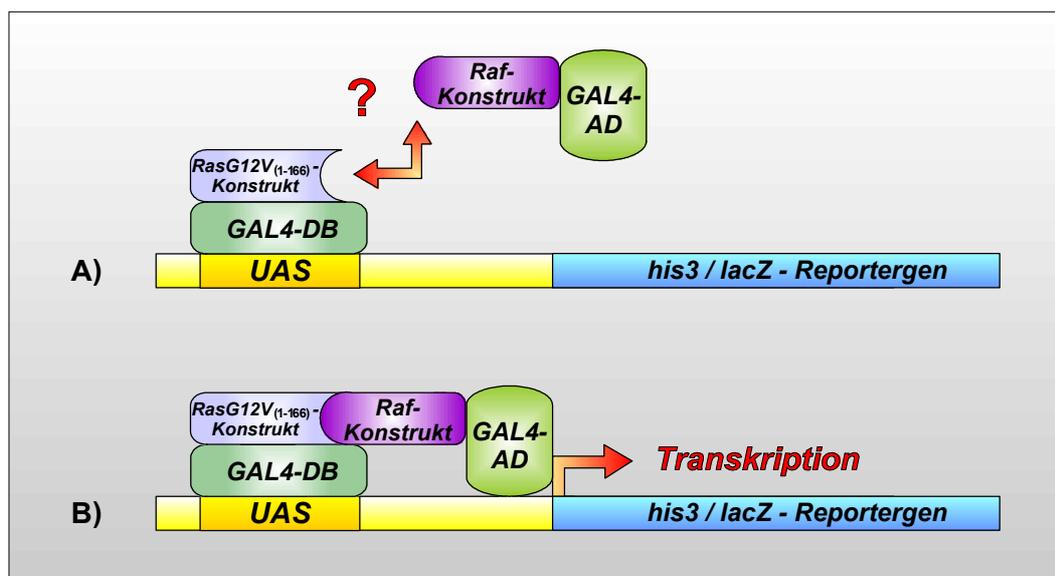


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des GAL4-Two-Hybrid-Systems

A) Interagieren das Raf-Konstrukt und das RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Protein nicht miteinander, erfolgt keine Transkription des Reportergens. **B)** Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine wird das Reportergen transkribiert und exprimiert. GAL4-DB = DNA-bindende Domäne (pPC97-Vektor), GAL4-AD = transaktivierende Domäne (pPC86-Vektor), UAS = *upstream activating sequence*.

Bis Ende der 80er Jahre war man für die Charakterisierung von Protein/Protein-Interaktionen auf zeitaufwendige biochemische Methoden angewiesen. Das GAL4-Two-Hybrid-System repräsentiert ein *in vivo*-System mit diversen methodischen Vorteilen, u.a. einem stark reduzierten Zeitaufwand.

2.2.4.5.1 Qualitativer *Two-Hybrid-Assay*

Die Stärke einer Protein/Protein-Interaktion spiegelt sich im Expressionsniveau der Reportergene wider. Bei positiver Interaktion der beiden Proteine wird die durch das *lacZ*-Gen des Hefe-Stammes Y190 kodierte Enzym β -Galactosidase exprimiert, welche β -D-Galactoside zu hydrolysieren vermag. Durch die Umsetzung des chromogenen Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo kann die Aktivität der β -Galactosidase detektiert werden. Nach der Hefe-Transformation mit zwei verschiedenen Two-Hybrid-Vektoren ist im Falle einer positiven Protein/Protein-Interaktion ein adäquates Wachstum der entsprechenden Hefe-Kolonien festzustellen. Dem Protokoll von Chevray *et al.* (1992) folgend, wird ein Filterpapier vorsichtig aber mit leichtem Druck auf die Hefe-Kolonien aufgelegt. Bei Abziehen des Filters bleiben die Hefen an diesem haften. Der Filter wird einige Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Permeabilität der Zellen für die exprimierte β -Galactosidase zu erhöhen. Der getrocknete Filter wird mit den Hefe-Kolonien nach oben weisend auf ein Whatman-Papierfilter gelegt, das sich in einer vollständig mit X-Gal-Puffer gesättigten Färbekammer befindet. Es folgt eine Inkubation des Filters für mindestens 30 min, längstens jedoch 12 h im Dunkeln bei 37°C. Je nach Zeitpunkt des Auftretens und der Intensität der Blaufärbung, ist eine Aussage über die Stärke der Protein/Protein-Interaktion möglich.

2.2.4.5.2 Semiquantitativer *Two-Hybrid-Assay*

Zur Quantifizierung der exprimierten, durch das *lacZ*-Reportergen kodierten β -Galactosidase wurde das „Galacto-Star™ Kit“ (vgl. 2.1.11) benutzt. Hierbei wird ein Chemilumineszenz-Substrat (Galacto-Star™) in Verbindung mit einem Lumineszenz-Verstärker (Sapphire-II™) eingesetzt. Der *Assay* ermöglicht laut Angabe des Herstellers eine Detektion von 2 fg bis 20 ng β -Galactosidase (Martin *et al.* 1997). Von den etwa fünf Tage nach der Transformation auf den Interaktions-Platten (LTH⁻-Platten) wachsenden Hefe-Kolonien werden ca. 10 Kolonien unterschiedlicher Größe mit einer sterilen Einmalspitze abgenommen und in 1 ml LTH⁻-Medium überführt. Nach der vollständigen Resuspendierung der Zellen durch mehr-

maliges Auf- und Abziehen mit einer Pipette werden jeweils etwa 50 μl auf vier neue, vorgewärmte LTH⁻-Platten (mit 25 mM 3-AT) ausplattiert. Von den nach etwa drei Tagen bei 30°C dicht bewachsenen LTH⁻-Platten werden die Hefe-Zellen von etwa 15 cm² geerntet und in 20 ml LTH⁻-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zelldichte werden jeweils 2 \times 1 ml jeder Hefe-Suspension in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der bestimmte OD₆₀₀-Wert sollte dabei zwischen 0,4 und 0,7 liegen; ist der Wert zu hoch, wird mit LTH⁻-Medium nachverdünnt, ist er zu niedrig, so werden nachträglich Hefe-Kolonien von der entsprechenden LTH⁻-Platte abgetragen und resuspendiert. Die für jeden der zu quantifizierenden Ansätze einzusetzende Zellzahl soll der von 6 ml einer Hefe-Suspension mit einer OD₆₀₀ = 0,6 entsprechen. Daraus ergibt sich für das jeweils abzunehmende Volumen einer Zell-Suspension mit einer OD₆₀₀ = X wie folgt:

$$\text{Volumen [ml]} = \frac{6[\text{ml}] \cdot 0,6[\text{OD}_{600}]}{X[\text{OD}_{600}]} = \frac{3,6}{X} [\text{ml}]$$

Jeweils zwei 10 ml-Corex-Röhrchen werden mit dem jeweils für die verschiedenen Ansätze ermittelten Volumen gefüllt. Die Röhrchen werden mit einem entsprechenden Volumen an LTH⁻-Medium auf das gleiche Gesamtvolumen eingestellt und in einem Ausschwing-Rotor (JS4.3) für 20 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig aber möglichst vollständig mit einer Pasteur-Pipette und einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Die sedimentierten Hefe-Zellen werden in 800 μl Z-Puffer resuspendiert und anschließend mit 50 μl 0,1 %iger SDS-Lösung und 50 μl Chloroform versetzt. Nachfolgend werden die Ansätze für exakt 30 s durch heftiges Vortexen aufgeschlossen. Nach erfolgter Lyse der Hefe-Zellen werden aus jedem Corex-Röhrchen jeweils 2 \times 60 μl Lysat in Luminometer-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 300 μl des das Substrat enthaltenen Reaktionspuffers, erfolgt eine Inkubation für mindestens 30 min bei RT. Im Anschluß kann die jeweilige Lichtemission in einem Luminometer gemessen werden. Pro geernteter LTH⁻-Platte werden letztlich 2 \times 2 = 4 Meßwerte erhalten und entsprechend gemittelt. Da ausgehend von jeder durchgeführten Hefe-Transformation zuvor jedoch jeweils vier neue LTH⁻-Platten angelegt wurden und sämtlich aufgearbeitet wurden, werden pro Transformation jedoch insgesamt vier solcher gemittelten Werte erhalten. Sowohl die Auswertung als auch die graphische Darstellung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Graphit (vgl. 2.1.14).

2.2.4.5.3 DNA-Konstrukte für das GAL4-Two-Hybrid-System

pPC86_{Xba} / pPC97_{Xba}

Zur Einführung einer für zukünftige Klonierungen benötigten *Xba*I-Schnittstelle in den pPC86- und pPC97-Vektor, wurden die ursprüngliche MCS (Polylinker) dieser Vektoren durch eine neue MCS ersetzt (Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4).

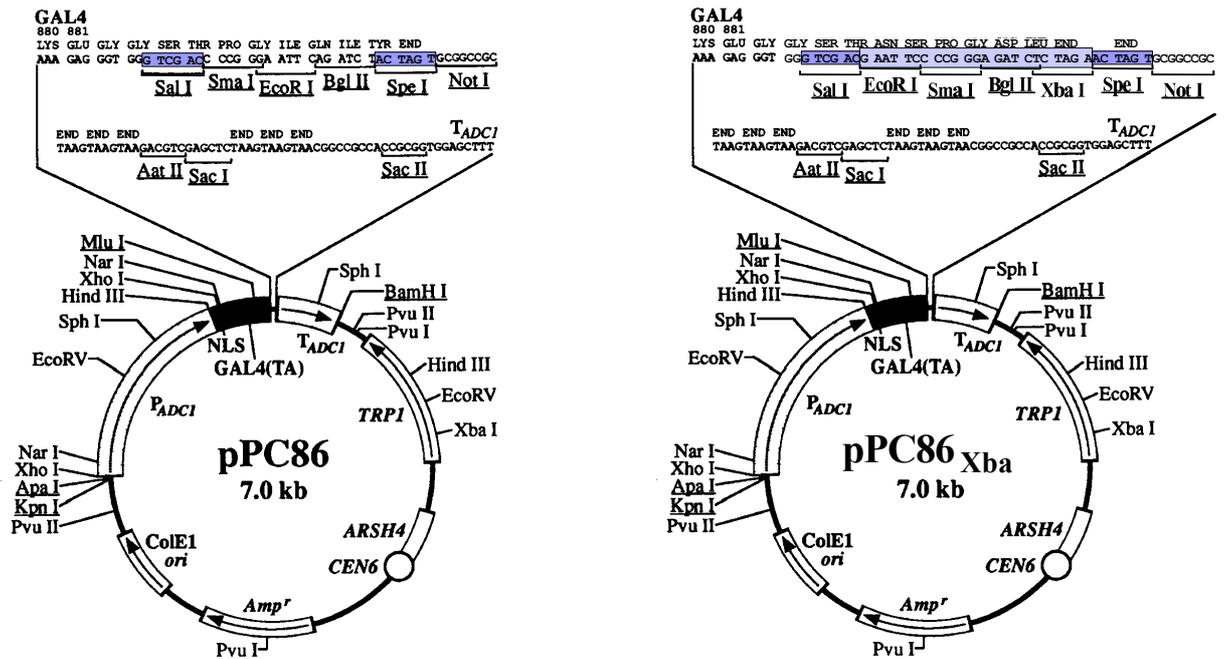


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des pPC86- und des pPC86_{Xba}-Vektors

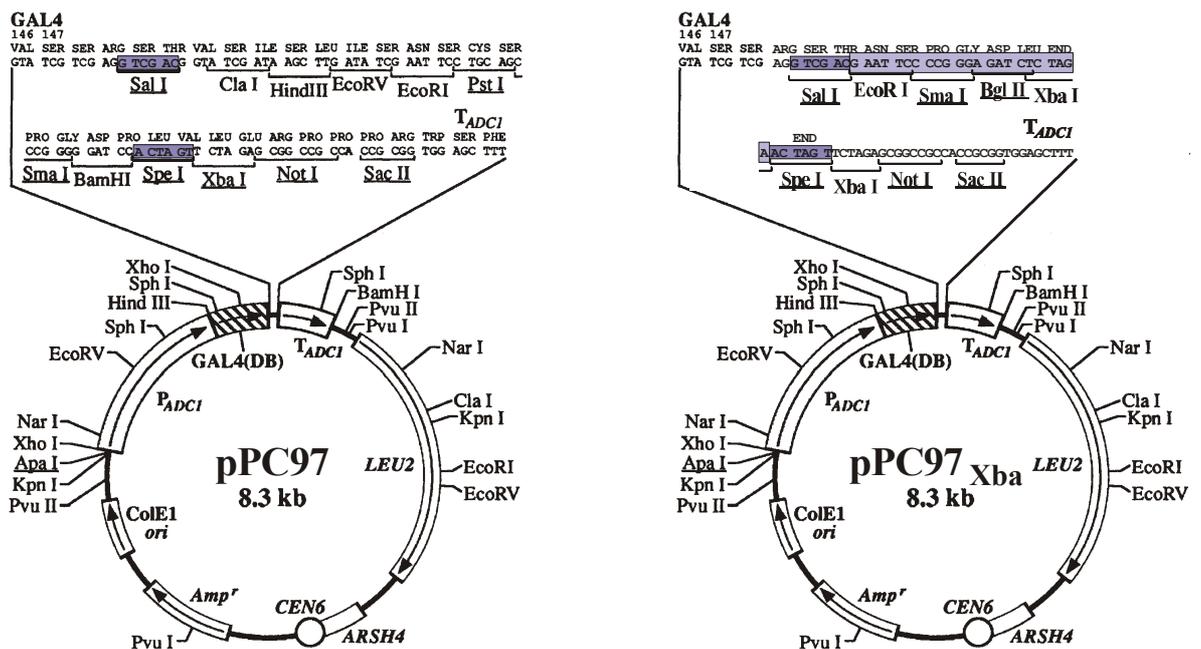


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des pPC97- und des pPC97_{Xba}-Vektors

Dazu wurden zunächst die beiden synthetischen Desoxyoligonucleotide pPC-MCS_{Xba}-sense und pPC-MCS_{Xba}-antisense hybridisiert (vgl. 2.2.1.8). Nach erfolgter Hybridisierung wurde sowohl der entstandene doppelsträngige MCS_{Xba}-Polylinker als auch der pPC86- bzw. pPC97-Vektor separat mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *SpeI* verdaut. Danach wurde der neue Polylinker gerichtet in die *SalI/SpeI*-linearisierten pPC-Vektoren kloniert (vgl. 2.2.1.7). Nach erfolgreicher Transformation der Ligationsansätze in kompetente *E. coli*-Zellen (vgl. 2.2.3.4) und Reisolation der Plasmid-DNAs (vgl. 2.2.3.6) erfolgte die Kontrolle der Klonierung anhand der mit der neuen MCS eingeführten *XbaI*-Restriktionsschnittstelle durch Linearisierung der Vektoren mittels der Restriktionsendonuklease *XbaI* und durch anschließende Sequenzierung putativ positiver Klone (vgl. 2.2.1.15).

pPC97_{Xba}-RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Mutanten

Sämtliche RasG12V-Mutanten wurden zunächst in Säuger-Expressionsvektoren als Voll-längenkonstrukte erzeugt (vgl. 2.2.5.9) und anschließend in den pPC97_{Xba}-Vektor wie nachstehend beschrieben umklont, wobei eine C-terminale Verkürzung der Ras-Konstrukte bis zur Aminosäure 166 stattfand. Die pSVK3-RasG12V-Mutanten wurden als DNA-Matrize in standardisierte PCR-Ansätze (vgl. 2.2.1.12) eingesetzt und das jeweilige RasG12V-Insert durch Verwendung des 5'-Ras N-term × *SalI*- und des 3'-Ras vk × *BglII*-Primers amplifiziert (vgl. 2.1.8 und **Abbildung 2.10**). Nachfolgend wurde sowohl der pPC97_{Xba}-Vektor als auch die durch präparative DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.1.10.2) isolierten PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *SalI* verdaut (vgl. 2.2.1.2). Danach wurden die restringierten und gereinigten PCR-Fragmente gerichtet in den *SalI/BglII*-linearisierten pPC97_{Xba}-Vektor kloniert (vgl. 2.2.1.7). Nach erfolgreicher Transformation der Ligationsansätze in kompetente *E. coli*-Zellen (vgl. 2.2.3.4) und Reisolation der Plasmid-DNAs (vgl. 2.2.3.6), erfolgte die Kontrolle über den Erfolg der Klonierungen durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *BglII*, wobei die ca. 500 bp großen RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Inserts freigesetzt werden. Nachfolgend wurden die als wahrscheinlich positiv charakterisierten Klone einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen (vgl. 2.2.1.15). Alle in den Vektoren pPC97_{Xba} respektive pPC97_{SS} vorliegenden RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Konstrukte werden nachfolgend vereinfachend mit dem verkürzten Präfix pPC97 bezeichnet.

pPC86_{SS}-c-Raf(DC1)

Das c-Raf(Δ C1)-Konstrukt wurde zunächst in dem Säuger-Expressionsvektor pcDNA3 erzeugt (vgl. 2.2.5.9) und anschließend in den pPC86_{SS}-Vektor wie folgt umklont. Das pcDNA3-Raf(Δ C1)-Konstrukt wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SalI* verdaut

(vgl. 2.2.1.2) und durch präparative DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.1.10.2) isoliert. Im Anschluß wurde das restringierte DNA-Fragment gerichtet in den *Bgl*II/*Sal*I-linearisierten pPC86_{SS}-Vektor kloniert (vgl. 2.2.1.7). Nach erfolgreicher Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E coli*-Zellen (vgl. 2.2.3.4) und Reisolation der Plasmid-DNA (vgl. 2.2.3.6), erfolgte die Kontrolle über den Erfolg der Umklonierung durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Sal*I, wobei das ca. 1,9 kb große c-Raf(Δ C1)-Inserts freigesetzt wird. So identifizierte, potentiell positive Klone wurden im Anschluß sequenziert (vgl. 2.2.1.15). Die in dem pPC86_{SS}-Vektor vorliegenden Raf-Konstrukte werden nachfolgend vereinfachend mit dem verkürzten Präfix pPC86 bezeichnet.

2.2.5 Arbeiten mit Säugerzellen

2.2.5.1 Zellkultur-Bedingungen

Die Kultivierung der RK13-Zellen erfolgt in 250 ml-Zellkulturflaschen (ca. 75 cm²) mit 15 ml Kulturmedium oder in 5,5 cm- bzw. 9 cm-Zellkulturschalen (ca. 20 cm² bzw. 60 cm²) mit 5 ml bzw. 8 ml Kulturmedium. Die Zellen werden in einem Brutschrank bei 37°C und 7,5 % CO₂ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Die Kultivierung zur Aufrechterhaltung der Zellen und die Anzucht größerer Mengen an Zellen erfolgt in den Zellkulturflaschen; die Zellkulturschalen werden für die Transfektion der Zellen zur Durchführung von *in vivo*-Experimenten verwendet (vgl. 2.2.5.7 und 2.2.5.8). Kurz vor dem Erreichen völliger Konfluenz, nach zwei bis drei Tagen Kultivierung, wird eine Subkultivierung der Zellen durchgeführt. Diese erfolgte durch Passagieren, das heißt durch eine Überführung der Zellen unter Verdünnung in neue Kulturgefäße. Für diese Subkultivierung werden die Zellen zunächst zweimal mit 1 × PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und anschließend zwecks Ablösung der Zellen mit 1,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und für etwa 5 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Den trypsinisierten Zellen werden 8,5 ml Kulturmedium zugesetzt und durch heftiges Auf- und Abziehen mit einer elektrischen Pipettier-Hilfe bis zur möglichst vollständigen Vereinzelung der Zellen resuspendiert. Je nach Zelldichte werden 0,5 ml bis 1,5 ml in neue 250 ml-Zellkulturflaschen mit vorgelegten 15 ml Kulturmedium überführt. Vor Ausplattierung einer definierten Menge an Zellen kann ihre Konzentration in der Zell-Suspension unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer (Thoma-Zählkammer) genauer bestimmt werden (vgl. 2.2.5.2).

2.2.5.2 Zellzahl-Bestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der resuspendierten Zellen (vgl. 2.2.5.1) wird eine Neubauer-Zählkammer mit einem durch Anhauchen befeuchteten Deckglas bedeckt. Nachfolgend wird mittels einer Pipette ein Tropfen der Zell-Suspension seitlich des Deckglasrandes positioniert, welcher sich aufgrund von Kapillarkräften unter dem Deckglas verteilt. Unter dem Mikroskop erkennt man die in **Abbildung 2.5** dargestellte Felderung.

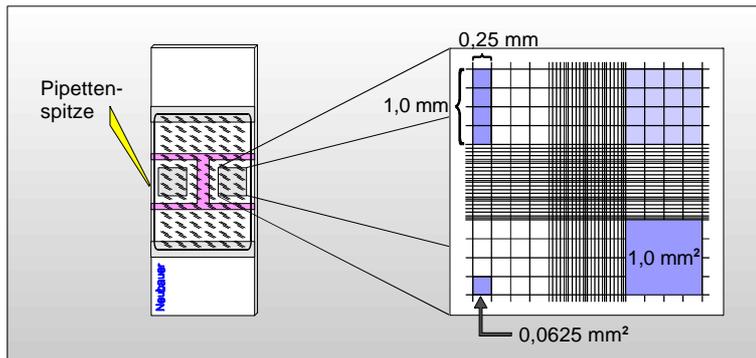


Abbildung 2.5

Die Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl an Zellen von mindestens vier einzelnen 1 mm^2 -Feldern wird bestimmt und der Mittelwert berechnet. Bei einer Schichtdicke des unter dem Deckglas befindlichen Flüssigkeitsfilms von $0,01 \text{ mm}$ ergibt sich ein erfaßtes Flüssigkeitsvolumen von $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ cm}^3$ bzw. 10^{-5} ml . Die Multiplikation der gemittelten Zellzahl pro 1 mm^2 mit dem Faktor 10^5 ergibt folglich die Zellzahl pro ml Zell-Suspension.

2.2.5.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Zur transienten Transfektion der RK13-Zellen wurde eine nach Jordan *et al.* modifizierte Calciumphosphat-Methode verwendet (Graham und van der Eb 1973; Jordan *et al.* 1996; Urabe *et al.* 2000). Diese beruht auf der Kopräzipitation von DNA und Calciumphosphat, welches bei der Vermischung einer Calciumchlorid-Lösung ($2,5 \text{ M CaCl}_2$) und einer phosphathaltigen Lösung ($2 \times \text{HEPES-Puffer}$) ausfällt. Unter sterilen Bedingungen werden $200 \mu\text{l}$ $2 \times \text{HEPES-Puffer}$ in sterilen $1,5 \text{ ml}$ -Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt und in einen Thermoblock mit konstanter Temperatur überführt. Die im Vorfeld aus den Lösungen I und II erstellten DNA-haltigen Lösungen (vgl. 2.2.5.7) von je $200 \mu\text{l}$ werden nun sukzessive und unter ständigem Schütteln des Thermoblocks zügig zugesetzt und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette gründlich gemischt. Die Einmalspitze wird nicht abgeworfen,

sondern mit dem Kulturmedium der bereitstehenden, die zu transfizierenden Zellen enthaltenden Zellkulturschale durch zweifaches Auf- und Abziehen mit der Pipette gespült, so daß auch die aufgrund der erhöhten Viskosität an der Innenwand der Einmalspitze haftende DNA-Lösung überführt wird. Das Flüssigkeitsgemisch von nunmehr 400 µl, in dem sich nun ein Calciumphosphat/DNA-Präzipitat bildet, wird mittels einer auf 450 µl eingestellten Pipette vollständig aufgenommen und in das Kulturmedium derselben Zellkulturschale gegeben. Auch hier wird die Einmalspitze nicht abgeworfen, sondern aus dem bereits geschilderten Grund, wie zuvor beschrieben, durch zweifaches Auf- und Abziehen mit der Pipette gründlich ausgespült. Zur Verteilung des Präzipitats in der Kulturschale sollte diese mehrfach und ausschließlich lateral bewegt werden; kreisende Bewegungen führen zu einer verstärkten Konzentrierung des Präzipitats im Zentrum der Kulturschale und so zu einer ungleichmäßigen Verteilung. Der Zeitraum von der Durchmischung der beiden Lösungen bis zur Übertragung in das Kulturmedium sollte nicht mehr als 1 min betragen, da die Größe des Präzipitats mit der Zeit zunimmt und die Transfektionseffizienz dadurch verringert wird. Die erfolgreiche Bildung des Calciumphosphat/DNA-Präzipitats kann unter einem Mikroskop beobachtet und kontrolliert werden. Die Zellkulturschalen werden nach erfolgter Transfektion in einem Brutschrank bei 37°C und 5,0 % CO₂ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % für mindestens 6 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen durch heftige rotierende und laterale Bewegungen der Zellkulturschalen einfach mit 5 ml 1 × PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gründlich gewaschen und nach Entfernung des PBS-Puffers mittels einer an einer Pumpe angeschlossenen, sterilen Pasteur-Pipette je nach experimentellem Vorgehen mit Kultur- oder Hungermedium überschichtet. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C und 7,5 % CO₂ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Die DNA-haltigen Lösungen setzen sich aus den Lösungen I und II zusammen, wobei die Lösung I für die entsprechende Anzahl von Proben als *master-mix* angesetzt und nach dem Vorlegen der individuell erstellten Ansätze (Lösung II) mit Hilfe einer automatischen Pipette auf die Ansätze verteilt wird (siehe auch 2.2.5.7). Bei Benutzung von 9 cm- statt 5,5 cm-Kulturschalen erhöhen sich sämtliche der einzusetzenden DNA-Mengen und Volumina um den Faktor 2,5.

2.2.5.4 Ernte adhärenter Säugerzellen

2.2.5.4.1 durch mechanische Ablösung

Die 5,5 cm- bzw. 9 cm-Kulturschalen werden nach Abziehen des überständigen Mediums zweifach mit $1 \times$ PBS gewaschen. Nachfolgend werden die Zellen durch Zugabe von 300 μ l bzw. 800 μ l des gemäß nachfolgender Experimente zu verwendenden adäquaten Lysis-Puffers pro Kulturschale, gefolgt von einer Inkubation für mindestens 10 min bei RT, lysiert. Im Anschluß werden die Zellen und Zell-Fragmente mit Hilfe eines Gummischabers von der Kulturschale abgelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zell-Lysate werden anschließend geklärt, indem die Proben-Gefäße zur Sedimentierung unlöslicher zellulärer Fragmente für 5 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert werden.

2.2.5.4.2 durch Trypsin-Behandlung

Die 5,5 cm- bzw. 9 cm-Kulturschalen werden nach Abziehen des überständigen Mediums einmal mit 5 ml bzw. 10 ml $1 \times$ PBS gewaschen und die Zellen nachfolgend durch Zugabe von 400 μ l bzw. 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Kulturschale abgelöst. Die Zellen werden nach kurzer Inkubationszeit durch Zugabe von 2,5 ml bzw. 5 ml Kulturmedium pro Schale und durch mehrfaches Auf- und Abziehen des Mediums sorgfältig resuspendiert. Die Zell-Suspension wird in vorgekühlte und auf Eis stehende 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und die Schale nochmals mit dem gleichen Volumen Kulturmedium abgespült, welches nachfolgend mit den zuvor geernteten Zellen vereinigt wird. Im Anschluß werden die Zellen durch Zentrifugation der 15 ml-Falcon-Röhrchen in einem Ausschwing-Rotor bei $2000 \times g$ und 4°C vorsichtig sedimentiert. Nachfolgend werden die Röhrchen wieder auf Eis gestellt, das überständige Kulturmedium behutsam dekantiert und die Restflüssigkeit mit einer an einer Pumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette vorsichtig und möglichst restlos abgezogen. Anschließend werden die Zell-Pellets in jeweils 7,5 ml eiskaltem $1 \times$ PBS resuspendiert und je zwei aus identischen Transfektionsansätzen hervorgegangene Zell-Suspensionen gegebenenfalls zu einem Gesamtvolumen von 15 ml vereinigt. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation unter den obigen Bedingungen und nachfolgend, wie bereits geschildert, das Abziehen der überständigen Flüssigkeit. Im Anschluß daran werden die Zell-Pellets in jeweils 5 ml eiskaltem $1 \times$ PBS resuspendiert und wiederum aus identischen Transfektionsansätzen hervorgegangene Zell-Suspensionen gegebenenfalls zu einem Gesamtvolumen von 10 ml vereinigt. Nach nochmaliger Zentrifugation und vollständigem Abziehen des Puffers werden die Zellen bis zu ihrer späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert

oder alternativ zwecks Zell-Lyse gemäß der nachfolgenden experimentellen Verwendung in der adäquaten Menge des entsprechenden Lysis-Puffers resuspendiert.

2.2.5.5 Bestimmung der Transformationseffizienz

Die Effizienz, mit der Säugerzellen transfiziert wurden, wird durch einen β -Galactosidase-Aktivitäts-Assay gesondert ermittelt. Zu diesem Zweck werden jeweils $2 \times 20 \mu\text{l}$ Zell-Lysate von jedem Ansatz in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und anschließend mit je $200 \mu\text{l}$ β -Gal-Puffer versetzt. Nachdem sich aufgrund der durch die β -Galactosidase vermittelten Umsetzung des Substrats eine deutliche Gelbfärbung der Proben zeigt, wird die Absorption bei 405 nm in einem ELISA-Photometer bestimmt. Der Abgleich erfolgt dabei gegen $4 \times 20 \mu\text{l}$ des ebenfalls mit je $200 \mu\text{l}$ β -Gal-Puffer versetzten Lysis-Puffers. Die beiden für die einzelnen Ansätze ermittelten individuellen Werte der Doppelbestimmung (β_1 und β_2) werden gemittelt ($\bar{b}_{1,2}$) und können als Korrekturfaktor dienen:

$$A_{kor.} = \bar{\Lambda}_{1,2} \cdot (\bar{b}_{1,2})^{-1} \quad (\text{vgl. 2.2.5.7}) \quad \text{und} \quad Vol_{kor} = Vol_{Max.} \cdot \frac{\bar{b}_{1,2 Min.}}{\bar{b}_{1,2}} \quad (\text{vgl. 2.2.5.8})$$

2.2.5.6 Immunpräzipitation von Proteinen aus Zell-Lysaten

Ausgehend von durch Zentrifugation geklärten Zell-Lysaten (vgl. 2.2.5.4), werden deren Protein-Konzentrationen bzw. Transfektionseffizienzen bestimmt (vgl. 2.2.2.1 und 2.2.5.5), gleiche Protein-Mengen bzw. Transfektions-Äquivalente repräsentierende Volumina entnommen und mit Lysis-Puffer auf ein identisches Gesamtvolumen gebracht. Das entsprechende Zielprotein wird nun mittels Protein-Agarose und spezifischer Antikörper präzipitiert. Auf ein Volumen von etwa $800 \mu\text{l}$ Zell-Lysat erfolgt die Zugabe von je $25 \mu\text{l}$ Protein G- oder Protein A-Agarose-Suspension, was $12,5 \mu\text{l}$ reinen Protein-Agarose-beads entspricht. $25 \mu\text{l}$ Protein-Agarose-Suspension vermögen $25 \mu\text{g}$ Antikörper zu binden. Ob die Verwendung von Protein A-Agarose oder von Protein G-Agarose angezeigt ist, hängt von dem im folgenden verwendeten Antikörper ab und ist den Produktbeschreibungen zu entnehmen. Nach der Zugabe von $20 \mu\text{g}$ Antikörper pro Ansatz erfolgt eine Inkubation der Reaktionsgefäße für 2 h bei 4°C auf einer vertikal rotierenden Plattform (Sonnenrad). Alle nun folgenden Arbeitsschritte sollten unter möglichst kühlen Bedingungen ablaufen, d.h. alle Lösungen sollten auf Eis vorgekühlt sein und auch die Reaktionsgefäße soweit möglich auf Eis inkubiert werden.

Im Anschluß an die zweistündige Inkubation wird die Agarose durch Zentrifugation der Ansätze in einer Tischzentrifuge für 3 min bei 2.500 rpm pelletiert. Der überständige Puffer wird nachfolgend mit einer in geeigneter Weise gebogenen und an einer Pumpe angeschlossenen Injektionsnadel vorsichtig abgezogen. Die Agarose-beads werden nun zweimal mit Lysis-Puffer gewaschen. Dazu werden diese in je 800 µl eiskaltem Lysis-Puffer durch sanftes Vortexen vorsichtig resuspendiert und im Anschluß wiederum durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 3 min bei 2.500 rpm pelletiert. Die *beads* werden durch die nun folgende Resuspendierung in 800 µl 1 × Kinase-Puffer (ohne DTE!) äquilibriert. Nach der sich wiederum anschließenden Pelletierung der Agarose-beads werden diese in 15 µl 2 × Kinase-Puffer (mit DTE!) resuspendiert. Die Ansätze können nachfolgend in einen Kinase-Aktivitäts-Assay eingesetzt werden (vgl. 2.2.5.8).

2.2.5.7 Luciferase-Reportergen-Assay

Mit Hilfe des Luciferase-Reportergen-Assays wurde analysiert wie sich verschiedene Mutationen in c-Raf 1 sowie in onkogenem RasG12V auf die Aktivierung des MAPK-Moduls (Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade) auswirken. Dazu wurden eukaryontische RK13-Zellen unter Anwendung der Calciumphosphat-Methode (vgl. 2.2.5.3) mit den entsprechenden Plasmid-DNAs transient transfiziert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank. Die Durchführung eines Luciferase-Reportergen-Assays erstreckt sich über vier Tage:

1. Tag: Ausplattierung der Zellen

Die in entsprechender Menge in Zellkulturflaschen herangezogenen Zellen werden durch eine Trypsin-Behandlung abgelöst und sorgfältig vereinzelt (vgl. 2.2.5.1). Nach Bestimmung der exakten Konzentration der resuspendierten Zellen (vgl. 2.2.5.2), werden pro 5,5 cm-Kulturschale, in der 4 ml Kulturmedium vorgelegt wurden, jeweils $3,75 \times 10^5$ Zellen überführt. Zur Verteilung der Zellen in der Kulturschale sollte diese mehrfach und ausschließlich lateral bewegt werden; kreisende Bewegungen führen aufgrund einer verstärkten Konzentrierung der Zellen im Zentrum der Kulturschale zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Zellen. Während des gesamten Zeitraums der Ausplattierung muß das die resuspendierten Zellen enthaltene Gefäß (50 ml-Falcon-Röhrchen oder -Kulturflasche) in regelmäßigen Abständen mehrfach invertiert oder heftig bewegt werden, um einer Sedimentierung der Zellen entgegenzuwirken und so eine Ausplattierung gleicher Zellzahlen zu gewährleisten. Die Kulturschalen werden für ca. 18 h (über Nacht) in einem Brutschrank bei 37°C und 7,5 % CO₂ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert.

2. Tag: Transfektion der Zellen

Die am Vortag ausplattierten Zellen werden bei einer Konfluenz von nunmehr etwa 25 % wie unter 2.2.5.3 beschrieben transient transfiziert. Die dazu eingesetzten, DNA-haltigen Lösungen setzen sich aus den Lösungen I und II zusammen, wobei die Lösung I für die entsprechende Anzahl von Proben als *master-mix* angesetzt und nach dem Vorlegen der individuell erstellten Ansätze (Lösung II) mit Hilfe einer automatischen Pipette auf die Ansätze verteilt wird (Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4).

Lösung I (<i>master-mix</i>) DNA _{gesamt} = 8,1 µg	Konzentration	Volumen / Menge pro Ansatz	(*) Ansätze (A)	Volumen
Gesamtvolumen		200 µl - V ₀ = 170 µl	A × 170 µl =	X₀ ml
PE74 ₃ -tk ₈₀ -luc	Konz. ₁ [µg/µl]	2,0 µg	A × 2,0 µg : Konz. ₁ =	X₁ µl
p44MAPK	Konz. ₂ [µg/µl]	1,5 µg	A × 1,5 µg : Konz. ₂ =	X₂ µl
psG-ER81	Konz. ₃ [µg/µl]	1,5 µg	A × 1,5 µg : Konz. ₃ =	X₃ µl
pEQ176	Konz. ₄ [µg/µl]	0,5 µg	A × 0,5 µg : Konz. ₄ =	X₄ µl
pBluescriptSK ⁺	Konz. ₅ [µg/µl]	2,6 µg	A × 2,6 µg : Konz. ₅ =	X₅ µl
CaCl ₂	2,5 M	20 µl	A × 20 µl =	X₆ µl
DH ₂ O (vorlegen)			X ₀ - (X ₁ + X ₂ + ... + X ₆) =	X₇ ml

Tabelle 2.3 Lösung I der Transfektions-Lösung des Luciferase-Reportergen-Assays

(*) X Ansätze zzgl. ein bis zwei Volumina Reserve zum Ausgleich systemimmanenter Pipettier-Fehler

Lösung II DNA _{gesamt} = 1,9 µg			pcDNA3 Konz. [µg/µl]		pcDNA3- Raf- Konstrukte Konz. [µg/µl]		pSVK3 Konz. [µg/µl]		pSVK3- RasG12V Konz. [µg/µl]		pSVK3- QI-RasG12V- Konstrukte Konz. [µg/µl]	
Ansatz Nr.	V ₀ = 30 µl		Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]
	dH ₂ O (vorlegen)	Vol.										
1 + 1'	V ₀ - Σ(V ₁)	Σ(V ₁)	1,5	V _{1,1}			0,4	V _{1,2}				
2 + 2'	V ₀ - Σ(V ₂)	Σ(V ₂)	1,5	V _{2,1}			0,32	V _{2,2}	0,08	V _{2,3}		
3 + 3'	V ₀ - Σ(V ₃)	Σ(V ₃)	1,5	V _{3,1}							0,4	V _{3,2}
4 + 4'	V ₀ - Σ(V ₄)	Σ(V ₄)			1,5	V _{4,1}	0,4	V _{4,2}				
5 + 5'	V ₀ - Σ(V ₅)	Σ(V ₅)			1,5	V _{5,1}	0,32	V _{5,2}	0,08	V _{5,3}		
6 + 6'	V ₀ - Σ(V ₆)	Σ(V ₆)			1,5	V _{6,1}					0,4	V _{6,2}
etc.			etc.									

Tabelle 2.4 Lösung II der Transfektions-Lösung des Luciferase-Reportergen-Assays

Die Erstellung der DNA-Lösungen erfolgt aus Praktikabilitätsgründen bereits am Vortag. Die Lösung I enthält neben dem Luciferase-Reportergen-Plasmid und dem Vektor für die β-Galactosidase-Expression sämtliche, für die verschiedenen der Raf-Kinase innerhalb der Signalkaskade folgenden Komponenten, kodierende Plasmide (vgl. 2.1.9.2); ausgenommen ist

lediglich die intrazellulär abundant vorliegende MEK (Abbildung 2.6). Die individuellen Ansätze der Lösung II enthalten jeweils identische Mengen an pcDNA3- bzw. pSVK3-Konstrukten; Mengenunterschiede werden durch die Zugabe einer adäquaten Menge des entsprechenden Leervektors ausgeglichen (vgl. Tabelle 2.4). Der β -Galactosidase-Expressionsvektor (pEQ176) dient der späteren Bestimmung der allgemeinen Transfektionseffizienz jeder einzelnen der durchgeführten Transfektionen und der Ermittlung eines für die jeweilige Transfektion individuellen Korrekturfaktors. Aus der Tabelle 2.4 geht hervor, daß jede individuelle Transfektion zur statistischen Absicherung doppelt durchgeführt wird. Zum Schluß der Transfektions-Prozedur werden die Zellen mit jeweils 4 ml Hungermedium überschichtet (vgl. 2.2.5.3) und für 16 h (über Nacht) in einem Brutschrank bei 37°C und 7,5 % CO₂ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Alle gemachten Angaben beziehen sich auf das Prozedere bei Verwendung von 5,5 cm-Kulturschalen. Bei Benutzung von 9 cm-Kulturschalen erhöhen sich sämtliche der einzusetzenden DNA-Mengen und Volumina um den Faktor 2,5.

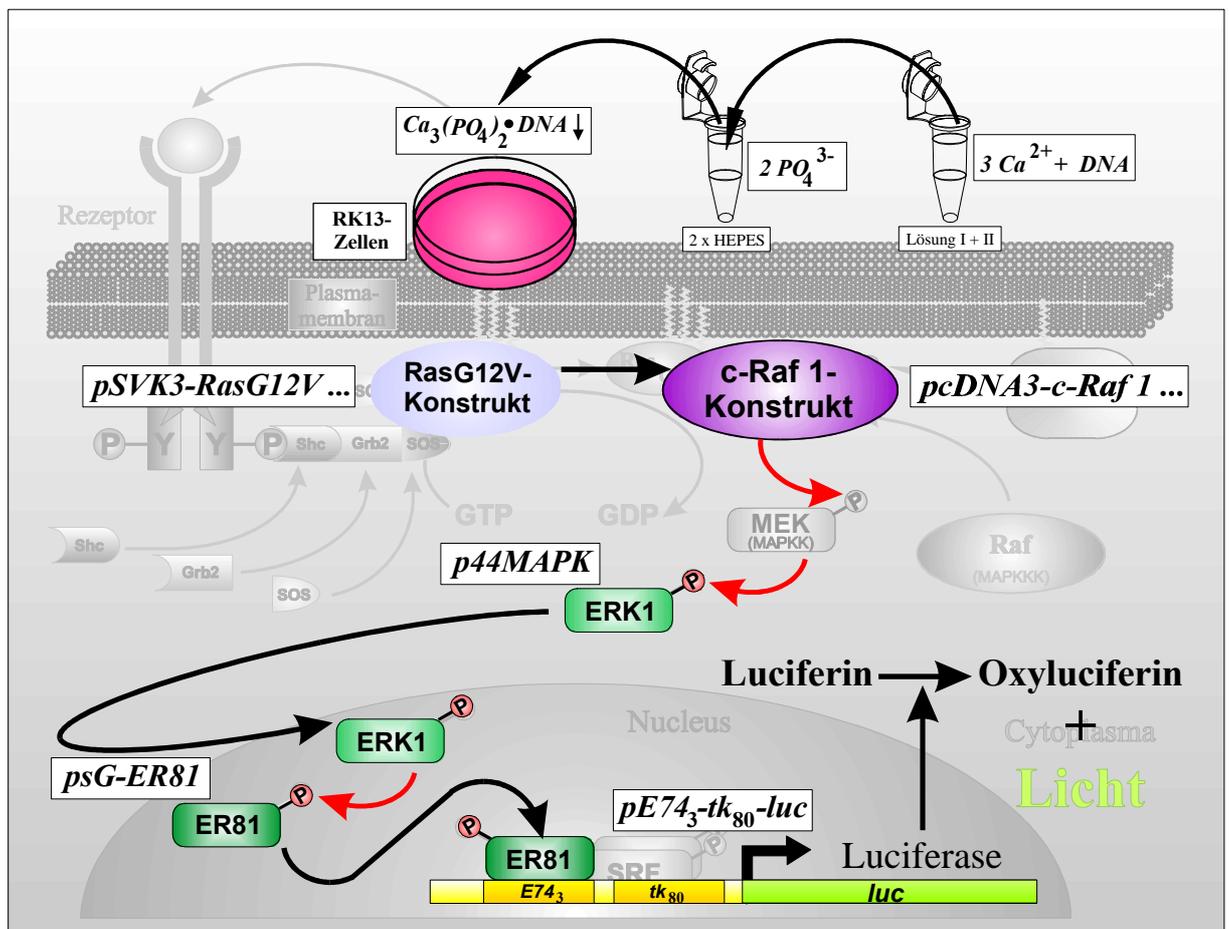


Abbildung 2.6

Schematische Darstellung des Luciferase-Reportergen-Assays

3. Tag: Medium-Wechsel

Die über Nacht in Hungermedium kultivierten, transfizierten Zellen werden nach ca. 16 h einem Medium-Wechsel unterzogen. Dazu wird dieses mit einer an einer Pumpe angeschlossenen, sterilen Pasteur-Pipette abgezogen und durch jeweils 4 ml Kulturmedium ersetzt. Es folgt eine weitere ÜN-Inkubation für ca. 14 h in einem 37°C-Brutschrank mit 7,5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %.

4. Tag: Zellernte, Zellaufschluß, Durchführung des Assays und Auswertung der Daten

Die über Nacht für ca. 14 h in Kulturmedium inkubierten und so stimulierten Zellen werden wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben geerntet, aufgeschlossen und die Zell-Lysate nachfolgend durch Zentrifugation geklärt.

Jeweils $2 \times 20 \mu\text{l}$ der geklärten Zell-Lysate werden in Luminometer-Röhrchen überführt und diese einzeln und nacheinander in die Meßkammer des Luminometers eingeführt. Nach Schließen der Meßkammer erfolgt die automatische Injektion von 100 μl Luciferase-Assay-Reagenz und die simultane Messung der aus der Luciferase-vermittelten, enzymatischen Umsetzung ihres Substrats resultierenden Lichtemission für eine Zeitdauer von jeweils 15 s. Die Menge der emittierten Lichtquanten ist dabei proportional zur Luciferase-Aktivität. Die gemessenen Werte einer Doppelbestimmung (Λ_1 und Λ_2) sowie der daraus errechnete Mittelwert ($\bar{\Lambda}_{1,2}$) wird von dem Luminometer ausgegeben.

Da die meßbare Luciferase-Aktivität der verschiedenen Transfektionsansätze abhängig von der jeweiligen Transfektionseffizienz ist, wird letztere in einen β -Galactosidase-Aktivitäts-Assay durch Verwendung von jeweils $2 \times 20 \mu\text{l}$ Zell-Lysate von jeder Probe gesondert ermittelt (vgl. 2.2.5.5). Die beiden Werte der Doppelbestimmung (β_1 und β_2) werden gemittelt und fließen in die weiter unten angeführte Berechnung ein. Durch den β -Galactosidase-Aktivitäts-Assay wird sichergestellt, daß ermittelte Unterschiede in der Luciferase-Aktivität reelle Veränderungen in der Aktivierung der Signalkaskade widerspiegeln und nicht auf eine durch uneinheitliche Transfektionseffizienzen bedingte, verschieden starke Expression der Luciferase zurückzuführen sind. Die nachfolgende Auswertung und graphische Darstellung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Graphit (vgl. 2.1.14). Die Berechnung der um die aus dem β -Galactosidase-Aktivitäts-Assay ermittelten Korrekturfaktoren ($\bar{b}_{1,2}$) korrigierten Luciferase-Aktivitäten ($A_{kor.}$) erfolgt durch Multiplikation der jeweiligen ge-

mittelten Luciferase-Aktivität ($\bar{\Lambda}_{1,2}$) mit dem korrespondierenden Kehrwert der entsprechenden β -Galactosidase-Aktivität:

$$A_{kor.} = \bar{\Lambda}_{1,2} \cdot (\bar{b}_{1,2})^{-1} \quad \text{mit} \quad \bar{b}_{1,2} = \frac{1}{2} \cdot (b_1 + b_2) \quad \text{und} \quad \bar{\Lambda}_{1,2} = \frac{1}{2} \cdot (\Lambda_1 + \Lambda_2)$$

Die relative Luciferase-Aktivität ($A_{rel.}$) wurde als das jeweils Mehrfache der Aktivität der Leervektor-Kontrolle (pcDNA3) berechnet:

$$A_{rel.} = \frac{A_{kor.}(X)}{A_{kor.}(pcDNA3)} \quad \text{Für die Vektor-Kontrolle ergibt sich:} \quad A_{rel.}(pcDNA3) = 1$$

Zum besseren Vergleich der teilweise aus verschiedenen Experimenten stammenden Daten und zur Mittelung von Resultaten dreier unabhängiger Experimente, werden die Ergebnisse jedes einzelnen Assays meist auf die jeweils durch RasG12V vermittelte c-Raf(Wt)- oder gegebenenfalls auf die c-Raf(Δ C1)-Aktivierung normiert:

$$A_{norm.} = \frac{A_{rel.}(X)}{A_{rel.}(Raf(Wt))} \cdot 100\% \quad \text{Für Raf(Wt) ergibt sich:} \quad A_{norm.}(Raf(Wt)) = 100\%$$

bzw.

$$A_{norm.} = \frac{A_{rel.}(X)}{A_{rel.}(Raf(\Delta C1))} \cdot 100\% \quad \text{Für Raf(\Delta C1) ergibt sich:} \quad A_{norm.}(Raf(\Delta C1)) = 100\%$$

2.2.5.8 Kinase-Aktivitäts-Assay

Mit Hilfe des Kinase-Aktivitäts-Assays wurde die Fähigkeit des artifiziellen QI-RasG12V.3S-Konstruktes zur Aktivierung der Kinase c-Raf 1 durch Untersuchung der direkten, durch c-Raf 1 bewirkten Phosphorylierung des nachgeschalteten Effektors MEK ermittelt. Der Kinase-Aktivitäts-Assay wurde mit in Sf9-Zellen exprimierter, rekombinanter, Kinase-inaktiver MEK als Substrat durchgeführt (Flory *et al.* 1998). Dazu wurden eukaryontische RK13-Zellen unter Anwendung der Calciumphosphat-Methode (vgl. 2.2.5.3) mit den entsprechenden Plasmid-DNAs transient transfiziert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank. Die Durchführung eines Kinase-Aktivitäts-Assays erstreckt sich über vier bis fünf Tage, wobei die Arbeitsschritte der ersten drei Tagen (Ausplattierung der Zellen, Transfektion der Zellen und Medium-Wechsel) mit Ausnahme der nachstehenden Aspekte im wesentlichen denen des Luciferase-Reporter-Gen-Assays entsprechen (vgl. 2.2.5.7).

Für die Durchführung des Kinase-Aktivitäts-Assays wird eine größere Zahl an Zellen benötigt, weshalb bei Ausplattierung der Zellen 9 cm-Kulturschalen benutzt werden. Nach Vorlegen von 8 ml Kulturmedium werden jeweils $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Kulturschale überführt. Aufgrund der erhöhten Zellzahl erhöhen sich auch sämtliche der einzusetzenden Volumina und DNA-Mengen um den Faktor 2,5 (**Tabelle 2.5** und **Tabelle 2.6**). Der β -Galactosidase-Expressions-Vektor (pEQ176) dient der späteren Bestimmung der allgemeinen Transfektionseffizienz jeder einzelnen der durchgeführten Transfektionen und der Ermittlung eines für die jeweilige Transfektion individuellen Korrekturfaktors, mittels dessen die weiter zu verarbeitenden Volumina an Zell-Lysaten bestimmt werden. Aus der **Tabelle 2.6** geht hervor, daß jede individuelle Transfektion zur statistischen Absicherung doppelt durchgeführt wird.

Lösung I <i>(master-mix)</i> DNA _{gesamt} = 14,5 µg	Konzentration	Volumen / Menge pro Ansatz	(*) Ansätze = 13	Volumen
Gesamtvolumen		500 µl - V ₀ = 460 µl	13 × 460 µl =	5,98 ml
CaCl ₂	2,5 M	50 µl	13 × 50 µl =	0,65 ml
pEQ176	Konz. ₁ [µg/µl]	1,25 µg	13 × 1,25 µg : Konz. ₁ =	X₁ µl
pBluescriptSK ⁺	Konz. ₂ [µg/µl]	13,25 µg	13 × 13,25 µg : Konz. ₂ =	X₂ µl
dH ₂ O (vorlegen)			5,98 ml - (0,65 ml + X ₁ + X ₂) =	X₃ µl

Tabelle 2.5 Lösung I der Transfektions-Lösung des Kinase-Aktivitäts-Assays

(*) 12 Volumina zzgl. einem Volumen Reserve zum Ausgleich systemimmanenter Pipettier-Fehler

Lösung II DNA _{gesamt} = 10,5 µg			pcDNA3 Konz. [µg/µl]		pcDNA3- RasG12V Konz. [µg/µl]		pcDNA3- QI-RasG12V.3S Konz. [µg/µl]		pcDNA3- FLAG-Raf(Wt) Konz. [µg/µl]	
Ansatz Nr.	V ₀ = 40 µl		Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]	Menge [µg]	Vol. [µl]
	dH ₂ O (vorlegen)	Vol.								
1 + 1'	V ₀ - Σ(V ₁)	Σ(V ₁)	10,5	V _{1,1}						
2 + 2'	V ₀ - Σ(V ₂)	Σ(V ₂)	10,4	V _{2,1}	0,1	V _{2,2}				
3 + 3'	V ₀ - Σ(V ₃)	Σ(V ₃)	10,0	V _{3,1}			0,5	V _{3,2}		
4 + 4'	V ₀ - Σ(V ₄)	Σ(V ₄)	0,5	V _{4,1}					10,0	V _{4,2}
5 + 5'	V ₀ - Σ(V ₅)	Σ(V ₅)	0,4	V _{5,1}	0,1	V _{5,2}			10,0	V _{5,3}
6 + 6'	V ₀ - Σ(V ₆)	Σ(V ₆)					0,5	V _{6,1}	10,0	V _{6,2}

Tabelle 2.6 Lösung II der Transfektions-Lösung des Kinase-Aktivitäts-Assays

4. Tag: Zellernte, Zellaufschluß, Durchführung des Assays und Auswertung der Daten

Die gemäß 2.2.5.4.2 geernteten Zellen bzw. im Vorfeld geernteten und bei -80°C gelagerte Zell-Pellets werden in 800 µl Lysis-Puffer resuspendiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zwecks Zell-Lyse für 10 min auf Eis inkubiert und zwischenzeitlich einmal kurz

und vorsichtig mit einem Vortexer gemischt. Die Zell-Lysate werden nachfolgend durch Zentrifugation für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C geklärt und anschließend etwa 780 µl ($Vol_{Max.}$) der klaren Überstände in neue, vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die jeweilige Transfektionseffizienz der verschiedenen Transfektionsansätze wird in einem β -Galactosidase-Aktivitäts-Assay durch Verwendung von jeweils 2×20 µl der Zell-Lysate jeder Probe gesondert ermittelt (vgl. 2.2.5.5). Die beiden Werte aus der Doppelbestimmung (β_1 und β_2) werden gemittelt ($\overline{b}_{1,2}$) und fließen als Korrekturfaktoren in die nachstehende Berechnung ein, wodurch sichergestellt wird, daß in der folgenden Kinase-Reaktion pro Reaktionsansatz äquivalente Mengen an durch die transfizierten Plasmide exprimierten Proteine eingesetzt werden (Transfektions-Äquivalent). Die Berechnung der um die aus dem β -Galactosidase-Aktivitäts-Assay ermittelten Transfektions-Äquivalenten korrigierten einzusetzenden Volumina an Zell-Lysaten ($Vol_{kor.}$) erfolgt gemäß:

$$Vol_{kor.} = Vol_{Max.} \cdot \frac{\overline{b}_{1,2 Min.}}{\overline{b}_{1,2}} \quad \text{mit} \quad Vol_{Max.} \quad \text{maximales Volumen an Zell-Lysat pro Ansatz}$$

$$\overline{b}_{1,2 Min.} \quad \text{minimalster der gemessenen } \overline{b}_{1,2} \text{-Werte}$$

$$\frac{\overline{b}_{1,2 Min.}}{\overline{b}_{1,2}} \quad \text{Transfektions-Äquivalent}$$

Das berechnete Volumen ($Vol_{kor.}$) wird dem entsprechenden Ansatz entnommen, in neue, vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Volumina mit Lysis-Puffer auf je 800 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die an einem FLAG-tag fusionierte Raf-Kinase wird gemäß 2.2.5.6 mit je 25 µl Protein G-Agarose-Suspension (Boehringer Mannheim, Mannheim) und je 20 µg Anti-FLAG[®] M5-Antikörper pro Ansatz aus den Zell-Lysaten präzipitiert. Zum Schluß der Prozedur werden die Agarose-beads in je 15 µl $2 \times$ Kinase-Puffer (mit DTE!) resuspendiert und in der nachfolgenden Kinase-Reaktion eingesetzt. Dazu werden die resuspendierten Agarose-beads mit je 15 µl Kinase-Reaktions-Lösung aus einem entsprechend der Anzahl an Ansätzen hergestellten *master-mix* versetzt, indem diese auf der Innenseite der Deckel der geöffneten Eppendorf-Reaktionsgefäße positioniert werden und die Kinase-Reaktionen durch gleichzeitige, kurze Zentrifugation der Ansätze simultan gestartet werden. Sofort im Anschluß werden die Ansätze für 20 min in einem Thermoblock bei 30°C und maximaler Schüttel-Frequenz inkubiert. Nachfolgend werden die Reaktionen durch Zugabe von je 6 µl $5 \times$ SDS-Probenpuffer auf die bereits beschriebene Weise simultan terminiert. Die Ansätze werden daraufhin für 5 min in einem Thermoblock bei 95°C denaturiert,

für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Überstände anschließend auf einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.2.2). Alternativ können die Ansätze auch bis zu einem späteren Gelauftrag bei -20°C eingefroren werden. Nach Beendigung des Gellaufes werden die separierten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (vgl. 2.2.2.4.2). Die Membran wird unter IR-Licht sorgfältig getrocknet, in einer Expositions-Kassette positioniert, ihre Radioaktivität qualitativ mit einem Flächenzähler grob bestimmt und letztlich mit einem Phosphoimager-Screen bedeckt, welcher je nach Stärke der gemessenen Radioaktivität für 4 h bis 18 h (über Nacht) exponiert wird. Anschließend wird der *screen* mit einem Phosphoimager gemessen und mit Hilfe der AIDA-Software (vgl. 2.1.14) die jeweilige eingebaute Menge Radioaktivität des phosphorylierten Substrats quantifiziert.

2.2.5.9 DNA-Konstrukte für den Luciferase-Reportergen-Assay und den Kinase-Aktivitäts-Assay

pSVK3_{MCS}

Aus Gründen der Klonierungs-Strategie wurde in der vorliegenden Arbeit anstatt des originalen pSVK3-Plasmids ein Derivat mit veränderter MCS verwendet, das wie nachfolgend beschrieben hergestellt wurde. Zunächst wurde die singuläre, in der MCS lokalisierte *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle eliminiert. Hierzu wurde der pSVK3-Vektor durch die Restriktion mit *EcoRI* linearisiert und die entstandenen überhängenden, einzelsträngigen Enden des DNA-Doppelstranges (*sticky ends*) mittels Klenow-Fragment aufgefüllt (*blunt ends*, vgl. 2.2.1.4). Der so modifizierte, linearisierte pSVK3-Vektor wurde nachfolgend durch intramolekulare Ligation zirkularisiert (vgl. 2.2.1.7, **Abbildung 2.7**). Anschließend wurden die beiden synthetischen Desoxyoligonucleotide MCS_{neu}-sense und MCS_{neu}-antisense hybridisiert (vgl. 2.2.1.8). Nach erfolgter Hybridisierung besitzt das doppelsträngige DNA-Fragment an seinen Enden eine *KpnI*- und eine *PstI*-Restriktionsschnittstelle. Der pSVK3-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *PstI* verdaut. Im Anschluß wurde der neue Polylinker gerichtet in den *KpnI*/*PstI*-linearisierten pSVK3-Vektor kloniert (vgl. 2.2.1.7). Nach erfolgreicher Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli*-Zellen (vgl. 2.2.3.4) und Reisolation der Plasmid-DNA (vgl. 2.2.3.6), erfolgte die Kontrolle der Klonierung anhand der durch die neue MCS eingeführte *HindIII*-Restriktionsschnittstelle mittels Linearisierung des Vektors durch die Restriktionsendonuklease *HindIII* und durch anschließende Sequenzierung putativ positiver Klone (vgl. 2.2.1.15).

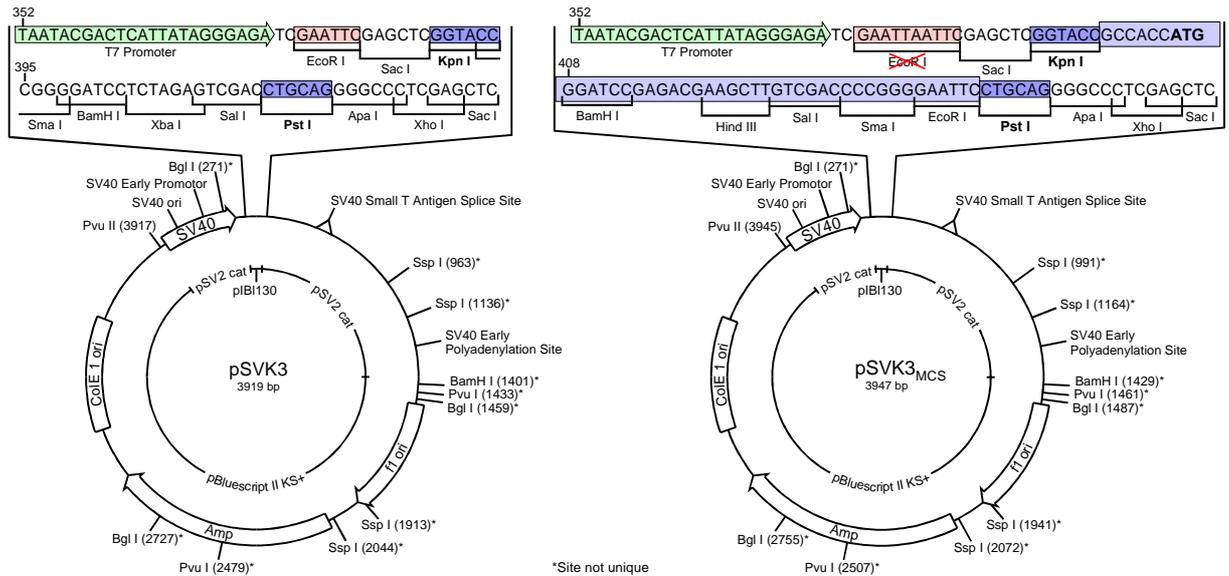


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung des pSVK3- und des pSVK3_{MCS}-Vektors

pcDNA3_{MCS}

Aus Gründen der Klonierungs-Strategie wurde in der vorliegenden Arbeit anstatt des originalen pcDNA3-Plasmids ein Derivat mit veränderter MCS verwendet, das wie nachfolgend beschrieben hergestellt wurde. Zunächst wurden die beiden synthetischen Desoxyoligonucleotide MCS_{neu}-sense und MCS_{neu}-antisense hybridisiert (vgl. 2.2.1.8). Nach erfolgter Hybridisierung wurde das doppelsträngige DNA-Fragment mit der Endonuklease *EcoRI* restringiert, so daß an dessen Enden nun eine *KpnI*- und eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle lokalisiert ist. Der pcDNA3-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRI* geschnitten und im Anschluß daran die neue MCS gerichtet in den *KpnI*/*EcoRI*-linearisierten pcDNA3-Vektor kloniert (vgl. 2.2.1.7, **Abbildung 2.8**). Nach erfolgreicher Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E coli*-Zellen (vgl. 2.2.3.4) und Reisolation der Plasmid-DNA (vgl. 2.2.3.6), erfolgte die Kontrolle über den Erfolg der Klonierung mittels der durch die neue MCS eingeführte zweite *SmaI*-Restriktionsschnittstelle. Die Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* führt bei gelungener Modifizierung statt zu einer Linearisierung der Plasmid-DNA zur Erzeugung von DNA-Fragmenten der Größe 1,16 kb und 4,3 kb. Anschließend wurden die auf diese Weise als putativ positiv charakterisierten Klone einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen (vgl. 2.2.1.15).

pcDNA3_{DMXB}

Zur Herstellung des artifiziellen QI-RasG12V-Konstruktes in dem pcDNA3-Vektor war im Vorfeld eine sukzessive Eliminierung drei verschiedener singulärer Restriktionsschnittstellen

erforderlich (*MunI*, *XbaI* und *BsmI*). Hierzu wurde das pcDNA3_{MCS}-Plasmid mit einem der drei Endonukleasen restringiert (vgl. 2.2.1.2), die entsprechende Schnittstelle durch *blunt ending* beseitigt (vgl. 2.2.1.4) und der so behandelte, linearisierte Vektor einer intramolekularen Ligation (Religation) unterzogen (vgl. 2.2.1.7). In analoger Weise wurden nachfolgend auch die beiden anderen Restriktionsschnittstellen sukzessive beseitigt (**Abbildung 2.8**). Als intermediäres Produkt bei diesem Prozeß entstand u.a. das nachfolgend aufgeführte pcDNA3_{ΔMX}-Plasmid.

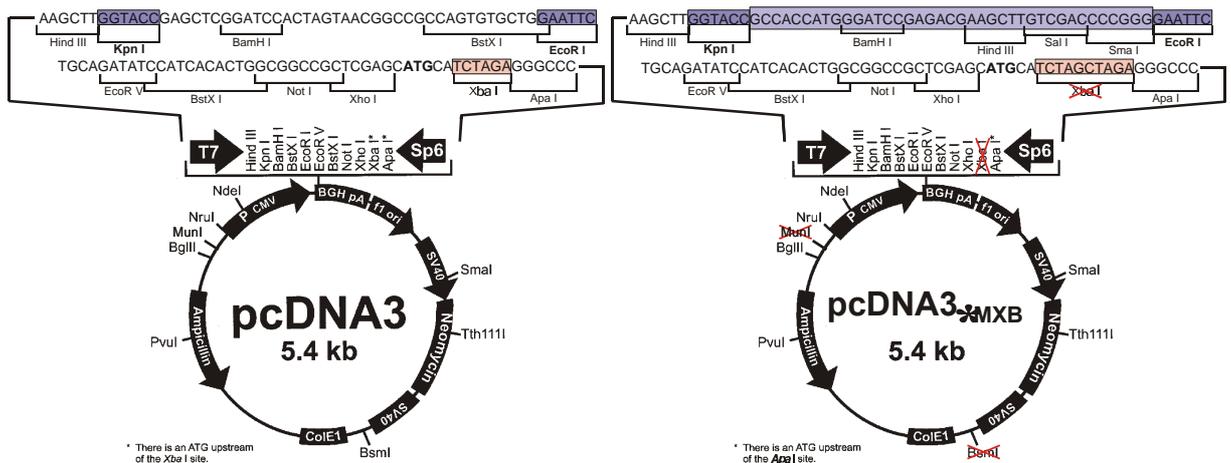


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung des pcDNA3- und des pcDNA3_{ΔMXB}- Vektors

pcDNA3_{ΔMX}-c-Raf(DC1)

Zur Erzeugung eines c-Raf-Konstruktes mit kompletter Deletion der C1-Domäne wurde das pcDNA3_{ΔMX}-c-Raf(Wt)-Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *MunI* restringiert, wodurch ein ca. 190 bp großes DNA-Fragment freigesetzt wird, das die Aminosäuren der Position 130 bis 191 der c-Raf-Kinase umfaßt und damit die vollständige C1-Domäne (Position 139 bis 184) impliziert (vgl. **Abbildung 1.12** und **Abbildung 3.10**). Die beiden synthetischen Desoxyoligonucleotide *XbaI*/*MunI*-sense und *XbaI*/*MunI*-antisense wurden hybridisiert (vgl. 2.2.1.8), woraus ein doppelsträngiges DNA-Fragment resultiert, an dessen Enden eine *XbaI*- und eine *MunI*-Restriktionsschnittstelle lokalisiert ist. Das DNA-Fragment wurde anschließend in den *XbaI*/*MunI*-linearisierten Vektor gerichtet kloniert. Als Resultat wurde ein c-Raf-Konstrukt erhalten, bei dem sich dem Threonin 138 unmittelbar das Valin 185 anschließt und somit die Aminosäuren 139 bis 184 vollständig deletiert sind.

pcDNA3_{DMXB}-QI-RasG12V.3S

Die Herstellung des chimären, artifiziell über eine N-terminale Transmembran-Domäne in der Plasmamembran inserierten QI-RasG12V.3S-Konstruktes und seiner Derivate (vgl. **Abbildung 3.1** und **Abbildung 3.2**) begann mit der Klonierung der N-terminal der Ras-Sequenz lokalisierten Domäne durch sukzessive Ligation mehrerer hybridisierter, synthetischer Oligodesoxynucleotide (vgl. 2.1.8, **Abbildung 2.9**). Die Klonierung der DNA-Fragmente F0 bis F3 erfolgte gerichtet und wurde nach jedem Schritt jeweils anhand der durch das jeweilige Fragment neu eingeführten, singulären Restriktionsschnittstelle identifiziert (*MunI*, *BsrGI*, *BsmI* und *BamHI*). Das LF4-Fragment besitzt an seinen Enden eine *BamHI*- bzw. *BglII*-Schnittstelle, welche identische, kompatible 5'-Überhänge bilden. Daher erfolgte nach der ungerichteten Klonierung dieses Fragmentes in die *BamHI*-Schnittstelle des F0123-Intermediates eine Kontrolle der Klonierungs-Produkte durch eine Doppel-Restriktion mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI*. Die Hybridisierung eines *BamHI*- und eines *BglII*-Überhanges führt zur Bildung einer chimären Restriktionsschnittstelle, welche weder von *BamHI* noch von *BglII* geschnitten werden kann. Je nach Orientierung des einklonierten Fragmentes zeigt sich nach der Kontroll-Restriktion der Klonierungs-Produkte in einem analytischen DNA-Gel ein 589 bp bzw. 555 bp großes DNA-Fragment. Konstrukte, welche bei dieser Kontrolle ein 589 bp-Fragment freisetzen, wurden für den nachfolgenden Klonierungs-Schritt eingesetzt, der wiederum aus der ungerichteten Klonierung des LF4-Fragmentes bestand. Analog zur obigen Darstellung erfolgte die Überprüfung der Orientierung des einklonierten DNA-Fragmentes durch doppelte Restriktion mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI*, wobei in diesem Fall 589 bp bzw. 622 bp große DNA-Fragmente entstehen. Konstrukte, die zur Freisetzung von 622 bp-Fragmenten führen, umfassen die komplette artifizielle Transmembran-Domäne einschließlich des 24 Aminosäuren langen, aus multiplen GSS-Repetitionen bestehenden *linkers*, an dessen C-terminalem Ende eine *BamHI*- und eine *EcoRI*-Schnittstelle in direkter Folge lokalisiert sind und werden mit dem Präfix NTMD, F012344 oder QI- bezeichnet.

Zur Amplifikation des RasG12V.3S-Fragmentes wurden der 5'-Ras N-term *BamHI*- und der 3'-Ras C-term *EcoRI*-Primer (vgl. 2.1.8 und **Abbildung 2.10**) sowie das pSVK3_{MCS}-RasG12V.3S-Plasmid als *template* in eine standardisierte PCR (vgl. 2.2.1.12) eingesetzt. Die resultierenden RasG12V.3S-Amplifikationsprodukte wurden mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* doppelt restringiert und anschließend in das in gleicher Weise geschnittene pcDNA3-NTMD-Konstrukt gerichtet kloniert. Das so erhaltene DNA-Konstrukt wird nachfolgend als pcDNA3-QI-RasG12V.3S bezeichnet.

pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3S

Zur Herstellung des pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3S-Konstruktes wurde QI-RasG12V.3S aus dem pcDNA3_{ΔMXB}-QI-RasG12V.3S-Vektor durch *KpnI/EcoRI*-Restriktion herausgeschnitten und mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert. Nachfolgend wurde dieses *KpnI/EcoRI*-Fragment in das bereits existente und ebenfalls *KpnI/EcoRI*-restringierte pSVK3_{MCS}-RasG12V.3S-Plasmid gerichtet kloniert (**Abbildung 2.7** und **Abbildung 2.9**). Das durch Umklonierung aus dem pcDNA3_{ΔMXB}-Vektor hervorgegangene pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3S-Konstrukt wird, wenn nicht explizit anderweitig angegeben, nachfolgend als QI-RasG12V.3S bezeichnet.

pcDNA3_{DMXB}-QI-RasG12V.3C

Zur Amplifikation des RasG12V.3C-Fragmentes wurden der 5'-Ras N-term *BamHI*- und der 3'-Seq-pSVK3-Primer (vgl. 2.1.8) sowie das bereits existente pSVK3_{MCS}-RasG12V-Plasmid als *template* in eine standardisierte PCR (vgl. 2.2.1.12) eingesetzt. Die resultierenden RasG12V.3C-Amplifikationsprodukte wurden mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* doppelt restringiert und anschließend in das in gleicher Weise geschnittene pcDNA3_{DMXB}-NTMD-Konstrukt (vgl. **Abbildung 2.9**) gerichtet kloniert. Das so erhaltene DNA-Konstrukt wird nachfolgend als pcDNA3-QI-RasG12V.3C bezeichnet

pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3C

Zur Herstellung des pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3C-Konstruktes wurde QI-RasG12V.3C aus dem pcDNA3_{ΔMXB}-QI-RasG12V.3C-Vektor durch *KpnI/XhoI*-Restriktion herausgeschnitten und mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert. Nachfolgend wurde dieses *KpnI/XhoI*-Fragment in das ebenfalls *KpnI/XhoI*-restringierte pSVK3_{MCS}-Plasmid gerichtet kloniert (**Abbildung 2.7** und **Abbildung 2.9**). Das durch Umklonierung aus dem pcDNA3_{ΔMXB}-Vektor hervorgegangene pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3C-Konstrukt wird, wenn nicht explizit anderweitig angegeben, nachfolgend als QI-RasG12V.3C bezeichnet.

pSVK3_{MCS}DBamHI-RasG12V.3S

In sämtlichen pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V-Konstrukten ist RasG12V über die Restriktionsschnittstellen *BamHI/EcoRI* hinter die NTMD-Sequenz kloniert. Eine spätere Nutzung der *BamHI*-Schnittstelle macht die Beseitigung der pSVK3-eigenen *BamHI-site* (Position 1401 bzw. 1429, vgl. **Abbildung 2.7**) erforderlich. Zu diesem Zweck wurde das *BamHI*-restringierte pSVK3_{MCS}-RasG12V.3S-Plasmid nach Auffüllen der überhängenden 5'-Enden

mittels *Pfu*-Polymerase religiert (vgl. 2.2.1.4) und der Erfolg der Prozedur durch eine *Bam*HI-Restriktion kontrolliert.

pcDNA3_{DMXB}-QI-RasG12V.181, -QI-RasG12V.171, QI-RasG12V.166

Zur Herstellung der drei C-terminal unterschiedlich verkürzten QI-RasG12V-Konstrukte wurden diese zunächst mittels einer Standard-PCR (vgl. 2.2.1.12), in welche das pSVK3_{MCS}-RasG12V.3S-Plasmid als *template*, der 5'-Ras N-term *Bam*HI-Primer sowie einer der 3'-Primer (3'-Ras C-term₁₈₁ *Sma*I, 3'-Ras C-term₁₇₁ *Pst*I bzw. 3'-Ras C-term₁₆₆ *Sma*I) eingesetzt wurden, amplifiziert (vgl. **Abbildung 2.10**). Die *Pfu*-Polymerase führt zur Erzeugung von *blunt ends*, so daß die resultierenden RasG12V-Amplifikationsprodukte nach Restriktion mit *Bam*HI in das *Bam*HI/*Eco*RV-geschnittene und dephosphorylierte (vgl. 2.2.1.3) pcDNA3_{DMXB}-NTMD-Konstrukt (vgl. **Abbildung 2.9**) gerichtet kloniert werden konnten (*Eco*RV erzeugt *blunt ends*). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels diagnostischer *Bam*HI/*Xho*I- bzw. *Kpn*I/*Xho*I-Restriktion kontrolliert.

pSVK3_{MCS} Δ *Bam*HI-QI-RasG12V.181, -QI-RasG12V.171, QI-RasG12V.166

Zur Herstellung dieser drei Konstrukte wurden QI-RasG12V.181, QI-RasG12V.171 und QI-RasG12V.166 aus dem entsprechenden pcDNA3_{DMXB}-Vektor durch *Kpn*I/*Xho*I-Restriktion herausgeschnitten und mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert. Nachfolgend wurden die so gewonnenen, ca. 700 bp großen *Kpn*I/*Xho*I-Fragmente in das ebenfalls *Kpn*I/*Xho*I-restringierte pSVK3_{MCS} Δ *Bam*HI-RasG12V.3S-Plasmid gerichtet umklont, wobei letzteres durch Gelelektrophorese und Gelelution von dem RasG12V.3S-Insert getrennt wurde (**Abbildung 2.7** und **Abbildung 2.9**). Die durch Umklonierung aus dem pcDNA3_{DMXB}-Vektor hervorgegangenen pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3C-Konstrukte werden, wenn nicht explizit anderweitig angegeben, nachfolgend kurz mit QI-RasG12V.181, QI-RasG12V.171 und QI-RasG12V.166 bezeichnet.

pSVK3_{MCS}-RasG12V(*Cla*I)

Für die spätere Klonierung einiger RasG12V-Mutanten war zunächst die Herstellung eines RasG12V-Konstruktes mit einer *Cla*I-site im Bereich der Basenpaare 136 bis 141 der Ras-Sequenz erforderlich (äquivalent den Aminosäuren der Positionen 46 und 47). Zu diesem Zweck wurde zunächst ein 121 bp umfassendes DNA-Fragment mittels einer Standard-PCR (vgl. 2.2.1.12), in welche das bereits existente pSVK3_{MCS}-RasWt(*Cla*I)-Plasmid als *template* sowie die Primer 5'-Ras N-term *Nar*I und 3'-Ras C-term *Cla*I eingesetzt wurden, amplifiziert (vgl. **Abbildung 2.10**). Die resultierenden PCR-Fragmente wurden mittels präparativer DNA-

Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert, anschließend sequentiell mit *NarI* und *ClaI* restringiert und abschließend gerichtet in den ebenfalls *NarI/ClaI*-geschnittenen pSVK3_{MCS}-RasWt(*ClaI*)-Vektor inkloniert.

pSVK3_{MCS}-RasG12V-Mutanten

Die verschiedenen RasG12V-Konstrukte mit Mutationen im Bereich um Aminosäuren der Positionen 43 bis 52 wurden durch die drei unterschiedlichen, nachstehend dargestellten Klonierungs-Strategien realisiert; die Konstrukte pSVK3_{MCS}-RasWt(*ClaI*), pSVK3_{MCS}-RasG12V.V45E und pSVK3_{MCS}-RasG12V.Y64W waren schon vorhanden.

I) pSVK3_{MCS}-RasG12V.V45R, -RasG12V.V45W, -RasG12V.Q43R und -RasG12V.Q43W

Zur Herstellung dieser drei RasG12V-Mutanten wurden die verschiedenen und entsprechend mutierten, 121 bp großen DNA-Fragmente zunächst mittels separater Standard-PCRs (vgl. 2.2.1.12), in welche das pSVK3_{MCS}-RasWt(*ClaI*)-Plasmid als Matrize, der 5'-Ras N-term *NarI*-Primer sowie einer der 3'-Mutagenese-Primer (3'-Ras *ClaI* Q43R, 3'-Ras *ClaI* Q43W, 3'-Ras *ClaI* V45R, 3'-Ras *ClaI* V45W) eingesetzt wurden, amplifiziert (vgl. **Abbildung 2.10**). Die resultierenden PCR-Fragmente wurden mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert, anschließend sequentiell mit *NarI* und *ClaI* restringiert und nachfolgend gerichtet in den ebenfalls *NarI/ClaI*-geschnittenen pSVK3_{MCS}-RasWt(*ClaI*)-Vektor inkloniert.

Die Klonierung von DNA-Fragmenten mit scheinbar inkompatiblen *NarI*- bzw. *ClaI*-Überhängen erwies sich in der Praxis als äußerst schwierig, da entgegen den Erwartungen *NarI*- und *ClaI*-Enden hybridisieren und ligiert werden, was zu einer Vielzahl von artifiziellen Konstrukten mit Inserts falscher Orientierung oder zu Mehrfach-Insertionen führte. Daher wurde für die Konstruktion weiterer RasG12V-Mutanten andere, nachstehend beschriebene Strategien angewandt.

II) pSVK3_{MCS}-RasG12V.T50R, -RasG12V.T50W, -RasG12V.E49R, -RasG12V.E49W, -RasG12V.L52R und -RasG12V.L52W

Die Konstruktion dieser unterschiedlichen RasG12V-Mutanten erfolgte über separate, standardisierte PCRs (vgl. 2.2.1.12 und **Abbildung 2.10**), in welche das zuvor hergestellte pSVK3_{MCS}-RasG12V(*ClaI*)-Plasmid als Matrize, jeweils einer der 5'-Mutagenese-Primer (5'-Ras *ClaI* T50R, 5'-Ras *ClaI* T50W, 5'-Ras *ClaI* E49R, 5'-Ras *ClaI* E49W, 5'-Ras *ClaI* L52R und 5'-Ras *ClaI* L52W) sowie der 3'-Seq-pSVK3-Primer eingesetzt

wurden. Die resultierenden, 494 bp großen PCR-Fragmente wurden mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert, anschließend sequentiell mit *Cla*I und *Eco*RI restringiert und nachfolgend gerichtet in den ebenfalls *Cla*I/*Eco*RI-geschnittenen pSVK3_{MCS}-RasG12V(*Cla*I)-Vektor inkloniert.

III) pSVK3_{MCS}-RasG12V.V45A, -RasG12V.D47R, -RasG12V.D47W, -RasG12V.Q43A, -RasG12V.T50A und RasG12V.Q43/V45/T50A

Diese RasG12V-Mutanten wurden über PCR-*in vitro*-Mutagenese hergestellt (vgl. 2.2.1.14 und **Abbildung 2.1** und **Abbildung 2.10**). In die erste PCR wurde der 5'-Seq-pcDNA3-Primer, der adäquate 3'-Mutagenese-Primer (3'-Ras *Cla*I V45A, 3'-Ras ~~*Cla*I~~ D47R, 3'-Ras ~~*Cla*I~~ D47W, 3'-Ras *Cla*I Q43A, 3'-Ras *Cla*I T50A) sowie der pcDNA3_{ΔMX}-RasG12V(*Cla*I)-Vektor als *template* eingesetzt. Die erzeugten, zwischen 171 und 188 bp großen PCR-Fragmente wurden mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert und anschließend neben dem 3'-Seq-pSVK3- und dem 5'-Seq-pcDNA3-Primer als „5'-Mega-Primer“ in die PCRs des zweiten Schrittes eingesetzt; als DNA-Matrize diente in diesen Reaktionen das pSVK3_{MCS}-RasG12V-Plasmid. Die aus diesen PCRs resultierenden, 695 bp großen DNA-Fragmente wurden nach erneuter Isolation durch präparative DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) sequentiell mit *Nar*I und *Eco*RI restringiert und nachfolgend in den gleichfalls *Nar*I/*Eco*RI-geschnittenen pSVK3_{MCS}-RasG12V(*Cla*I)-Vektor gerichtet inkloniert.

Das dreifach mutierte RasG12V.Q43/V45/T50A-Konstrukt wurde im wesentlichen analog zu den vorangegangenen RasG12-Mutanten hergestellt, wobei in der ersten PCR der Primer 3'-Ras *Cla*I Q43/V45A eingesetzt wurde; der durch diese Amplifikation resultierende 5'-Ras *Cla*I Q43/V45A-Mega-Primer wurde in eine zweite PCR eingesetzt, in welche jedoch der zuvor erzeugte pSVK3_{MCS}-RasG12V.T50A-Vektor als DNA-Matrize fungierte.

Mit Ausnahme der Konstrukte pSVK3_{MCS}-RasG12V.D47R und pSVK3_{MCS}-RasG12V.D47W verfügen alle RasG12V-Mutanten über eine *Cla*I-Restriktionsschnittstelle im Bereich der Aminosäuren der Position 46 und 47.

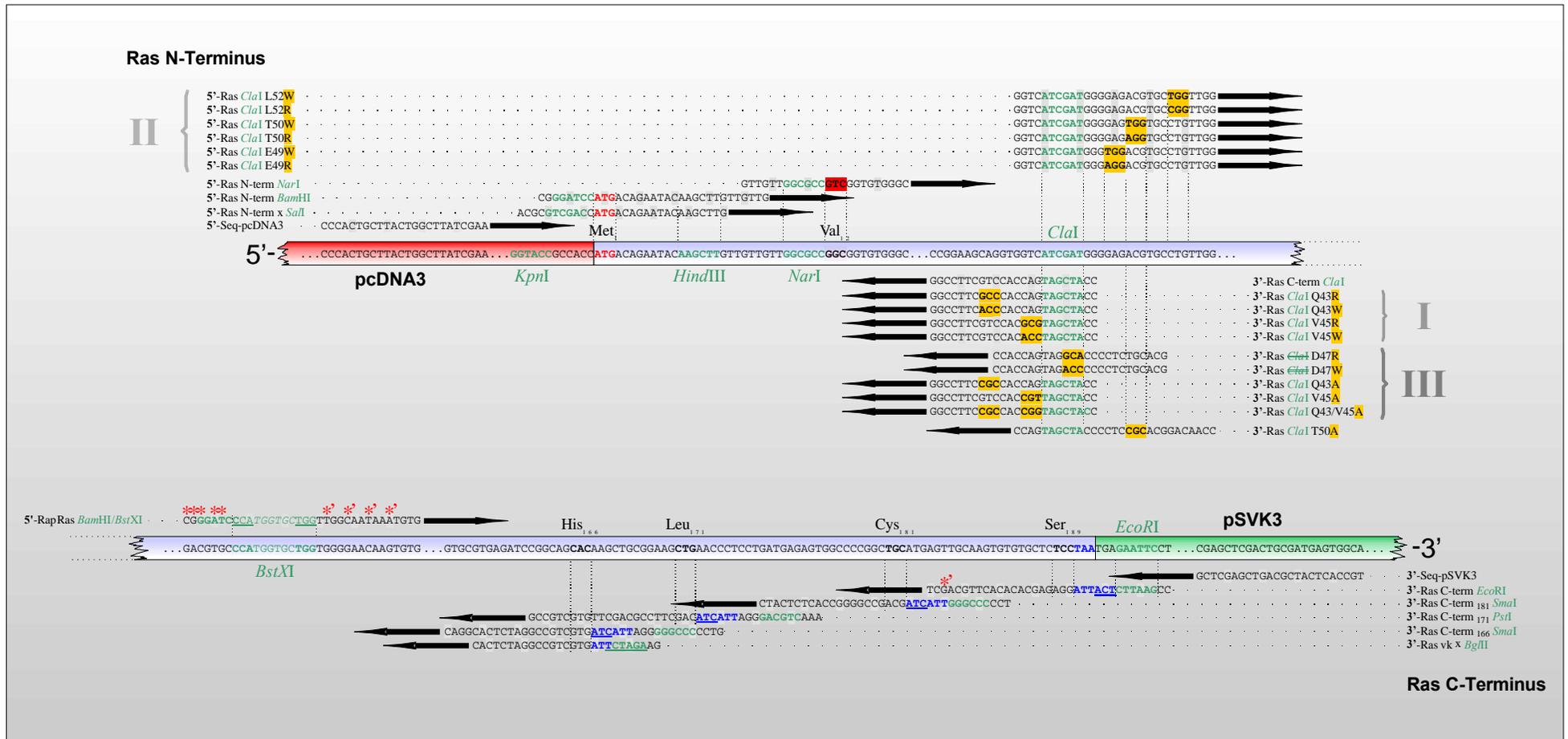


Abbildung 2.10 Schematische Darstellung der Position diverser zur Herstellung der RasG12V-Konstrukte verwendeter Oligodesoxynucleotide
 I = Klonierung über *NarI/ClaI*-Restriktionsschnittstellen, II = Klonierung über *ClaI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen, III = Klonierung über *NarI/EcoRI*-Restriktionsschnittstellen (PCR-*in vitro*-Mutagenese). **ATG** = Start-Codon; orange hinterlegt = mutierte Basen-Triplets; **GTC** = G12V-Triplett; **TTA**, **CTA**, **TCA** = Stop-Anticodons (ochre, ambre, opal); grün = flankierende Restriktionsschnittstellen. * = singuläre Nucleotid-Austausche; *? = stille Mutationen.

pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E.3C

Dieses Konstrukt wurde als intermediäres Produkt zur Erzeugung des nachfolgend dargestellten pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E.3S-Plasmids hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die Vektoren pSVK3_{MCS}-RasG12V.V45E und pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.3S parallel einer *Hind*III/*Eco*RI-Doppel-Restriktion unterzogen. Dadurch entsteht in beiden Fällen neben dem jeweiligen *Hind*III/*Eco*RI-restringierten Vektor (pSVK3_{MCS}-Ras_{AS1-4} bzw. pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-Ras_{AS1-4}) ein *Hind*III/*Eco*RI-RasG12V-Fragment von ca. 560 bp, welches einem die Aminosäuren 5 bis 189 des RasG12V.V45E- bzw. RasG12V-Konstruktes umfassenden Bereich entspricht. Das RasG12V.V45E- und das pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-Ras_{AS1-4}-Fragment wurden mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese isoliert (vgl. 2.2.2.1.10.2) und anschließend miteinander ligiert.

pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E.3S

Dieses Konstrukt wurde durch Austausch des „normalen“ RasWt C-Terminus gegen den C-Terminus des dreifach mutierten QI-RasG12V.3S-Konstruktes (C181S/C184S/C186S) hergestellt. Dazu wurde zunächst das zuvor klonierte Plasmid pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E.3C sequentiell mit *Bst*XI und *Eco*RI restringiert, wodurch zum einen ein 250 bp großes DNA-Fragment freigesetzt wird, welches einem die Aminosäuren 110 bis 189 des Ras-Proteins umfassenden Bereich entspricht; zum anderen entsteht ein durch eine *Bst*XI- und *Eco*RI-Schnittstelle flankiertes pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E_{AS1-109}-Fragment, welches durch präparative DNA-Gelelektrophorese (vgl. 2.2.2.1.10.2) isoliert wird. Der die drei Serin-Substitutionen aufweisende Ras C-Terminus wurde durch eine Standard-PCR, in welche die Primer 5'-RapRas BamHI/*Bst*XI und 3'-Seq-pSVK3 sowie pSVK3_{MCS}-QI-RasG12V.3S als DNA-Matrize eingesetzt wurde, amplifiziert (vgl. **Abbildung 2.10**). Im Anschluß wurde das 303 bp große PCR-Fragment ebenfalls sequentiell mit *Bst*XI und *Eco*RI restringiert; nach Isolation mittels präparativer DNA-Gelelektrophorese wurde das so gewonnene 250 bp große Ras3S_{AS110-189}-Fragment in den zuvor isolierten pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E_{AS1-109}-Vektor gerichtet kloniert. Das so entstandene pSVK3_{MCS} Δ BamHI-QI-RasG12V.V45E.3S-Konstrukt weist vier stille Mutationen im Bereich der Aminosäuren Val₁₁₄ bis Lys₁₁₉ auf.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Funktion der Lipidmodifikationen von H-Ras für die Aktivierung von c-Raf 1

Die Aktivierung der Raf-Kinase ist ein mehrstufiger, komplexer Prozeß, dessen Details bis heute nicht vollständig verstanden sind. Ein essentieller Schritt in diesem Prozeß ist die Rekrutierung der inaktiven, cytoplasmatischen Raf-Kinase an die Innenseite der Plasmamembran, wo weitere Aktivierungsschritte stattfinden. Diese Translokation wird von der kleinen GTPase Ras vermittelt. Das Ras-Protein enthält eine C-terminale CaaX-Sequenz, die posttranslational modifiziert wird. Der Cysteinrest der CaaX-Sequenz wird durch kovalente Verknüpfung mit einem Farnesylrest modifiziert. Nach Abspaltung der letzten drei Aminosäuren (aaX) und anschließender Carboxymethylierung des nun C-terminalen, farnesylierten Cysteins, erfolgt im Fall von H-Ras die zusätzliche Palmitylierung der beiden N-terminal gelegenen Cysteine (vgl. **Abbildung 1.3**). Durch die C-terminalen, hydrophoben Lipidmodifikationen ist das Ras-Protein in der Innenseite der Plasmamembran verankert. Aktiviertes (GTP-gebundenes) Ras bindet mit hoher Affinität an die RBD der Raf-Kinase und bewirkt dadurch die Translokation der Raf-Kinase aus dem Cytoplasma an die Innenseite der Plasmamembran. C-terminal verkürztes und dadurch unmodifiziertes Ras ist nicht in der Lage, diese essentielle Translokation und damit die Raf-Aktivierung zu vermitteln.

Während die Rolle der hydrophoben Modifikationen für die Raf-Rekrutierung unumstritten ist, werden in der Literatur weitere Funktionen der Lipidmodifikationen des Ras-Proteins kontrovers diskutiert. So wird vermutet, daß der Farnesylrest neben der Verankerung in der Plasmamembran zusätzlich an der Bindung zwischen Ras und der Raf-Kinase beteiligt und damit für den Aktivierungsprozeß von Bedeutung ist. Als Bindungsstelle der Farnesylgruppe wird insbesondere die C1-Domäne der Raf-Kinase diskutiert.

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit soll diese Kontroverse näher untersuchen. Dazu wurden Ras-Konstrukte konzipiert, welche die membranale Lokalisation des Ras-Proteins unabhängig von C-terminalen Lipidmodifikationen gewährleisten (**Abbildung 3.1**). Hierfür wurden die 44 N-terminalen Aminosäuren des E1-Proteins des *avian* Coronavirus an den N-Terminus des konstitutiv aktivierten RasG12V-Proteins fusioniert. Diese Aminosäuresequenz besteht aus einer kurzen aminoterminalen Domäne mit zwei Glykosylierungsstellen und einer als m1 bezeichneten Transmembran-Domäne. In der Wildtyp-Form führt die m1-Domäne aufgrund

eines Retentionssignals zur Lokalisation des Proteins an die *cis*-Seite der Golgi-Membran. Die Mutation der Aminosäure 37 von Glutamin zu Isoleucin (QI) bewirkt eine Aufhebung des Golgi-Retentionssignals und einen Transport des Proteins an die Plasmamembran. Des weiteren wurden zwischen der m1-Domäne und dem N-Terminus des Ras-Proteins ein *linker* von 24 Aminosäuren eingefügt, bestehend aus mehreren Wiederholungen eines Serinrestes und zweier Glycinreste (*GSS-repeats*). Experimente haben gezeigt, daß eine Insertion von mindestens 11 Aminosäuren für eine Aktivierung durch ein solch chimäres Konstrukt essentiell ist (Hart und Donoghue 1997; Machamer *et al.* 1990; Machamer und Rose 1987). Dieses Konstrukt wird im folgenden mit QI-RasG12V.3C bezeichnet. Durch zusätzliche Mutation der drei C-terminalen Cysteine (3C) zu Serinen (3S), wird die posttranslationale Modifikation des Ras-Konstruktes verhindert. Dieses Konstrukt wird im folgenden als QI-RasG12V.3S bezeichnet.

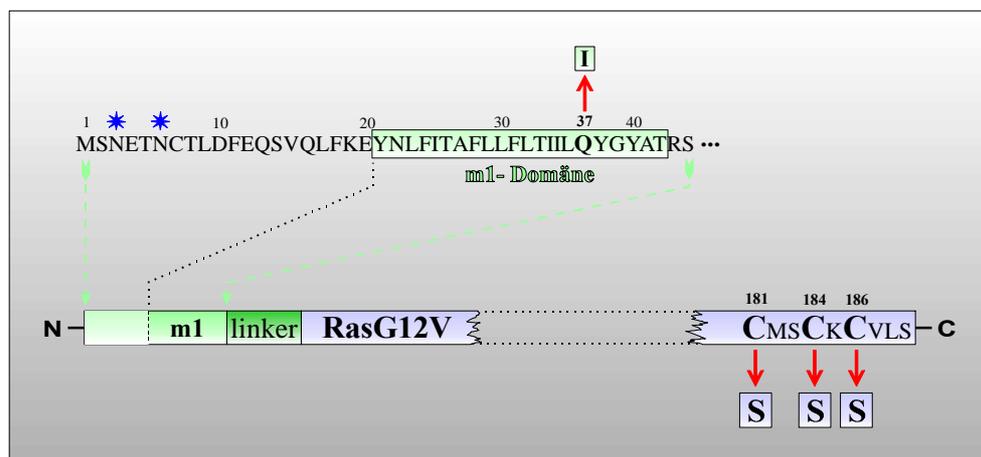


Abbildung 3.1 Schema der Konzeption der QI-RasG12V-Konstrukte

Die 44 N-terminalen Aminosäuren des E1-Proteins des *avian* Coronavirus (oben) wurden, verbunden über mehrere als *linker* fungierende *GSS-repeats*, an den N-Terminus des konstitutiv aktivierten RasG12V-Proteins fusioniert. Durch Mutation der drei C-terminalen Cysteine (3C) entsteht aus dem QI-RasG12V.3C- das QI-RasG12V.3S-Konstrukt. * = Glykosylierungsstellen, m1 = Transmembran-Domäne, Q→I = Mutation von Glutamin zu Isoleucin, C→S = Mutation von Cystein zu Serin.

Die **Abbildung 3.2** zeigt vergleichend die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Ras-Konstrukte und deren Lokalisation an der Plasmamembraninnenseite. Das unveränderte RasG12V-Konstrukt besitzt die intakte CaaX-Sequenz und ist deshalb durch eine Farnesyl- und zwei Palmitylgruppen in der Plasmamembran verankert. Das QI-RasG12V.3S-Konstrukt ist aufgrund der mutierten drei C-terminalen Cysteine nicht lipidmodifiziert. Statt dessen ist dieses artifizielle Ras-Protein durch eine N-terminale Transmembran-Helix in der Plasma-

membran inseriert. Das QI-RasG12V.3C-Konstrukt ist sowohl durch die aminoterminalen Transmembran-Helix als auch durch die herkömmlichen Lipidmodifikationen des unveränderten C-Terminus zweifach in der Plasmamembran verankert.

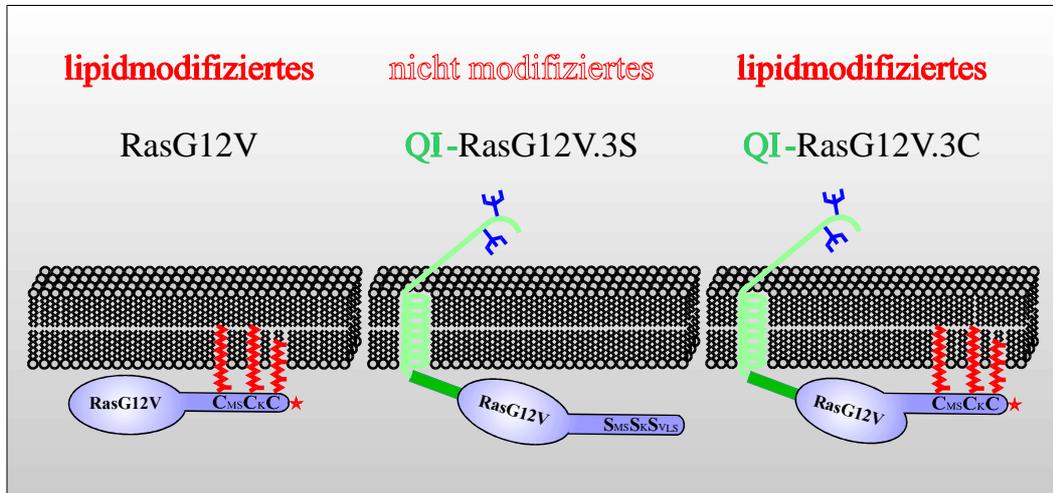


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der verwendeten Ras-Konstrukte

Links: unverändertes, lipidmodifiziertes RasG12V ist durch eine Farnesyl- und zwei Palmitoylgruppen in der Plasmamembran verankert. Mitte: QI-RasG12V.3S ist durch eine N-terminale Transmembran-Helix in der Plasmamembran inseriert; aufgrund der mutierten C-terminalen Cysteine fehlen die Lipidmodifikationen. Rechts: die Verankerung von QI-RasG12V.3C in der Plasmamembran erfolgt durch die herkömmlichen Lipidmodifikationen des C-Terminus und durch eine aminoterminalen Transmembran-Helix. ★ = Carboxymethylgruppe, Ψ = Glykosylierungen.

3.1.1 Aktivierung von c-Raf(Wt) durch QI-RasG12V.3S

Nach erfolgter Klonierung des chimären QI-RasG12V.3S-Konstruktes (vgl. 2.2.5.9) mußte zunächst überprüft werden, ob die Raf-Kinase durch dieses artifizielle Ras-Protein aktiviert werden kann, und wie effizient die potentielle Aktivierung ist. Dazu wurden Luciferase-Reportergen-Assays und Kinase-Aktivitäts-Assays durchgeführt.

3.1.1.1 Aktivierung im Luciferase-Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit dem pcDNA3-Leervektor, 80 ng des RasG12V-Plasmids bzw. mit steigenden Plasmidmengen von 80 ng, 160 ng, 240 ng, 320 ng und 400 ng des QI-RasG12V.3S-Konstruktes ohne bzw. zusätzlich mit einem c-Raf(Wt)-Plasmid transient transfiziert. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Luciferase-

Reportergen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.3** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten in Prozent der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung.

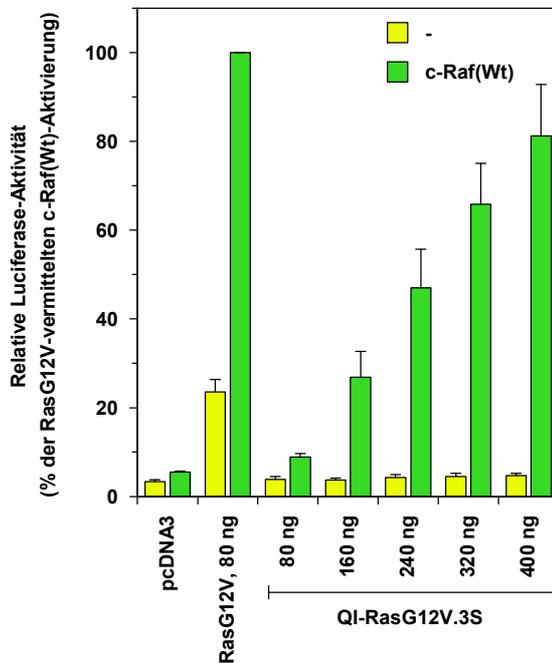


Abbildung 3.3

QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch c-Raf(Wt) im Luciferase-Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, 80 ng des RasG12V-Plasmids bzw. mit steigenden Plasmidmengen des QI-RasG12V.3S-Konstruktes (80 ng bis 400 ng) transient transfiziert. Wo angezeigt erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des c-Raf(Wt)-Plasmids. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Die QI-RasG12V.3S-vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung steigt proportional mit der transfizierten Plasmidmenge und beträgt für die eingesetzten Mengen von 80 ng bis 420 ng 9 %, 27 %, 47 %, 66 % bzw. 81 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Die Aktivierung bei alleiniger Transfektion des QI-RasG12V.3S-Konstruktes beträgt abhängig von der jeweilig transfizierten Plasmidmenge zwischen 3,7 % und 4,7 % und ist damit nicht signifikant höher als die Aktivierung bei Transfektion des pcDNA3-Leervektor von 3,4 %. Auch die durch endogenes Ras-Protein bedingte c-Raf(Wt)-Aktivierung ist mit 5,5 % kaum höher. Die basale Aktivierung endogener Raf-Kinase durch RasG12V beträgt 23,5 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine im Vergleich zu RasG12V ca. fünffach höhere Menge an QI-RasG12V.3S-Plasmid transfiziert werden muß, um etwa 80 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung zu erzielen. Obwohl scheinbar die Effizienz der durch QI-RasG12V.3S induzierten Raf-Aktivität geringer ist bleibt festzuhalten, daß die C-terminalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins *per se* für eine Aktivierung nicht essenziell sind.

3.1.1.2 Aktivierung im Kinase-Aktivitäts-Assay

Als weitere Methode zum Nachweis der Fähigkeit zur Aktivierung der Raf-Kinase wurde das QI-RasG12V.3S-Konstrukt in einem Kinase-Aktivitäts-Assay eingesetzt. Bei dieser Methode wird als Maß der Raf-Aktivierung die direkte Phosphorylierung von MEK als natürlichem Substrat der Raf-Kinase gemessen. Der Kinase-Aktivitäts-Assay erlaubt im Gegensatz zum Luciferase-Reportergen-Assay einen direkteren Nachweis der Raf-Aktivierung.

Für die Durchführung des Kinase-Aktivitäts-Assays wurden RK13-Zellen mit pcDNA3-Leervektor, c-Raf(Wt)-Vektor und 100 ng des RasG12V-Plasmids bzw. mit 500 ng des QI-RasG12V.3S-Konstruktes jeweils ohne und mit zusätzlichem c-Raf(Wt)-Vektor transient transfiziert. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Kinase-Aktivitäts-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.8), dessen Resultat in **Abbildung 3.4** dargestellt ist.

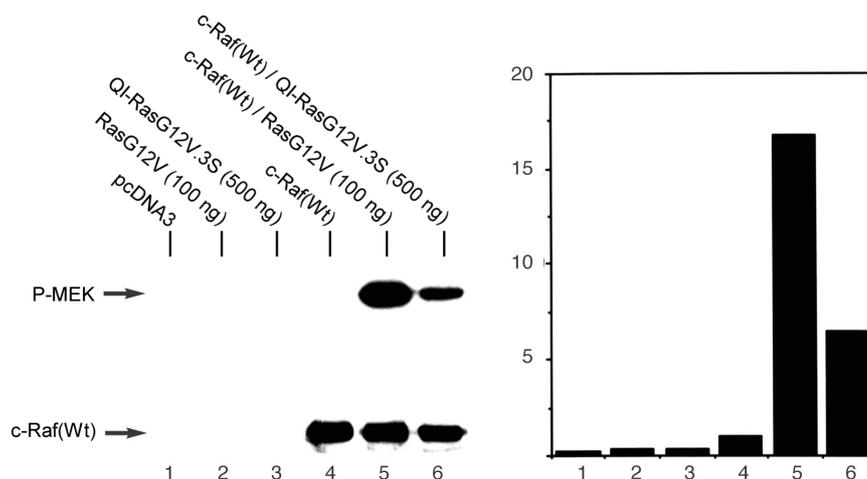


Abbildung 3.4 QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch c-Raf(Wt) im Kinase-Aktivitäts-Assay

RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, 100 ng des RasG12V-Plasmids bzw. mit 500 ng des QI-RasG12V.3S-Konstruktes transient transfiziert. Wo angezeigt erfolgte eine zusätzliche Koftransfektion des c-Raf(Wt)-Plasmids. Die linke Abbildung zeigt im oberen Teil die Phosphorylierung des eingesetzten MEK-Substrates. Darunter ist die Immundetektion der exprimierten Raf-Kinase gezeigt. Die Quantifizierung der MEK-Phosphorylierung ist in der rechten Abbildung dargestellt.

Die linke Abbildung zeigt im oberen Teil qualitativ die durch die aktivierte Raf-Kinase bedingte Phosphorylierung des in die Kinase-Reaktion eingesetzten MEK-Substrates. Nur in Ansätzen, bei denen eine Koftransfektion des c-Raf(Wt)-Plasmids und eines der für ein konstitutiv aktives Ras-Protein codierenden Vektors erfolgte, kann eine deutliche Phosphorylierung

festgestellt werden. Dabei zeigt sich, daß im Vergleich zu der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung die durch QI-RasG12V.3S-vermittelte Aktivierung zu einer deutlich geringeren Substrat-Phosphorylierung führt. Die mittels *Phosphoimager* durchgeführte Quantifizierung der Phosphorylierungssignale ist in der rechten Teilabbildung dargestellt. QI-RasG12V.3S führt zu einer Aktivierung von c-Raf(Wt) um das 7-fache, während RasG12V eine Steigerung der c-Raf(Wt)-Aktivität um das 17-fache induziert. Im unteren Teil der linken Abbildung ist der immunologische Nachweis der in den transfizierten Zellen exprimierten und im Verlauf des Kinase-Aktivitäts-Assays immunpräzipitierten Raf-Kinase mittels *Western-Blot* gezeigt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine im Vergleich zu RasG12V ca. fünffach höhere Menge an QI-RasG12V.3S-Plasmid zu etwa 40 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung führt. Die Resultate des Kinase-Aktivitäts-Assays bestätigen damit die Ergebnisse des Luciferase-Reporter-Gen-Assays, auch wenn die Effizienz der durch QI-RasG12V.3S induzierten c-Raf(Wt)-Aktivität im Kinase-Aktivitäts-Assay um etwa 50 % geringer ist. Die C-terminalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins sind demnach *per se* für eine Aktivierung der Raf-Kinase nicht essentiell.

3.1.1.3 Expressionskontrolle des QI-RasG12V.3S-Konstruktes

Die Resultate des Luciferase-Reporter-Gen-Assays und des Kinase-Aktivitäts-Assays haben gezeigt, daß die Transfektion einer im Vergleich zu RasG12V ca. fünffach höhere Menge an QI-RasG12V.3S-Plasmid zu etwa 80 % bzw. 40 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung führen. Es stellt sich die Frage, ob die gezeigten Aktivierungen durch QI-RasG12V.3S auf eine im Vergleich zu RasG12V erhöhten Überexpression zurückzuführen sind. Deshalb wurde zur Kontrolle ein Vergleich der Expressionsniveaus des RasG12V- und des QI-RasG12V.3S-Proteins durchgeführt.

RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, 100 ng des RasG12V- bzw. 500 ng des QI-RasG12V.3S-Plasmids transient transfiziert. Nach Zellernte und -aufschluß wurden, gemäß der unterschiedlichen Transfektionseffizienz der verschiedenen Ansätze, entsprechende Volumina an Zell-Lysaten auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der separierten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immundetektion der Ras-Proteine durch einen gegen H-Ras gerichteten primären Antikörper. Das Ergebnis des *Western-Blots* ist in **Abbildung 3.5** dargestellt.

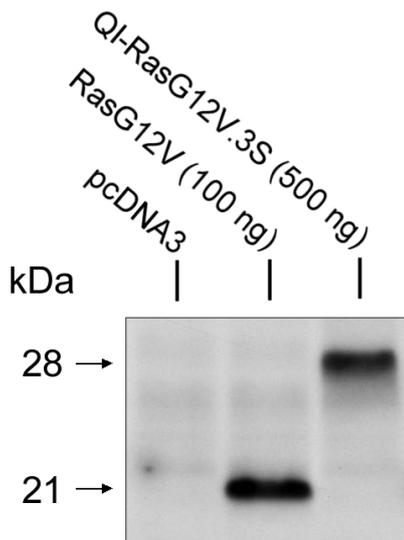


Abbildung 3.5 Vergleich der Expression von RasG12V und QI-RasG12V.3S

Zur Kontrolle der Expression von RasG12V und QI-RasG12V.3S wurden RK13-Zellen mit 100 ng bzw. 500 ng des entsprechenden Konstruktes transient transfiziert. Zell-Lysate wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine nach Auftrennung auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immundetektion der Ras-Proteine erfolgte durch einen gegen H-Ras gerichteten primären Antikörper. Das RasG12V-Protein hat ein Molekulargewicht von 21 kDa; während das QI-RasG12V.3S-Protein aufgrund der zusätzlichen N-terminalen Fusion ein höheres Molekulargewicht von 28 kDa besitzt.

Da das chimäre QI-RasG12V.3S-Protein aufgrund der zusätzlichen N-terminalen Fusion ein um etwa 7 kDa höheres Molekulargewicht als das RasG12V-Protein besitzt, konnte die Expression der beiden Proteine unabhängig vom Hintergrund an endogenen Ras-Proteinen durch direkten Vergleich der überexprimierten Proteine kontrolliert werden. Der *Western-Blot* zeigt, daß es auch bei Transfektion einer fünffach höheren Menge des QI-RasG12V.3S-Vektors zu keiner höheren Expression des QI-RasG12V.3S-Proteins im Vergleich zur Expression des RasG12V-Proteins kommt. Endogenes Ras-Protein konnte unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine höhere Menge an QI-RasG12V.3S-Plasmid notwendig ist, um eine äquivalente Expression im Vergleich zu RasG12V zu erzielen. Dies bedeutet darüber hinaus, daß die in 3.1.1.1 und 3.1.1.2 gezeigte QI-RasG12V.3S-vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung nicht auf eine im Vergleich zu RasG12V höhere Expression zurückzuführen ist.

3.1.2 Aktivierung von c-Raf C1-Mutanten durch QI-RasG12V-Konstrukte

In vorausgegangenen Arbeiten konnten durch extensive Alanin-Scanning-Mutagenese oberflächenexponierter Aminosäuren der c-Raf C1-Domäne zahlreiche Aminosäuren mit aktivierenden und inhibierenden Effekt auf die RasG12V-vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung identi-

fiziert werden (Daub *et al.* 1998). Die so ermittelten Aminosäuren konnten zu verschiedenen funktionellen Epitopen gruppiert werden (**Abbildung 3.6**). Ein aktivierendes Epitop wird aus den Aminosäuren N140, Q166 und T167 gebildet, welche in unmittelbarer Nähe der Zn1-koordinierenden Aminosäuren lokalisiert sind. Ein zweites aktivierendes Epitop, bestehend aus den Aminosäuren R143 und T145, befindet sich auf dem β 1-Strang der C1-Domäne. Ein drittes aktivierendes Epitop wird durch die Aminosäuren F151, D153, Q156, K157, K171 und H175 gebildet und ist auf den Strängen β 2, β 3, β 5 und der α 1-Helix lokalisiert. Ein inhibitorisches Epitop wird von den C-terminalen Aminosäuren S177, T182 und M183 gebildet; ein zweites von den auf den Strängen β 1 und β 4 lokalisierten Aminosäuren K144 und R164. Die Aminosäure L160 ist eine separat lokalisierte Aminosäure mit inhibierendem Effekt, die keinem der Epitope zugeordnet werden kann und befindet sich an einer Position, die zu der Phorbolster-Bindungsstelle der PKC C1-Domäne homolog ist.

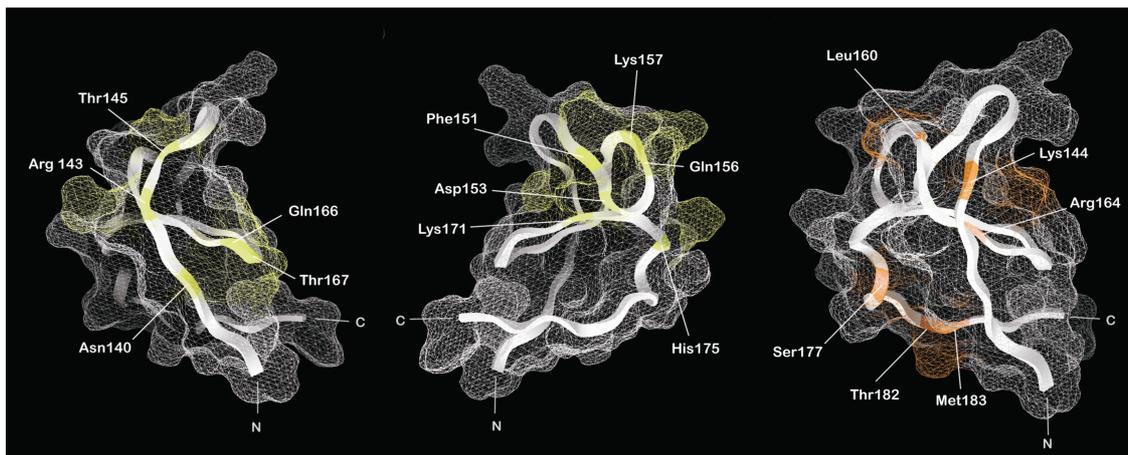


Abbildung 3.6 Funktionelle Epitope der c-Raf C1-Domäne

Die Struktur der c-Raf C1-Domäne wurde durch NMR-Analyse bestimmt (Mott *et al.* 1996); Die Oberfläche wurde mittels GRASP modelliert (Nicholls *et al.* 1991). Aminosäuren, die zu Alanin mutiert einen aktivierenden Effekt auf die Transaktivierung zeigen sind gelb, solche die einen inhibierenden Effekt zeigen rot hervorgehoben. Links: Sicht auf den N-terminalen Bereich der c-Raf C1-Domäne unter Berücksichtigung der aktivierenden C1-Mutanten. Die Aminosäuren bilden zwei Epitope, bestehend aus den Aminosäuren Asn140, Gln166 und Thr167 bzw. Arg143 und Thr145. Mitte: Sicht auf den C-terminalen Bereich der c-Raf C1-Domäne mit einem dritten aktivierenden Epitop bestehend aus den Aminosäuren Phe151, Asp153, Gln156, Lys157, Lys171 und His175. Rechts: zwei inhibitorische Epitope werden von den C-terminalen Aminosäuren Ser177, Thr182 und Met183 bzw. von den Aminosäuren Lys144 und Arg164 gebildet. Leu160 ist eine separat lokalisierte Aminosäure mit inhibierendem Effekt, die keinem Epitop zugeordnet ist.

Die dargestellten Resultate der Aktivierung der verschiedenen c-Raf C1-Mutanten wurden durch Luciferase-Reporter-Gen-Assays unter Verwendung von RasG12V ermittelt. Nachdem eine Aktivierung von c-Raf(Wt) nachweislich auch durch nicht lipidmodifiziertes Ras-Protein

erfolgen kann (vgl. 3.1.1), stellt sich die Frage, ob die von Daub *et al.* erhaltenen Ergebnisse bei Verwendung des artifiziiellen, unmodifizierten QI-RasG12V.3S-Proteins reproduziert werden können. Dies gäbe Aufschluß über die Abhängigkeit der aktivierenden und inhibierenden Effekte der diversen c-Raf C1-Mutanten von den posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins.

3.1.2.1 Aktivierung aktivierender C1-Mutanten durch QI-RasG12V.3S

RK13-Zellen wurden mit dem pcDNA3-Leervektor, dem c-Raf(Wt)-Plasmid und den verschiedenen Konstrukten der von Daub *et al.* charakterisierten aktivierenden Einfach- und Mehrfachmutanten der c-Raf C1-Domäne transient transfiziert. In allen Fällen erfolgte jeweils eine Kotransfektion der Zellen mit 400 ng des QI-RasG12V.3S-Konstruktes. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Luciferase-Reporter-Gen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.7** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten in Prozent der QI-RasG12V.3S-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung.

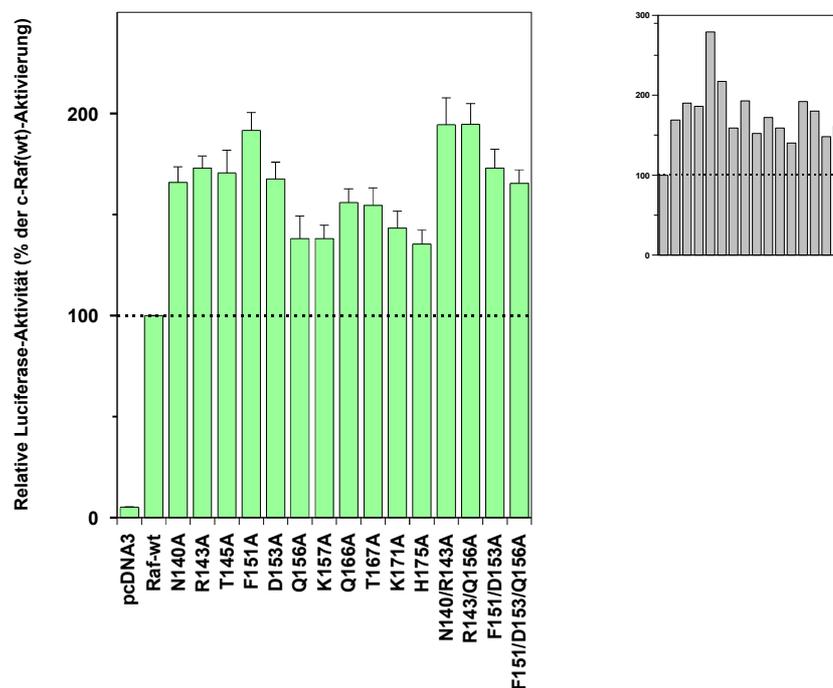


Abbildung 3.7 QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch aktivierende c-Raf C1-Mutanten im Luciferase-Reporter-Gen-Assay

RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, c-Raf(Wt)-Plasmid bzw. Konstrukten verschiedener aktivierender c-Raf C1-Alanin-Mutanten transient transfiziert. In allen Fällen erfolgte die Kotransfektion des QI-RasG12V.3S-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Die Nebengraphik zeigt zum Vergleich die von Daub *et al.* unter Verwendung von RasG12V erhaltenen Resultate.

Die Transaktivierung der unterschiedlichen c-Raf C1-Alaninmutanten durch QI-RasG12V.3S beträgt in allen Fällen zwischen 150 % und 200 % der c-Raf(Wt)-Aktivierung. Diese Resultate sind nahezu kongruent mit jenen, welche bei Aktivierung dieser mutierten c-Raf-Proteine durch farnesyliertes und palmityliertes RasG12V-Protein erhalten wurden (Daub *et al.* 1998). Die aktivierenden Effekte der analysierten c-Raf C1-Mutanten sind demnach unabhängig von jedweden Ras-Lipidmodifikationen beobachtbar. Weiterhin unterstreichen die Ergebnisse die generelle Potenz des artifiziellen QI-RasG12V.3S-Proteins zur Aktivierung der Raf-Kinase, wenn von der allgemein niedrigeren Effizienz bei der Aktivierung einmal abgesehen wird (vgl. 3.1.1).

3.1.2.2 Aktivierung inhibierender C1-Mutanten durch QI-RasG12V.3S

RK13-Zellen wurden mit dem pcDNA3-Leervektor, dem c-Raf(Wt)-Plasmid und den verschiedenen Konstrukten der von Daub *et al.* charakterisierten inhibierenden Einfach- und Mehrfachmutanten der c-Raf C1-Domäne transient transfiziert. In allen Fällen erfolgte jeweils eine Kotransfektion der Zellen mit 400 ng des QI-RasG12V.3S-Konstruktes. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.8** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten in Prozent der QI-RasG12V.3S-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung.

Der inhibitorische Effekt der c-Raf C1 Einzelmutanten S177A, T182A und M183A bewirkt eine Reduktion der Aktivierung auf ca. 65 % bis 70 % der Raf(Wt)-Aktivierung und ist damit etwas stärker als bei der RasG12V-induzierten Transaktivierung. Die Kombination dieser drei Einzelmutanten bzw. die Doppelmutante S177/T182A führt zu einer Aktivierung durch QI-RasG12V.3S von 35 % bzw. 65 % und ist damit gleich der durch lipidmodifiziertes RasG12V-Protein erzielten Aktivierung. Die Inhibierung durch die Einzelmutanten K144A, L160A und R164A ist bei Verwendung von QI-RasG12V.3S zur Stimulation mit 20 % bis 30 % deutlich stärker als bei Induzierung durch RasG12V, bei der für diese mutanten c-Raf-Proteine Werte von 70 % bis 80 % verglichen mit c-Raf(Wt) erhalten wurden. Auch die Kombination von K144A mit R164A bzw. L160A führt bei QI-RasG12V.3S-vermittelter Transaktivierung mit weniger als 10 % zu einer stärkeren Reduzierung der Aktivierung als bei Stimulation durch RasG12V, bei der 32 % bzw. 15 % erhalten wurden, und liegt damit im Bereich der Leervektor-Kontrolle. Die Vierfachmutante K144/R164/T182/M183A führt zur kompletten Inhibierung der Raf-Aktivierung, unabhängig, ob die Stimulation durch RasG12V oder durch QI-RasG12V.3S erfolgte.

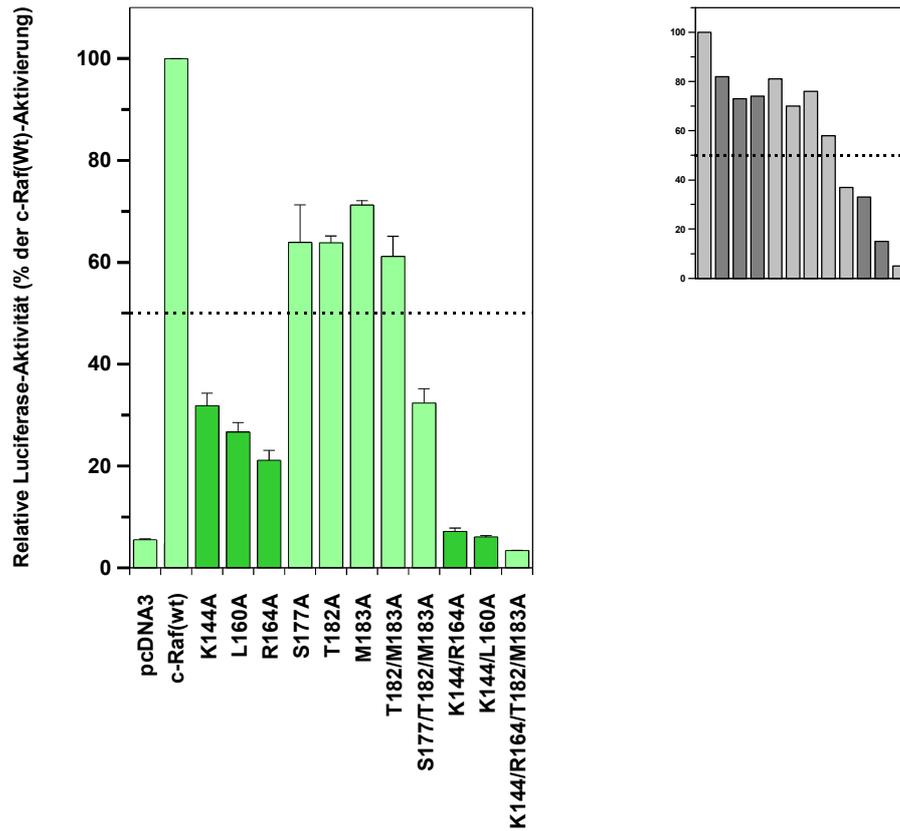


Abbildung 3.8 QI-RasG12V.3S-vermittelte Transaktivierung durch inhibierende c-Raf C1-Mutanten im Luciferase-Reporter-gen-Assay

RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, c-Raf(Wt)-Plasmid bzw. Konstrukten verschiedener inhibierender c-Raf C1-Alanin-Mutanten transient transfiziert. In allen Fällen erfolgte die Kotransfektion des QI-RasG12V.3S-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Dunkel hervorgehoben: signifikant geringere Transaktivierung als bei Stimulation mit RasG12V (Daub *et al.* 1998). Die Nebengraphik zeigt zum Vergleich die von Daub *et al.* unter Verwendung von RasG12V erhaltenen Resultate.

Auch die für die inhibierenden c-Raf C1-Mutanten erbrachten Resultate stimmen weitestgehend mit denen überein, die bei Aktivierung dieser mutierten c-Raf-Proteine durch farnesyliertes und palmyliertes RasG12V-Protein erhalten wurden (Daub *et al.* 1998). Die inhibierenden Effekte der analysierten c-Raf C1-Mutanten sind demnach ebenfalls unabhängig von jedweden Ras-Lipidmodifikationen beobachtbar. Die Rolle der in Abhängigkeit des jeweils eingesetzten Ras-Proteins am stärksten differierenden c-Raf C1-Mutanten bzw. deren Kombinationen werden unter 3.1.2.3 näher analysiert. Zusammenfassend unterstreichen auch diese Ergebnisse die generelle Potenz des artifiziiellen QI-RasG12V.3S-Proteins zur Aktivierung der Raf-Kinase.

3.1.2.3 Aktivierung inhibierender C1-Mutanten durch QI-RasG12V.3C

Speziell die inhibierenden c-Raf C1-Mutanten K144A, L160A und R164A und deren Kombinationen zeigen bei Stimulation durch QI-RasG12V.3S eine deutlich stärkere Reduzierung der Transaktivierung als bei Stimulation durch RasG12V (vgl. 3.1.2.2). Zur näheren Untersuchung dieses Phänomens sollte analysiert werden, wie sich die inhibierenden c-Raf C1-Mutanten bei Vermittlung der Aktivierung durch ein Ras-Protein verhalten, das zusätzlich zu der aminoterminalen Transmembran-Helix über die konventionellen C-terminalen Lipidmodifikationen verfügt und damit eine doppelte Verankerung in der Plasmamembran aufweist.

Dazu wurden RK13-Zellen analog zu den unter 3.1.2.2 beschriebenen Experimenten transient transfiziert, wobei jedoch in allen Fällen eine Kotransfektion der Zellen mit 400 ng des QI-RasG12V.3C-Konstruktes (vgl. **Abbildung 3.2**) erfolgte. Nach Zellernte und –aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.9** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten in Prozent der QI-RasG12V.3C-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung.

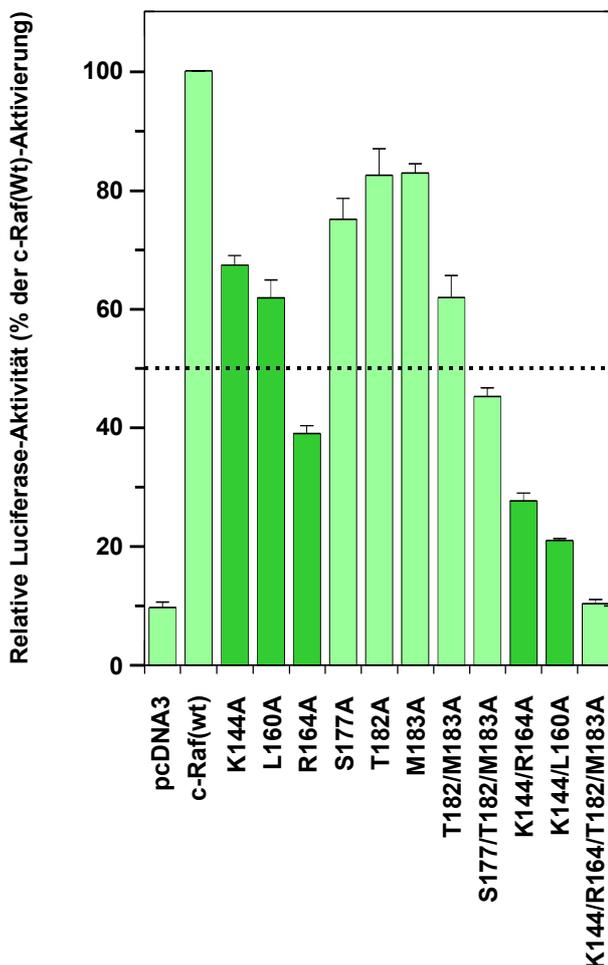


Abbildung 3.9

QI-RasG12V.3C-vermittelte Transaktivierung durch inhibierende c-Raf C1-Mutanten im Luciferase-Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, c-Raf(Wt)-Plasmid bzw. Konstrukten verschiedener inhibierender Raf C1-Alanin-Mutanten transient transfiziert. In allen Fällen erfolgte die Kotransfektion des QI-RasG12V.3C-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Dunkel hervorgehoben: signifikant stärkere Transaktivierung als bei Stimulation mit QI-RasG12V.3S (vgl. 3.1.2.2).

Die Inhibition durch die c-Raf C1 Einzelmutanten S177A, T182A und M183A beträgt bei Aktivierung durch QI-RasG12V.3C zwischen 75 % und 80 % und ist damit minimal geringer als bei Induzierung durch QI-RasG12V.3S. Das Aktivierungsniveau ist damit vergleichbar mit dem, das bei Stimulation durch RasG12V beobachtet wird. Auch die Dreifachmutante S177/T182/M183A zeigt bei Kotransfektion des QI-RasG12V.3C-Konstruktes eine um etwa 10 % stärkere Aktivierung als bei Kotransfektion des QI-RasG12V.3S-Plasmids. Die durch die Doppelmutante S177/T182A erzielte Transaktivierung liegt bei gut 60 %, unabhängig, ob die Induzierung durch das QI-RasG12V.3C- oder das QI-RasG12V.3S-Konstrukt erfolgte. Die Aktivierungen der Einzelmutanten K144A, L160A und R164A zeigen, verglichen mit der QI-RasG12V.3S-vermittelten Transaktivierung bei der das Niveau der Aktivierung zwischen 20 % und 30 % liegt, mit ca. 70 %, 65 % und 40 % den stärksten Anstieg. Auch die QI-RasG12V.3C-vermittelte Transaktivierung der Doppelmutanten K144/R164A und K144/L160A zeigt im Vergleich zu den in 3.1.2.2 dargestellten Resultaten einen etwa dreifachen Anstieg der Transaktivierung. Die erzielten stärkeren Aktivierungen bei Verwendung des QI-RasG12V.3C-Konstruktes können nicht durch eine Wechselwirkung der bei diesem Ras-Protein vorhandenen Lipidmodifikationen erklärt werden, da die potentiellen für diese Interaktion relevanten Aminosäuren zu Alanin mutiert sind und diesbezüglich nicht den Wildtyp repräsentieren. Für die beobachteten Abweichungen scheint vielmehr die unterschiedliche Art der Membranverankerung der verschiedenen Ras-Konstrukte und deren unterschiedliche Orientierung bzw. Distanz zur Plasmamembran verantwortlich zu sein. Auch die Interaktionen zu anderen Proteinen der Signalkaskade kann davon beeinflusst werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß auch das zweifach in der Plasmamembran inserierte QI-RasG12V.3C-Protein zur Aktivierung der Raf-Kinase fähig ist. Damit scheint vielmehr die generelle Membranlokalisation des Ras-Proteins als die Art und Weise der Verankerung für die Raf-Aktivierung von Bedeutung zu sein.

3.1.3 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) durch verschiedene RasG12V-Konstrukte

In den vorausgegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß sowohl c-Raf(Wt) als auch zahlreiche c-Raf-Konstrukte mit inhibierenden oder aktivierenden Mutationen in der C1-Domäne durch nicht farnesyliertes und palmyliertes RasG12V aktiviert werden können. In dem folgenden Abschnitt soll die in der Literatur kontrovers diskutierte Hypothese einer

potentiellen Interaktion der Farnesylgruppe mit der C1-Domäne der Raf-Kinase weiter entkräftet werden. Zu diesem Zweck wurde ein c-Raf-Konstrukt konzipiert, dessen C1-Domäne vollständig deletiert ist (**Abbildung 3.10**).

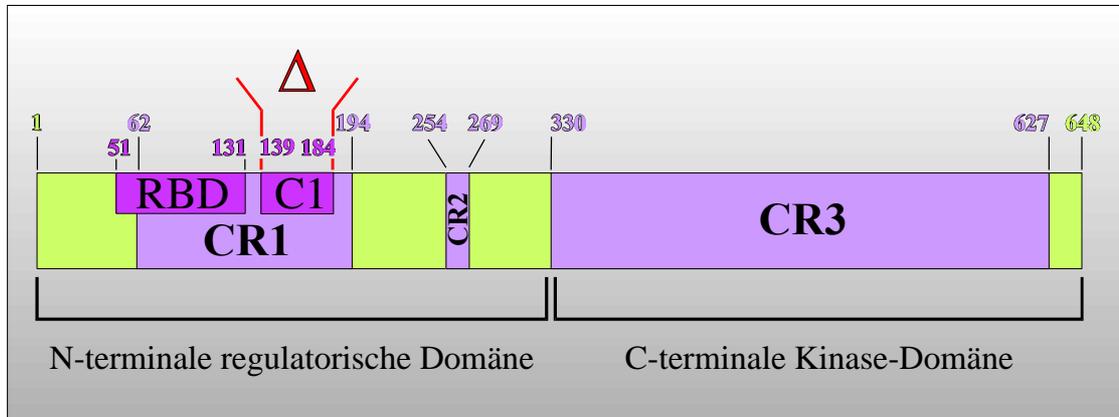


Abbildung 3.10 Schematische Darstellung des c-Raf(Delta C1)-Konstruktes

Das c-Raf(Δ C1)-Konstrukt unterscheidet sich von c-Raf(Wt) durch die Deletion (Δ) der Aminosäuren 139 bis 184 und damit der kompletten C1-Domäne. RBD = Ras-Bindungsdomäne; C1 = C1-Domäne; CR1, CR2 und CR3 = *conserved region* 1, 2 und 3. Die Zahlen geben die Position der die jeweiligen Domänen flankierenden Aminosäuren an.

Dieses als c-Raf(Δ C1) bezeichnete Konstrukt muß zunächst auf seine Aktivierbarkeit durch konventionelles, d.h. lipidmodifiziertes Ras-Protein geprüft werden. Erweist sich c-Raf(Δ C1) im zellulären System als aktiv, soll analysiert werden, ob Unterschiede in der Aktivierbarkeit von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch die verschiedenen Ras-Proteine und deren unterschiedlichen Modi der Membranverankerung feststellbar sind.

3.1.3.1 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Delta C1) durch RasG12V

RK13-Zellen wurden mit dem pcDNA3-Leervektor, dem c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Konstrukt ohne bzw. zusätzlich mit einem RasG12V-Plasmid transient transfiziert. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.11** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten. Das c-Raf(Δ C1)-Konstrukt weist eine hohe Basalaktivität auf. Diese ist gegenüber der basalen Aktivität des c-Raf(Wt)-Proteins um das fünffache erhöht und beträgt etwa 50 % der durch RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Die Koexpression des c-Raf(Δ C1)- und des RasG12V-Proteins bewirkt eine Erhöhung der c-Raf(Δ C1)-Aktivierung

über die Basalaktivität hinaus auf ein Niveau von ca. 100 % der RasG12V-induzierten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Die erhöhte Basalaktivität von etwa 50 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Δ C1)-Aktivierung zeigt, daß die c-Raf C1-Domäne eine wichtige Funktion bei der negativen Regulation der c-Raf-Kinaseaktivität besitzt. Die Deletion der C1-Domäne verursacht offensichtlich eine teilweise Aufhebung eines inhibierenden Regulationsmechanismus, so daß c-Raf(Δ C1) auch ohne Stimulation durch konstitutiv aktives RasG12V aktiv ist.

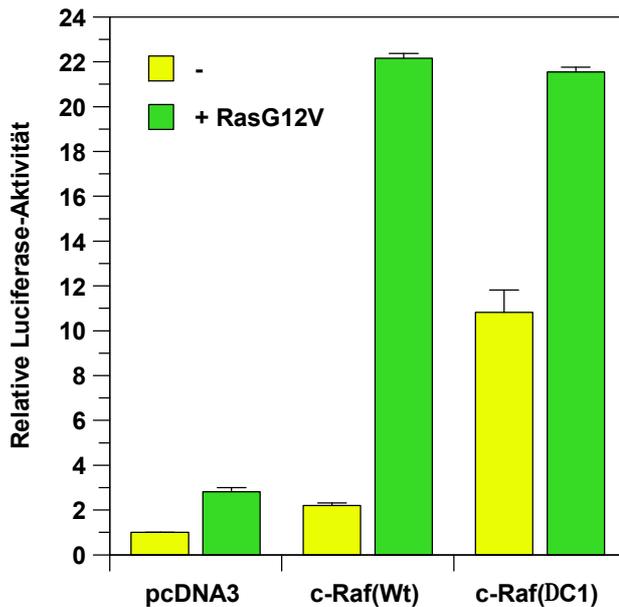


Abbildung 3.11

Vergleich der RasG12V-vermittelten Transaktivierung durch c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) im Luciferase-Reportergen-Assay
 RK13-Zellen wurden mit pcDNA3-Leervektor, c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Konstrukt transient transfiziert. Wo angezeigt erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des RasG12V-Plasmids. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3.2 Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an RasG12V

Die in 3.1.3.1 dargestellten Resultate zeigen, daß das artifizielle c-Raf(Δ C1)-Protein durch RasG12V erfolgreich aktiviert werden kann, wobei es eine relativ hohe Basalaktivität von etwa 50 % der Ras-vermittelten c-Raf(Δ C1)-Aktivierung aufweist. Hier stellt sich die Frage, inwiefern die Deletion der c-Raf C1-Domäne die Ras/Raf-Interaktion beeinflusst. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das unter 2.2.4.5 ausführlich dargestellte GAL4-Two-Hybrid-System in *S. cerevisiae* angewendet. Dieses System ermöglicht sowohl eine qualitative als auch semiquantitative Bestimmung der Interaktion zweier Proteine in einem eukaryontischen *in vivo*-System. Für die in diesem Abschnitt der Arbeit durchgeführten Experimente wurden das c-Raf(Wt)-, das c-Raf(Δ C1)- und das RasG12V-Konstrukt in die entsprechenden Hefe-Vektoren kloniert. Bei letzterem handelt es sich um C-terminal verkürztes RasG12V₍₁₋₁₆₆₎, das posttranslational nicht modifiziert wird. Dadurch erfolgt keine

Insertion des Proteins in die Plasmamembran, sondern die für diese Methode unabdingbare Translokation in den Zellkern.

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit dem RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Plasmid und jeweils einem der beiden c-Raf-Konstrukte transformiert und auf LTH⁻-Platten ausgestrichen. Nach ca. fünf Tagen Wachstum konnten auf beiden Selektionsplatten zahlreiche Kolonien identifiziert werden, was zunächst qualitativ eine Interaktion der in den Hefen exprimierten Ras- und Raf-Proteine anzeigt. Zwecks Quantifizierung wurden jeweils drei Kolonien auf neuen LTH⁻-Platten replattiert und für etwa drei weitere Tage inkubiert. Nach Aufschluß der jeweils gleichen Anzahl an Hefe-Zellen wurde die Aktivität der in den Hefen exprimierten β -Galactosidase als Parameter der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ bestimmt. **Abbildung 3.12** zeigt die gemittelten Daten der drei unabhängigen Experimente.

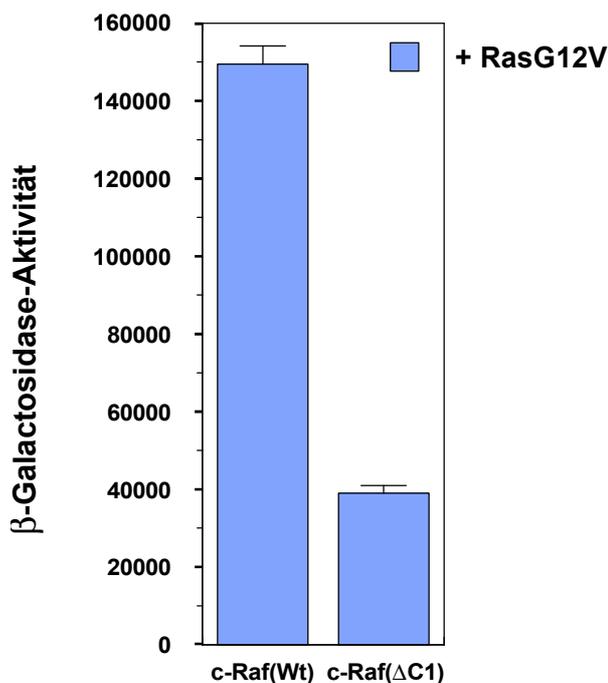


Abbildung 3.12

Semiquantitative Bestimmung der Bindung von H-Ras an c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(Delta C1) im Two-Hybrid-System

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit dem pPC86 c-Raf(Wt)- bzw. pPC86 c-Raf(Δ C1)-Konstrukt transformiert. In beiden Fällen erfolgte die Kotransformation des pPC97 RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Plasmids. Nach erfolgreichem Wachstum auf LTH⁻-Platten wurden gleiche Mengen an Hefe-Zellen aufgeschlossen und die β -Galactosidase-Aktivität als Maß der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ gemessen (vgl. 2.2.4.5.2). Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Die für die Bindung von RasG12V und c-Raf(Δ C1) bestimmte relative β -Galactosidase-Aktivität beträgt $3,9 \times 10^4$ und damit etwa 26 % der für die Interaktion von RasG12V und c-Raf(Wt) gemessenen Enzym-Aktivität von $1,5 \times 10^5$. Die Resultate können als Indiz für die Beteiligung der c-Raf C1-Domäne an der Ras/Raf-Interaktion gewertet werden und korrelieren mit Ergebnissen vorausgegangener Arbeiten, bei denen der die Aminosäuren S177, T182 und M183 der C1-Domäne umfassende Bereich als potentielles Ras-Bindungsepitop identifiziert wurde (Daub *et al.* 1998). Im Two-Hybrid-System zeigt die Mehrfachmutante S177/

T182/M183A gegenüber c-Raf(Wt) eine auf etwa 10 % bis 35 % reduzierte β -Galactosidase-Aktivität. Auch wenn in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, daß eine quantitative Korrelation zwischen der *in vitro* gemessenen Bindungsaffinität verschiedener c-Raf RBD-Einzelmutanten und der β -Galactosidase-Aktivität im Two-Hybrid-System besteht (Jaitner *et al.* 1997), ist eine Abnahme der β -Galactosidase-Aktivität um 75 % nicht äquivalent zu einer *in vitro* gemessenen Abnahme der Bindungsenergie im Sinne eines K_D -Wertes. Der Beitrag der c-Raf C1-Domäne zur Gesamtbindungsenergie der Ras/Raf-Interaktion ist eher als gering einzuschätzen.

3.1.3.3 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) durch QI-RasG12V.3S und QI-RasG12V.3C

Zur weiteren Funktionsanalyse der c-Raf C1-Domäne und deren potentieller Interaktion mit den C-terminalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins wurden transiente Transfektionen von RK13-Zellen mit dem entsprechenden c-Raf(Wt)- respektive c-Raf(Δ C1)-Plasmid vorgenommen, jeweils allein bzw. bei zusätzlicher Transfektion des QI-RasG12V.3S- bzw. des QI-RasG12V.3C-Konstruktes. Die Zell-Lysate wurden nach Zellernte und -aufschluß in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.13** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten.

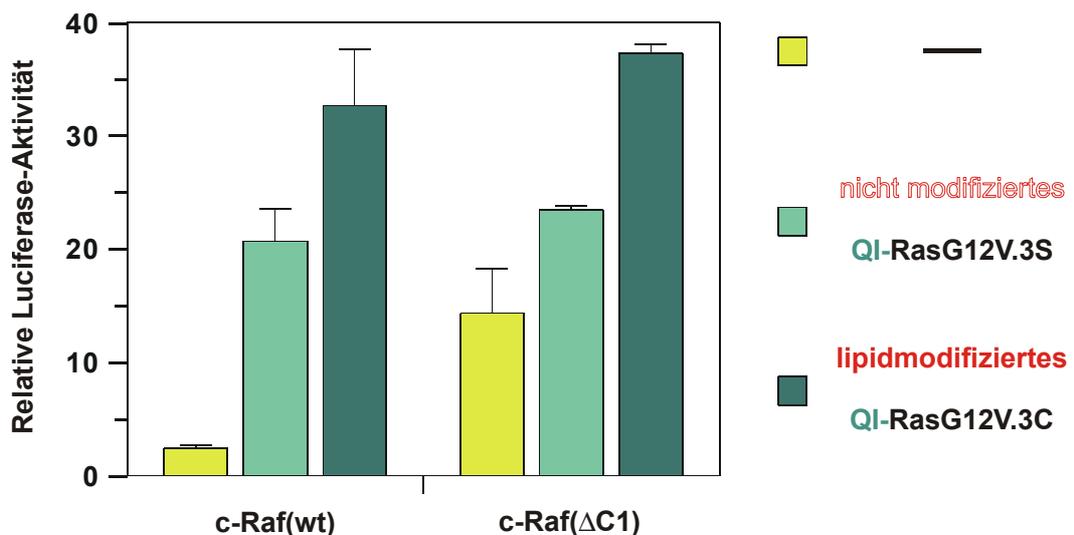


Abbildung 3.13 Vergleich der QI-RasG12V.3S- und QI-RasG12V.3C-vermittelten Transaktivierung durch c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) im Luciferase-Reportergen-Assay
 RK13-Zellen wurden mit c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Plasmid transient transfiziert. Wo angezeigt erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des QI-RasG12V.3S- bzw. des QI-RasG12V3C-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung zeigt zunächst die reproduzierbar hohe Basalaktivität des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Die Koexpression des QI-RasG12V.3S-Konstruktes führt zu einer Erhöhung der c-Raf(Δ C1)-Aktivierung um das 1,7-fache der Basalaktivität. Das Aktivierungsniveau entspricht damit etwa der durch das QI-RasG12V.3S-Konstrukt induzierten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Die Aktivierbarkeit eines Raf-Proteins mit deletierter C1-Domäne durch ein konstitutiv aktives Ras-Konstrukt ohne die konventionelle C-terminale Farnesylierung und Palmitoylierung zeigt, daß eine Interaktion der c-Raf C1-Domäne mit den Lipidmodifikationen des Ras-Proteins auszuschließen ist. Das QI-RasG12V.3C-Konstrukt, welches durch eine N-terminale Transmembran-Helix und zusätzlich durch die C-terminalen Ras-Lipidmodifikationen in der Plasmamembran verankert ist, führt verglichen mit der Stimulation durch das QI-RasG12V.3S-Konstrukt zu einem signifikanten Anstieg der c-Raf(Wt)-Aktivierung um das 1,6-fache. Eine vergleichbare Erhöhung der QI-RasG12V.3C-induzierten Aktivierung kann auch bei Verwendung des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes gemessen werden. Diese experimentellen Ergebnisse können in der Weise interpretiert werden, als daß die unzulängliche räumliche Orientierung des artifiziellen QI-RasG12V.3S-Konstruktes an der Plasmamembran, bedingt durch die aminoternale Fusion der Transmembran-Helix und des 24 Aminosäure langen *linkers*, durch eine zusätzliche C-terminale Insertion zumindest teilweise kompensiert werden kann.

3.1.3.4 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch QI-RasG12V.3S und C-terminal verkürzte QI-RasG12V-Konstrukte

Die durch Röntgenstrukturanalyse bestimmte dreidimensionale Struktur des H-Ras-Proteins (Pai *et al.* 1989) umfaßt nicht das Protein in seiner vollen Länge, sondern gibt ein C-terminal um 23 Aminosäuren verkürztes H-Ras-Konstrukt wieder (H-Ras₍₁₋₁₆₆₎). Die Schwierigkeiten bei der Expression und Kristallisation des kompletten H-Ras-Proteins deuten auf einen flexiblen und unstrukturierten C-Terminus hin. Die meisten der zu H-Ras durchgeführten Experimente wurden deshalb aus historischen Gründen mit diesem verkürzten Konstrukt unternommen. Dennoch wird zeitweilig diskutiert, ob den letzten ca. 20 Aminosäuren des H-Ras-Proteins, abgesehen von der posttranslationalen Modifikation und der dadurch bedingten Lokalisation des Ras-Proteins an der Plasmamembran, eine weitergehende Funktion zukommen. Auch wenn die C-terminalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins offensichtlich nicht mit der C1-Domäne der Raf-Kinase interagieren, wäre denkbar, daß eine Wechselwirkung zwischen den letzten 23 C-terminalen Aminosäuren und der c-Raf C1-Domäne

bestehen und so für die Ras-vermittelte c-Raf-Aktivierung von Bedeutung sind. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurden mehrere RasG12V-Konstrukte mit C-terminalen Verkürzungen unterschiedlicher Länge konzipiert (**Abbildung 3.14**). Die Insertion in die Plasmamembran wird bei diesen Proteinen wie im Falle des QI-RasG12V.3S-Konstruktes durch die aminoterminalen Fusion einer Transmembran-Helix gewährleistet.

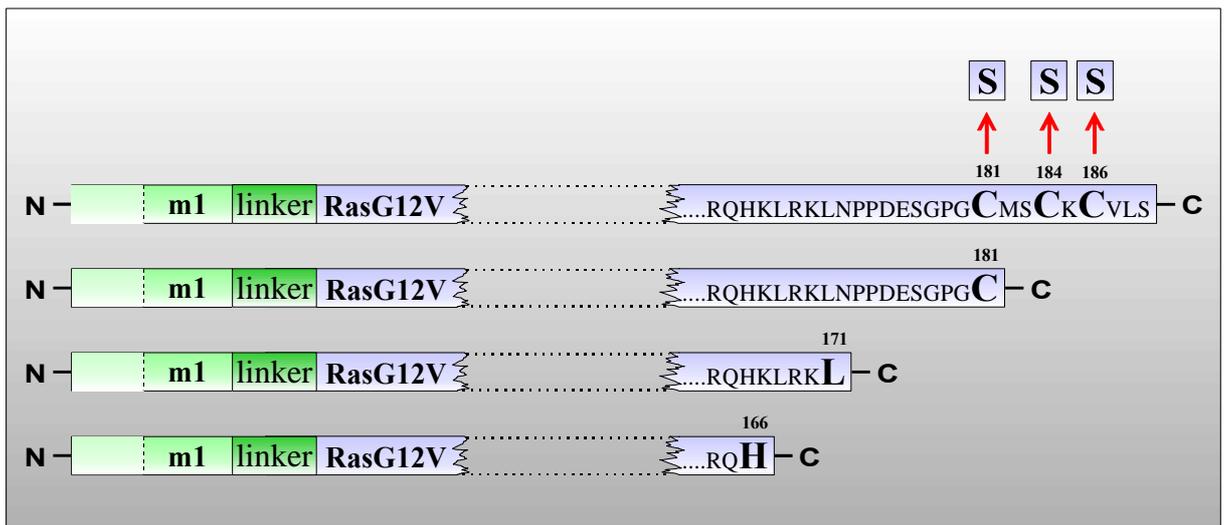


Abbildung 3.14 Schematische Darstellung C-terminal verkürzter QI-RasG12V-Konstrukte
 Oben: Darstellung des bereits beschriebenen QI-RasG12V.3S-Proteins. Darunter die Konstrukte QI-RasG12V.181, QI-RasG12V.171 bzw. QI-RasG12V.166 mit Deletion der letzten 8, 18 bzw. 23 C-terminalen Aminosäuren (C→S = Mutation von Cystein zu Serin).

Im folgenden soll vergleichend analysiert werden, ob Unterschiede in der Aktivierbarkeit von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch die verschieden verkürzten Ras-Konstrukte festzustellen sind, aus denen eine potentielle Interaktion zwischen dem Ras C-Terminus und der Raf C1-Domäne abgeleitet werden könnte. Dazu wurden RK13-Zellen mit RasG12V bzw. mit jeweils 400 ng der verschiedenen QI-RasG12V-Konstrukte transient transfiziert. Dabei erfolgte jeweils die Koexpression des c-Raf(Wt)- bzw. des c-Raf(Δ C1)-Proteins. Die Zell-Lysate wurden nach Zellernte und -aufschluß in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.15** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse zeigen zunächst die Reproduzierbarkeit der Aktivierung des c-Raf(Wt)- und des c-Raf(Δ C1)-Proteins durch das QI-RasG12V.3S-Konstrukt. Die Koexpression der verschiedenen verkürzten QI-RasG12V-Konstrukte mit c-Raf(Wt) führt zu Werten zwischen 99 % und 131 % der RasG12V-induzierten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Die Stimulation von

c-Raf(Δ C1) durch dieselben Ras-Konstrukte führt zu vergleichbaren Aktivierungsniveaus und liegen zwischen 98 % und 116 % bezogen auf die RasG12V-vermittelte Aktivierung. Die tendenziell höheren Aktivierungen sind durch erfahrungsgemäß unterschiedlich starke Expression der eingesetzten Ras-Konstrukte bedingt (C. Block, persönliche Mitteilung). Entscheidend ist, daß keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Aktivierbarkeit von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch die diversen C-terminal verkürzten Ras-Konstrukte feststellbar sind. Ein Einfluß der letzten 23 C-terminalen Aminosäuren des Ras-Proteins auf die Raf-Aktivierung kann, zumindest mit der hier benutzten Methode, nicht beobachtet werden.

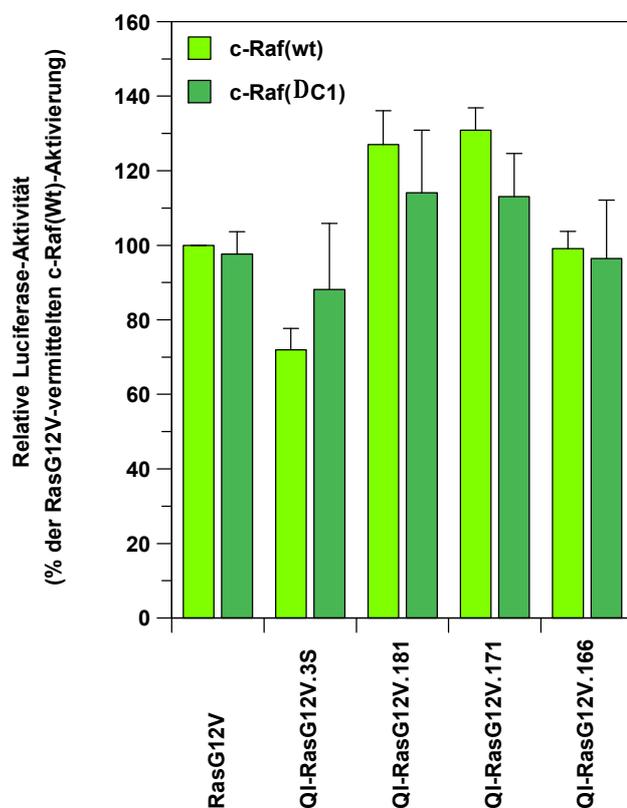


Abbildung 3.15

Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) vermittelt durch QI-RasG12V.3S und C-terminal verkürzte QI-RasG12V-Konstrukte im Luciferase-Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit RasG12V-, QI-RasG12V.3S-Plasmid bzw. QI-RasG12V-Konstrukten mit C-terminalen Verkürzungen unterschiedlicher Größe transient transfiziert. Wo angezeigt erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des c-Raf(Wt)- bzw. des c-Raf(Δ C1)-Plasmids. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Identifizierung eines mit der c-Raf C1-Domäne interagierenden Ras-Epitops

Die Ras-Subfamilie umfaßt neben den namengebenden Ras-Proteinen weitere Mitglieder, so etwa verschiedene Isoformen der Rap-Proteine. **Abbildung 3.16** zeigt exemplarisch den Vergleich der Aminosäuresequenz des H-Ras- und des Rap1A-Proteins. Bezogen auf ihre Gesamtheit zeigen die beiden Proteine eine Identität von 50 %. Im Bereich der Effektor-Region, auch als Kerneffektor-Region bezeichnet (Aminosäuren 32 bis 40), sind die Sequenzen sogar völlig identisch. Dieser Bereich ist für die Interaktion mit Effektor-Proteinen essentiell und ist weitestgehend mit der *switch I*-Domäne identisch. N- und C-terminal dieser Region ist eine Aktivierungs-Region lokalisiert, von deren Bereichen angenommen wird, daß sie für die Vermittlung der Effektorspezifität und für die Modulation der Affinitäten zu verschiedenen Effektoren von Bedeutung sind. Die Aktivierungs-Region erstreckt sich auf die Aminosäuren 25 bis 31 und 41 bis 53 (Okada *et al.* 1999; Tamada *et al.* 1997), wobei die Angaben in der Literatur zur Ausdehnung der zweiten Region sehr unterschiedlich sind. So wurden auch Eingrenzungen dieses Bereichs bis zu den Aminosäuren 54, 59 oder 49 getroffen (Hu *et al.* 1995; Shirouzu *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1990). Innerhalb dieser Aktivierungs-Region, an den Positionen 26, 27 und 45, liegen drei prominente Aminosäurereste, für die eine Beteiligung an der Ras/Raf-Interaktion diskutiert wird.

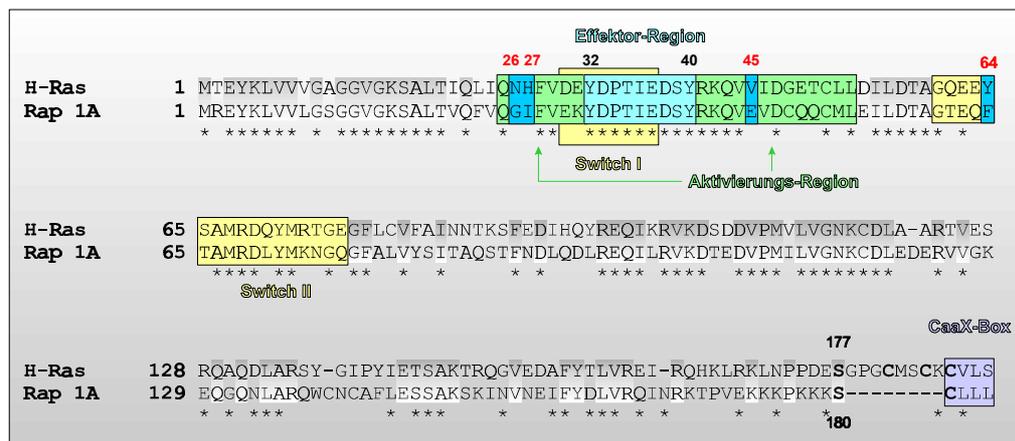


Abbildung 3.16 Vergleich der Aminosäuresequenz von H-Ras und Rap1A
 Die *switch I*- und *switch II*-Domänen der beiden GTPasen sind gelb, die Effektor-Region (auch Kerneffektor-Region genannt) hellblau unterlegt. N- und C-terminal der Effektor-Region liegt die Aktivierungs-Region (grün markiert), die hinsichtlich der Effektorspezifität und der Modulation der Affinität zu verschiedenen Effektoren eine Rolle spielt. Total konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für die Untersuchungen dieses Teils der Arbeit wichtige Aminosäuren sind dunkelblau umrahmt. Die für die posttranslationale Lipidmodifikation relevante, C-terminal lokalisierte CaaX-Box ist lilafarben hervorgehoben. Die Serine 177 bzw. 180 stellen potentielle Phosphorylierungsstellen dar.

So führen die Mutationen N26G und V45E zu einem Verlust der Ras/Raf-Interaktion (Hu *et al.* 1995; Hu *et al.* 1997) und zur Inhibition der Raf-Aktivierung (Akasaka *et al.* 1996; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1991; Shirouzu *et al.* 1994; Tamada *et al.* 1997). Hinweise für eine besondere Bedeutung der Aminosäure an Position 45 wurden auch durch weitere vorausgegangene Experimente erhalten; bei der schrittweisen Transformation von H-Ras zu Rap1A durch sukzessive Mutation der zwischen den beiden Proteinen divergierenden Aminosäuren, bzw. durch artifiziell hergestellte Ras/Rap-Chimären konnte Valin 45 in Ras als ein kritischer Rest für die Ras-Funktion identifiziert werden (Marshall *et al.* 1991; Zhang *et al.* 1990). Es wird vermutet, daß Valin 45 an der Interaktion zwischen Ras und der Raf-Kinase beteiligt ist und eventuell zusammen mit anderen Aminosäuren ein weiteres Raf-Bindungsepitop neben der bereits charakterisierten Effektor-Region darstellt. Als weiterer Aminosäurerest für die Ras/Raf-Bindung wird das Tyrosin 64 des Ras-Proteins diskutiert, wengleich dieses sich in der *switchII*-Domäne und damit außerhalb der Aktivierungs-Region befindet. Zum besseren Verständnis sind in der **Abbildung 3.17** die diskutierten Bereiche und Aminosäurereste in der dreidimensionalen Struktur des H-Ras-Proteins dargestellt.

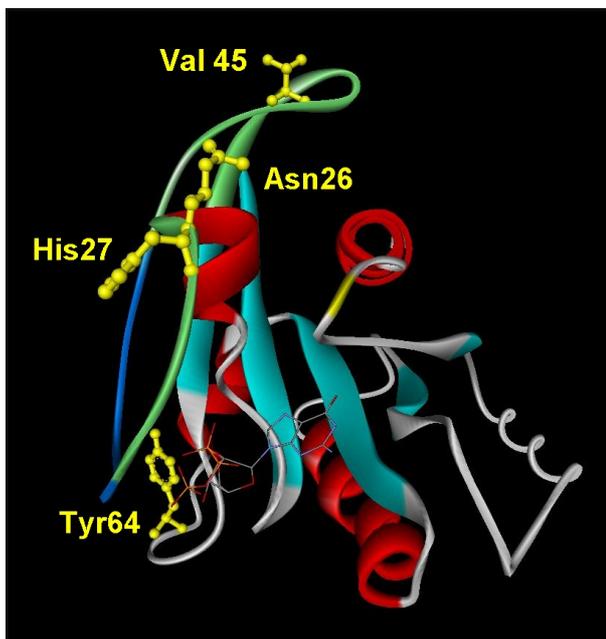


Abbildung 3.17

Lokalisation der Aminosäuren Asn26, His27, Val45 und Tyr64 in der dreidimensionalen Struktur von H-Ras₍₁₋₁₆₆₎

Die für die Effektor-Interaktion essentielle Effektor-Region ist dunkelblau hervorgehoben. Die angrenzenden Bereiche der Aktivierungs-Region sind grün markiert. Die diskutierten Aminosäuren Asn26, His27, Val45 und Tyr64 sind gelb dargestellt (nähere Erläuterungen im Text). Das gebundene GTP ist als Stabmodell wiedergegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt (verändert nach Schlichting *et al.* 1990).

Auch auf seiten der Raf-Kinase wird neben der RBD ein zweiter Interaktionsbereich mit geringer Affinität für die Ras/Raf-Bindung diskutiert. Daub *et al.* konnten beispielsweise ein putatives interagierendes Epitop, bestehend aus den Aminosäuren S177, T182 und M183 der c-Raf C1-Domäne, identifizieren. Andere Autoren vermuten in den Aminosäuren L149 und F151 einen ebensolchen Interaktionsbereich (Williams *et al.* 2000), wobei hier jedoch die

Farnesylgruppe des posttranslational modifizierten Ras-Proteins bei der Wechselwirkung von zusätzlicher Bedeutung sein soll. Die Beteiligung der Ras-Lipidmodifikationen bei einer solchen Interaktion ist jedoch umstritten und konnte in der vorliegenden Arbeit nicht verifiziert werden (siehe 3.1).

In diesem Teil der Arbeit soll zunächst der Effekt von Aminosäure-Substitutionen der Position 45 des Ras-Proteins auf die Ras-vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung untersucht werden. Sollten sich dabei inhibierende Effekte zeigen, stellt sich hinsichtlich einer putativen Interaktion mit der Raf C1-Domäne die Frage, wie sich eine Transaktivierung des unter 3.1.3.1 charakterisierten c-Raf(Δ C1)-Konstruktes mit vollständiger Deletion der C1-Domäne darstellt. Darüber hinaus soll der Einfluß weiterer Aminosäuren der Aktivierungs-Region auf die Ras-induzierte Aktivierung der beiden Raf-Proteine analysiert werden. Für die durch Luciferase-Reportergen-Assays ermittelten Aktivierungsdaten soll parallel mittels Two-Hybrid-System nach Divergenzen bezüglich der Bindung zu c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) gefahndet werden. Durch Bestimmung von Ras-Mutanten, die eine Diskriminierung zwischen diesen beiden Raf-Konstrukten zeigen, soll in folgendem ein zweites Raf-Bindungsepitop aufseiten des Ras-Proteins charakterisiert werden. Zuletzt wird der Versuch unternommen, einem solchen identifizierten zweiten Bindungsepitop einen interagierenden Bereich seitens der Raf-Kinase respektive der c-Raf C1-Domäne, gegenüberzustellen.

3.2.1 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch verschiedene RasG12V.V45-Mutanten

In diesem Teil der Arbeit soll der Effekt verschiedener Aminosäure-Substitutionen in der Position 45 des konstitutiv aktiven H-Ras-Proteins auf die Ras-vermittelte Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) im Luciferase-Reportergen-Assay untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein RasG12V-Konstrukt konzipiert, welches anstatt der in H-Ras an dieser Position befindlichen Aminosäure Valin die zu Rap1A analoge Aminosäure Glutamat besitzt (V45E). Die Substitution eines kleinen hydrophoben Aminosäurerestes durch einen sterisch anspruchsvollen, negativ geladenen Rest läßt in diesem Fall einen starken Effekt auf die Aktivierung der Raf-Kinase erwarten. Um eine differenziertere Aussage über die Relevanz der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Aminosäuren in dieser Position machen zu können, wurden weitere Konstrukte erstellt. Durch die Mutation V45R wird ein ebenfalls sterisch anspruchsvoller Aminosäurerest an dieser Position eingeführt, der jedoch eine

positive Ladung aufweist. Das RasG12V.V45W-Konstrukt besitzt bedingt durch einen Tryptophanrest eine ebenfalls räumlich anspruchsvolle Seitenkette, jedoch mit hydrophobem Charakter. Um zu überprüfen, ob auch weniger drastische Veränderungen noch zu detektierbaren Effekten im Aktivierungs-Assay führen, wurde mit der Mutante V45A darüber hinaus ein Konstrukt geschaffen, das in der Position 45 über eine nur moderate Substitution durch ein Alanin verfügt (vgl. 2.2.5.9).

Für die Untersuchungen wurden RK13-Zellen mit den verschiedenen mutierten RasG12V-Konstrukten separat transfiziert. Dabei erfolgte in jeweils einem Drittel der Ansätze durch Kotransfektion der entsprechenden Plasmide eine zusätzliche Expression des c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Proteins. Die Lysate der geernteten und aufgeschlossenen Zellen wurden in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt und die Luciferase-Aktivitäten bestimmt (vgl. 2.2.5.7). Die **Abbildung 3.18** zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten für die durch die verschiedenen Ras-Proteine vermittelten c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Aktivierungen.

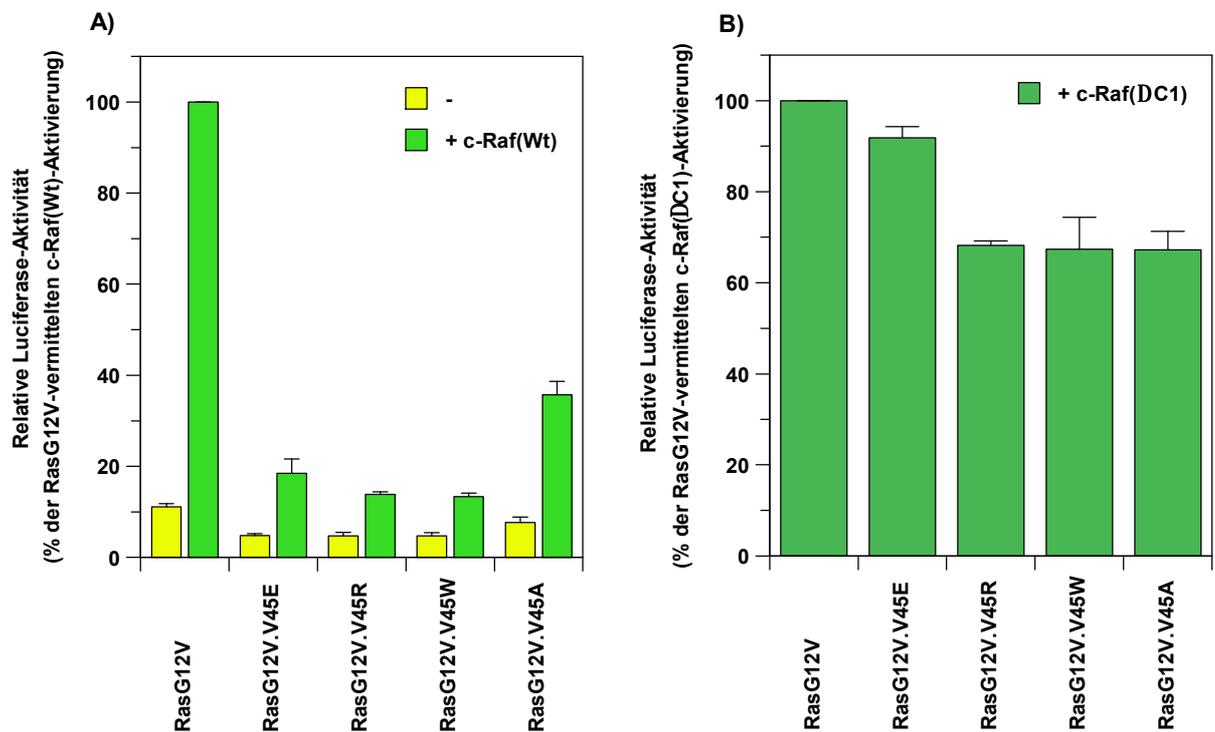


Abbildung 3.18 Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung verschiedener RasG12V.V45-Konstrukte im Reporterassay

RK13-Zellen wurden mit Plasmiden der verschiedenen RasG12V.V45-Mutanten transient transfiziert. In **A)** bzw. **B)** erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Die Substitution des Valin 45 in Ras durch die sterisch anspruchsvollen Aminosäuren Glutamat (V45E), Arginin (V45R) bzw. Tryptophan (V45W) führen ungeachtet der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Aminosäurereste zu einer drastischen Inhibition der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) auf 13 % bis 19 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung (**Abbildung 3.18 A**). Die Alanin-Mutation (V45A), welche eine relativ moderate Aminosäuresubstitution darstellt, führt zu einer weniger starken Inhibition und beträgt ca. 36 % der durch RasG12V induzierten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Sämtliche RasG12V.V45-Mutanten zeigen bei alleiniger Transfektion eine sehr niedrige basale Aktivierung von etwa 50 % bis 80 % der RasG12V-bedingten Basalaktivität. Die inhibierenden Effekte der verschiedenen RasG12V.V45-Mutanten sind bei Aktivierung von c-Raf(Δ C1) allgemein deutlich geringer (**Abbildung 3.18 B**). So vermittelt RasG12V.V45E verglichen mit RasG12V eine Transaktivierung durch c-Raf(Δ C1) von ca. 92 %. Die übrigen RasG12V.V45-Mutanten bewirken jeweils eine Transaktivierung von etwa 67 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Δ C1)-Aktivierung.

Es läßt sich feststellen, daß die Substitution des Valin 45 in Ras durch die ausgewählten Aminosäuren zu einer deutlichen Diskriminierung zwischen der Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) führen. Für die sterisch anspruchsvollen Aminosäurereste Glutamat, Arginin, und Tryptophan ist diesbezüglich ein Faktor von ca. 5 meßbar; für den gemäßigten Alanin-Austausch beträgt der Faktor knapp 2. Selbst unter Berücksichtigung der unter den Versuchsbedingungen zu beobachtenden Basalaktivität des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes von etwa 50 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Δ C1)-Aktivierung (vgl. **Abbildung 3.11**), würden sich für die Mutanten V45E und V45R bzw. V45W Faktoren von 4,5 bzw. 3 ergeben. Für die V45A-Mutante wäre hinsichtlich der Diskriminierung zwischen den beiden c-Raf-Konstrukten unter dieser Betrachtung kein signifikanter Unterschied mehr zu ermitteln.

Damit läßt sich zusammenfassend sagen, daß die beobachteten Inhibitionen hauptsächlich auf sterische Hinderung der eingeführten Aminosäurereste mit der C1-Domäne der Raf-Kinase zurückzuführen zu sein scheinen, wobei die Einführung einer negativen Ladung in der Position 45 eine signifikante Verstärkung des inhibierenden Effektes bewirkt. Die gezeigten Ergebnisse stützen Vermutungen, nach denen das Valin 45 an der Interaktion mit der Raf-Kinase und speziell deren C1-Domäne beteiligt ist.

Nachfolgend soll untersucht werden, ob der stark inhibierende Effekt der V45E-Substitution auch im Kontext der unter 3.1 charakterisierten artifiziellen Membraninsertion reproduziert

werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein QI-RasG12V.3S-Konstrukt mit der entsprechenden V45E-Mutation geschaffen (vgl. 2.2.5.9) und dieses dann analog zu den zuvor dargestellten Experimenten in Luciferase-Reportergen-Assays eingesetzt. Die **Abbildung 3.19** zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Luciferase-Aktivitäten für die durch die verschiedenen Ras-Proteine vermittelten c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Aktivierungen.

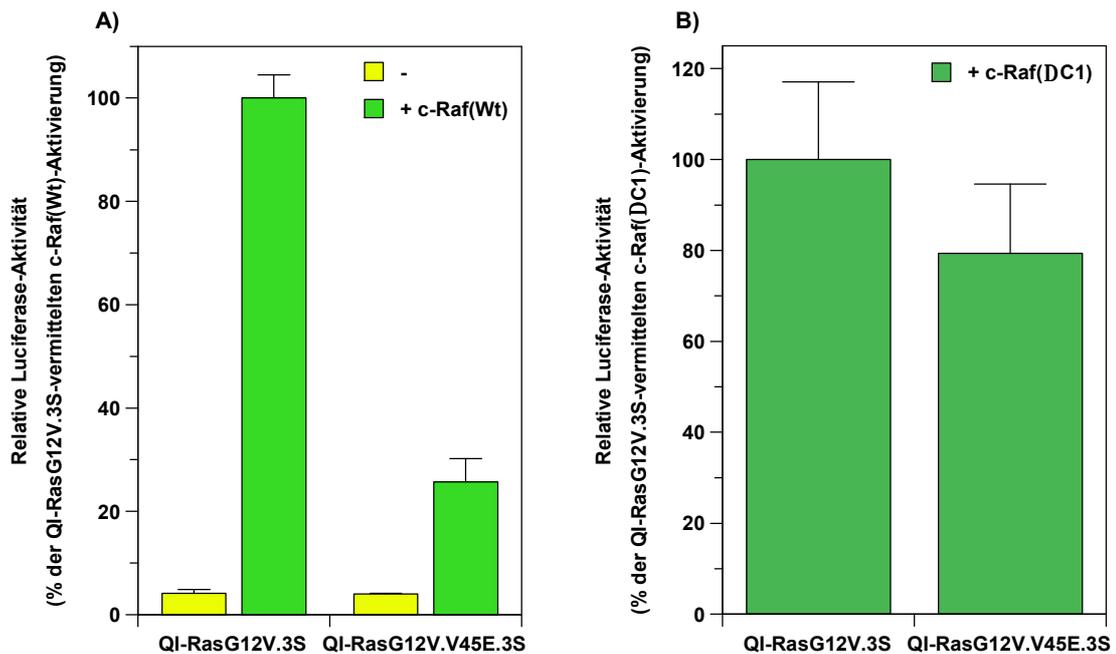


Abbildung 3.19 Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung von QI-RasG12V.3S und QI-RasG12V.V45E.3S im Luciferase-Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit dem QI-RasG12V.3S- bzw. dem QI-RasG12V.V45E.3S-Konstrukt transient transfiziert. In **A)** bzw. **B)** erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Die Stimulierung von c-Raf(Wt) durch das QI-RasG12V.V45E.3S-Konstrukt führt in Relation zu der Aktivierung durch QI-RasG12V.3S zu einer um 71 % geringeren relativen Luciferase-Aktivität von 26 % (**Abbildung 3.19 A**); damit ist die ermittelte Abnahme der Aktivität nahezu identisch mit der zuvor für RasG12V.V45E ermittelten von 74 % (**Abbildung 3.18 A**). Für c-Raf(Δ C1) ergeben sich hinsichtlich der Aktivierung durch die gleichen Ras-Proteine weniger deutliche Unterschiede. Im Vergleich zur Aktivierung durch QI-RasG12V.3S nimmt die relative Luciferase-Aktivität bei Stimulierung durch QI-RasG12V.V45E.3S nur um 21 % auf 79 % ab (**Abbildung 3.19 B**). Die Inhibition ist hier zwar größer als bei Verwendung von RasG12V.V45E, bei der die Abnahme etwa 8 % beträgt

(**Abbildung 3.18 B**), bei Einbeziehung der Fehlerabweichungen ist diese jedoch nicht signifikant.

Es läßt sich also festhalten, daß die Fähigkeit der RasG12V.V45E-Mutante zur Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) unabhängig von der Art ihrer Membraninsertion ist; anders ausgedrückt sind die im Normalfall vorliegenden C-terminalen Modifikationen des Ras-Proteins für die durch die V45E-Mutation hervorgerufene Inhibition nicht relevant.

3.2.2 Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V.V45-Konstrukte

Die im vorausgegangenen Abschnitt dargestellten Resultate zeigen, daß verschiedenen RasG12V.V45-Mutanten bezüglich der von ihnen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay vermittelten Aktivierung eine deutliche Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) zeigen. Hier stellt sich die Frage, ob die inhibierenden Effekte in der Aktivierung auch auf der Ebene der Bindung beobachtet werden können und so durch eine Reduzierung der Bindungsaffinität begründet sind. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Two-Hybrid-System in *S. cerevisiae* angewendet. Dazu wurden die RasG12V.V45-Konstrukte zunächst in den adäquaten Hefe-Vektor kloniert. Zur Reduzierung des experimentellen Aufwandes wurden aufgrund der Resultate des Luciferase-Reporter-Gen-Assays (vgl. 3.2.1.) für Aminosäure-Substitutionen durch sterisch anspruchsvolle Aminosäuren in den Two-Hybrid-Experimenten repräsentativ die Konstrukte RasG12V.V45E und RasG12V.V45R untersucht. Sämtliche Ras-Konstrukte kodieren für C-terminal um 23 Aminosäuren verkürzte Proteine, so daß die posttranslationalen Lipidmodifikationen unterbleiben. Dies ist für eine unabdingbare und effiziente Translokation der Ras-Proteine in den Zellkern der Hefe essentiell.

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit den verschiedenen verkürzten RasG12V-Plasmiden und jeweils einem der beiden c-Raf-Konstrukte transformiert und auf LTH⁻-Platten ausgestrichen. Nach ca. fünf Tagen Wachstum bei 30°C konnten auf allen Selektionsplatten zahlreiche Kolonien identifiziert werden, was zunächst qualitativ eine Interaktion der in den Hefen exprimierten Ras- und Raf-Proteine anzeigt. Zwecks Quantifizierung wurden jeweils vier Kolonien auf neuen LTH⁻-Platten replattiert und für etwa drei Tage bei 30°C inkubiert. Nach Aufschluß der jeweils gleichen Anzahl an Hefe-Zellen wurde die Aktivität

der in den Hefen exprimierten β -Galactosidase als Parameter der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ bestimmt. **Abbildung 3.20** zeigt die gemittelten Daten der vier unabhängigen Experimente.

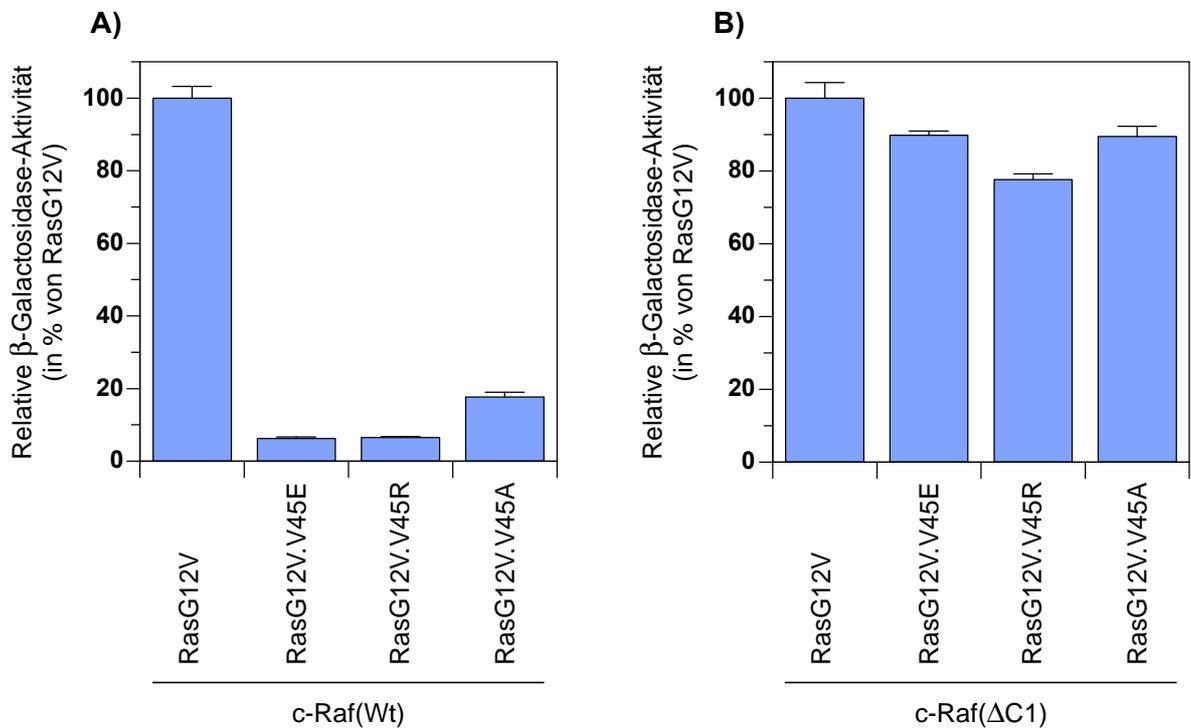


Abbildung 3.20 Semiquantitative Bestimmung der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V.V45-Konstrukte im Two-Hybrid-System

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit dem pPC97 RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Plasmid respektive mit Plasmiden der verschiedenen, ebenfalls verkürzten RasG12V.V45-Mutanten transformiert. In **A)** bzw. **B)** erfolgte eine zusätzliche Kotransformation des pPC86 c-Raf(Wt)- bzw. pPC86 c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Nach erfolgreichem Wachstum auf LTH⁻-Platten wurden gleiche Mengen an Hefe-Zellen aufgeschlossen und die β -Galactosidase-Aktivität als Maß der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ gemessen (vgl. 2.2.4.5.2). Die Daten zeigen den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten.

Die Substitution des Valin 45 in Ras durch die sterisch anspruchsvollen Aminosäuren Glutamat (V45E) bzw. Arginin (V45R) führt im Vergleich zu RasG12V zu einer drastischen Reduzierung der β -Galactosidase-Aktivität und damit Bindung von c-Raf(Wt) auf ca. 6 % (**Abbildung 3.20 A**). Eine relativ moderate Aminosäuresubstitution in dieser Position zu Alanin (V45A) bewirkt eine weniger starke Abnahme der Ras/Raf-Bindung auf etwa 18 %. Der Effekt der verschiedenen RasG12V.V45-Konstrukte auf die Interaktion mit c-Raf(Δ C1) ist allgemein deutlich geringer (**Abbildung 3.20 B**). So wird die β -Galactosidase-Aktivität durch RasG12V.V45E und RasG12V.V45A bzw. RasG12V.V45R auf lediglich ca. 90 % bzw. 78 % der RasG12V-vermittelten Aktivität reduziert.

Es kann festgestellt werden, daß die Substitution des Valin 45 in Ras durch die ausgewählten Aminosäuren zu einer deutlichen Diskriminierung hinsichtlich der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) führen. Für die sterisch anspruchsvollen Aminosäurereste Glutamat und Arginin ist diesbezüglich ein Faktor von 15 bzw. 13 meßbar; für den gemäßigten Alanin-Austausch beträgt der Faktor etwa 5. Die verminderte Interaktion der untersuchten Ras-Mutanten mit c-Raf(Wt) scheint hauptsächlich auf sterische Hinderung der entsprechenden Aminosäurereste mit der C1-Domäne der Raf-Kinase zurückzuführen zu sein. Bei einer Interaktion von Valin 45 mit Aminosäuren außerhalb der C1-Domäne der Raf-Kinase sollte ansonsten auch bei Verwendung des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes eine stark verminderte Bindung mit den mutierten RasG12V-Proteinen zu detektieren sein. Die dargestellten Resultate zeigen starke Parallelen zu den bereits ermittelten Aktivierungsdaten (vgl. 3.2.1) und stützen zusätzlich die Vermutung, nach der das Valin 45 an der Interaktion mit der Raf-Kinase und speziell mit deren C1-Domäne beteiligt ist. Aufgrund der bisherigen Resultate kann ein Arbeitshypothese postuliert werden, nach der Veränderungen in der Position 45 zu einem partiellen Verlust der Ras/Raf-Interaktion und infolgedessen zu einer Inhibition der Ras-vermittelten Raf-Aktivierung führen. Die abgeleitete Arbeitshypothese ist in **Abbildung 3.21** graphisch dargestellt.

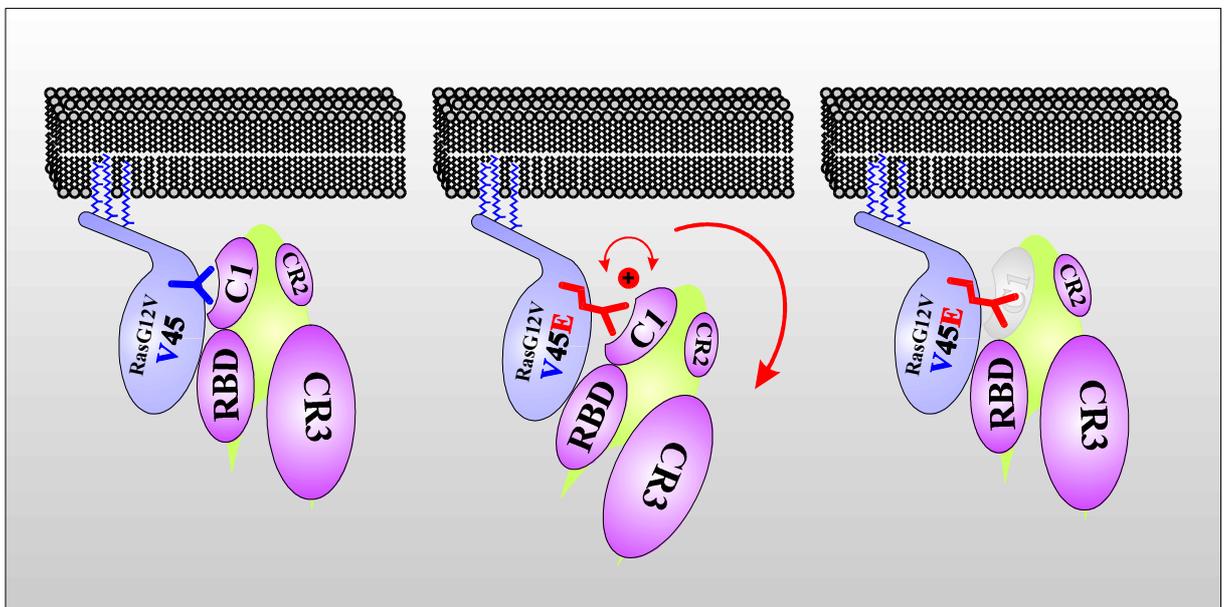


Abbildung 3.21 Schematische Darstellung der Arbeitshypothese

Links: reguläre Interaktion zwischen RasG12V und c-Raf(Wt). Mitte: Substitution des Valin 45 durch einen sterisch anspruchsvollen, negativ geladenen Glutamatrest bewirkt aufgrund sterischer Hinderung mit der c-Raf C1-Domäne einen partiellen Verlust der Ras/Raf-Interaktion und infolgedessen eine Inhibition der Ras-vermittelten Raf-Aktivierung. Rechts: bei Deletion der c-Raf C1-Domäne wirkt sich der sterische Effekt des Glutamat 45 kaum auf die Ras/Raf-Bindung aus. Daher ist auch die Ras-induzierte Aktivierung des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes kaum beeinträchtigt.

3.2.3 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) durch verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region

In den vorausgegangenen beiden Abschnitten konnte gezeigt werden, daß Aminosäure-Substitutionen in der Position 45 von H-Ras zu einer Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) sowohl hinsichtlich der Aktivierung als auch der Bindung führen. In diesem Abschnitt der Arbeit soll untersucht werden, ob weitere Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region von H-Ras, C- und N-terminal von Valin 45 einen vergleichbaren Effekt im Sinne der in **Abbildung 3.21** dargestellten Arbeitshypothese zeigen. Dazu wurden einige oberflächenexponierte Aminosäuren der Aktivierungs-Region ausgewählt (Q43, D47, E49, T50 und L52) und die jeweilige Aminosäure zu Arginin und Tryptophan mutiert. Auch ein Konstrukt mit einer Substitution des Tyrosin 64 zu Tryptophan wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, da in der Literatur eine Interaktion dieses Tyrosins mit der c-Raf C1-Domäne diskutiert wird (Moodie 1995; Drugan 1996). **Abbildung 3.22** zeigt die ausgewählten Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur des H-Ras-Protein.

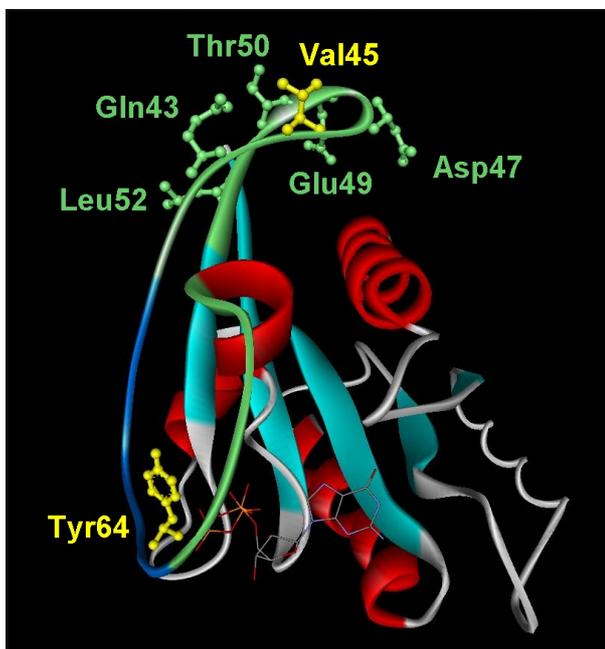


Abbildung 3.22

Lokalisation verschiedener Aminosäuren der Aktivierungs-Region sowie des Tyrosins 64 in der dreidimensionalen Struktur von H-Ras₍₁₋₁₆₆₎

Die für die Effektor-Interaktion essentielle Effektor-Region ist dunkelblau hervorgehoben. Die angrenzenden Bereiche der Aktivierungs-Region sind grün markiert. Die diskutierten Aminosäuren Gln43, Asp47, Glu49, Thr50, Leu52 sind grün, das außerhalb der Aktivierungs-Region lokalisierte Tyr64 ist gelb dargestellt. Als Orientierungshilfe ist das Valin 45 (Val45) ebenfalls gelb markiert. Das gebundene GTP ist als Stabmodell wiedergegeben. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt (verändert nach Schlichting *et al.* 1990).

Für die Untersuchungen wurden RK13-Zellen mit den verschiedenen mutierten RasG12V-Konstrukten separat transfiziert. Dabei erfolgte in jeweils einem Drittel der Ansätze durch Kotransfektion der entsprechenden Plasmide eine zusätzliche Expression des c-Raf(Wt)- bzw.

c-Raf(Δ C1)-Proteins. Die Lysate der geernteten und aufgeschlossenen Zellen wurden in einem Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt und die Luciferase-Aktivitäten bestimmt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.23** zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten erhaltenen und gemittelten Daten für die durch die verschiedenen Ras-Proteine vermittelten c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Aktivierungen.

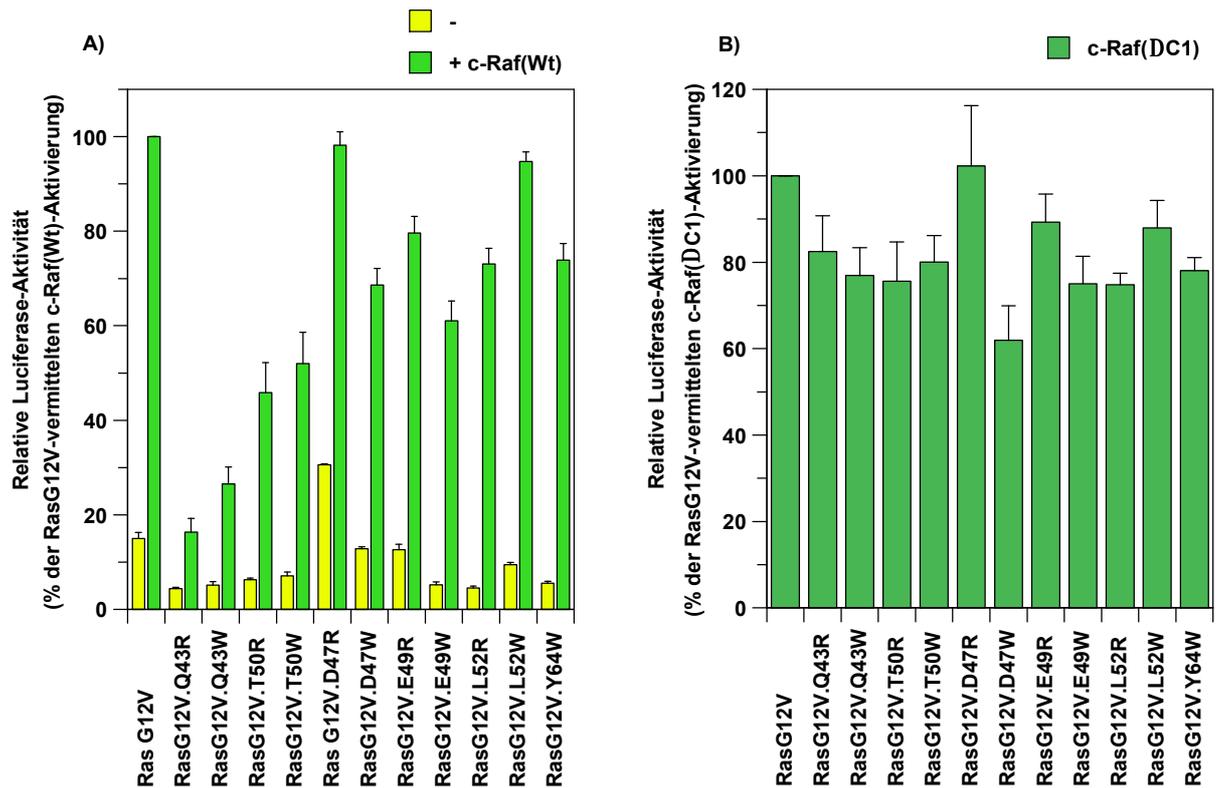


Abbildung 3.23 Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(DC1) unter Vermittlung verschiedener RasG12V-Konstrukte mit Mutationen in der Aktivierungs-Region im Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit Plasmiden der verschiedenen RasG12V-Mutanten transient transfiziert. In **A)** bzw. **B)** erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Der Vergleich der in den beiden Teilabbildungen gezeigten Daten lässt abhängig vom Grade der Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) eine Unterteilung der untersuchten Ras-Mutanten in drei Gruppen zu. Zur ersten Gruppe gehören die Aminosäure-Substitutionen in Position 43 (Q43R und Q43W), welche eine starke Inhibition der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) auf 16 % bzw. 27 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung bewirken. Im Vergleich dazu zeigen die gleichen Ras-Konstrukte bei Koexpression von c-Raf(Δ C1) eine deutlich geringere Inhibition. Diese beträgt ca. 82 % bzw. 77 % der RasG12V-induzierten

c-Raf(Δ C1)-Aktivierung und ist damit um das fünf- bzw. dreifache niedriger. Die zweite Gruppe von Aminosäure-Substitutionen zeigt lediglich moderate Effekte in bezug auf die Diskriminierung zwischen den beiden Raf-Konstrukten. Hierzu zählen die Arginin- und Tryptophan-Austausche in Position 50 von Ras (T50R und T50W). Diese Ras-Mutanten führen zu einer Reduktion auf durchschnittlich etwa 49 % der RasG12V-vermittelten c-Raf(Wt)-Aktivierung. Der inhibierende Effekt dieser Ras-Mutanten auf die c-Raf(Δ C1)-Aktivierung ist mit durchschnittlich 80 % der RasG12V-induzierten Aktivierung deutlich geringer. Daraus ergibt sich für die T50-Mutanten hinsichtlich der Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) ein Faktor von ca. 1,6. Die übrigen analysierten Ras-Konstrukte gehören zu der dritten Gruppe und zeigen hinsichtlich der Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) keine signifikanten Unterschiede. Exemplarisch sei hier das Resultat für die RasG12V.L52R-Mutante erläutert. Der Austausch von Leucin zu Arginin in der Position 52 führt, unabhängig welches der beiden Raf-Konstrukte koexprimiert wurde, zu einer Reduktion auf ca. 74 % der jeweiligen RasG12V-vermittelten Aktivierung. Vergleichbare Werte wurden auch für das RasG12V.Y64W-Konstrukt ermittelt. Dies ist insofern interessant, als daß diese Ergebnisse die in der Literatur diskutierte Interaktion des Tyrosin 64 mit der c-Raf C1-Domäne nicht stützen. Andererseits ist dieses Resultat nicht überraschend, da das Tyrosin 64 weit außerhalb der Aktivierungs-Region lokalisiert ist und damit eine deutliche Distanz zur Position 45 aufweist, für die ein deutlicher Effekt auf die C1-Domäne der Raf-Kinase gezeigt werden konnte (vgl. 3.2.1). Das RasG12V.D47R-Konstrukt führt interessanterweise als einziges der analysierten Ras-Mutanten zu einer signifikanten Erhöhung der Basalaktivität, die mit ca. 30 % der RasG12V-vermittelten Raf(Wt)-Aktivierung etwa das Doppelte der RasG12V-bedingten Basalaktivität beträgt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß auch Aminosäuren-Substitutionen in den Positionen 43 und 50 eine, im Vergleich zur Position 45 zwar graduell geringere, aber dennoch signifikante Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) zeigen. Damit wären Glutamin 43 und Threonin 50, neben dem bereits untersuchten Valin 45, zwei weitere potentielle mit der c-Raf C1-Domäne interagierende Aminosäuren, die ein funktionelles Ras-Epitop definieren könnten. Dies wäre auch aus strukturellen Überlegungen heraus plausibel, da die drei Aminosäuren Q43, V45 und T50 eine ähnliche räumliche Orientierung aufweisen, die sich von der Ausrichtung der übrigen untersuchten Aminosäuren deutlich unterscheidet (vgl. **Abbildung 3.22**).

3.2.4 Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region

Die im vorausgegangenen Abschnitt dargestellten Resultate zeigen, daß die RasG12V-Konstrukte mit den Mutationen Q43R, Q43W, T50R und T50W bezüglich der von ihnen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay vermittelten Aktivierung eine deutliche Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) zeigen. Für die übrigen untersuchten RasG12V-Mutanten mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region und für das RasG12V.Y64W-Konstrukt konnte ein solcher Effekt nicht festgestellt werden. Im folgenden wäre zu zeigen, ob dieser Diskriminierungs-Effekt auch auf der Ebene der Bindung beobachtet werden kann. Eine Korrelation der Aktivierungs- und Bindungsdaten würde darauf hinweisen, daß eine Reduzierung der Bindungsaffinität eine Inhibition der Aktivierung bewirkt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde analog zur Analyse der RasG12V.V45-Konstrukte (vgl. 3.2.2) das Two-Hybrid-System in *S. cerevisiae* angewendet. Dazu wurden die in 3.2.3 verwendeten RasG12V-Konstrukte zunächst in den adäquaten Hefe-Vektor kloniert. Da sowohl Arginin- als auch Tryptophan-Substitutionen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay zu einer vergleichbar starken Inhibitionen führen (vgl. 3.2.3), wurden im folgenden zwecks Minimierung des experimentellen Aufwandes nur Konstrukte mit Arginin-Substitutionen untersucht. Sämtliche Ras-Konstrukte kodieren für C-terminal um 23 Aminosäuren verkürzte Proteine, so daß die posttranslationalen Lipidmodifikationen unterbleiben. Dies ist für eine unabdingbare und effiziente Translokation der Ras-Proteine in den Zellkern der Hefe essentiell.

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit den verschiedenen verkürzten RasG12V-Plasmiden und jeweils einem der beiden c-Raf-Konstrukte transformiert und auf LTH⁻-Platten ausgestrichen. Auf allen Selektionsplatten konnten nach einigen Tagen Wachstum zahlreiche Kolonien identifiziert werden, was zunächst qualitativ eine Interaktion der in den Hefen exprimierten Ras- und Raf-Proteine anzeigt. Zwecks Quantifizierung wurden nach Replattierung von jeweils vier Kolonien auf neue LTH⁻-Platten und adäquatem Wachstum jeweils die gleiche Anzahl an Hefe-Zellen aufgeschlossen und die Aktivität der in den Hefen exprimierten β -Galactosidase als Parameter der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ bestimmt. **Abbildung 3.24** zeigt die gemittelten Daten der vier unabhängigen Experimente.

Die Substitution des Glutamin 43 durch Arginin bewirkt verglichen mit RasG12V eine drastische Reduzierung der β -Galactosidase-Aktivität und damit Bindung von c-Raf(Wt) auf

ca. 3 % (**Abbildung 3.24 A**). Die Abnahme der Bindung dieses Konstruktes an c-Raf(Δ C1) ist wesentlich geringer und beträgt im Vergleich zu RasG12V 62 % (**Abbildung 3.24 B**). Damit zeigt diese Ras-Mutante eine deutliche Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) mit deletierter C1-Domäne etwa um den Faktor 20. Das RasG12V.T50R-Protein zeigt ebenfalls eine signifikante, wenn auch weniger starke Diskriminierung hinsichtlich der Bindung der beiden unterschiedlichen c-Raf-Konstrukte. In diesem Fall beträgt die Bindung zu c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(Δ C1), jeweils in Relation zur Bindung von RasG12V, 33 % bzw. 69 %. Damit ergibt sich ein Unterschied um den Faktor 2. Ein vergleichbarer Faktor läßt sich auch für das RasG12V.D47R-Konstrukt ermitteln. Die c-Raf(Wt)-Bindung ist auf 51 %, die c-Raf(Δ C1)-Bindung auf 86 % gegenüber RasG12V reduziert. Für die übrigen Konstrukte werden, unabhängig vom exprimierten Raf-Protein vergleichbare Werte erhalten, so daß für eine Aminosäure-Substitution in den Positionen 49, 52 und 64 keine signifikante Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) festgestellt werden kann.

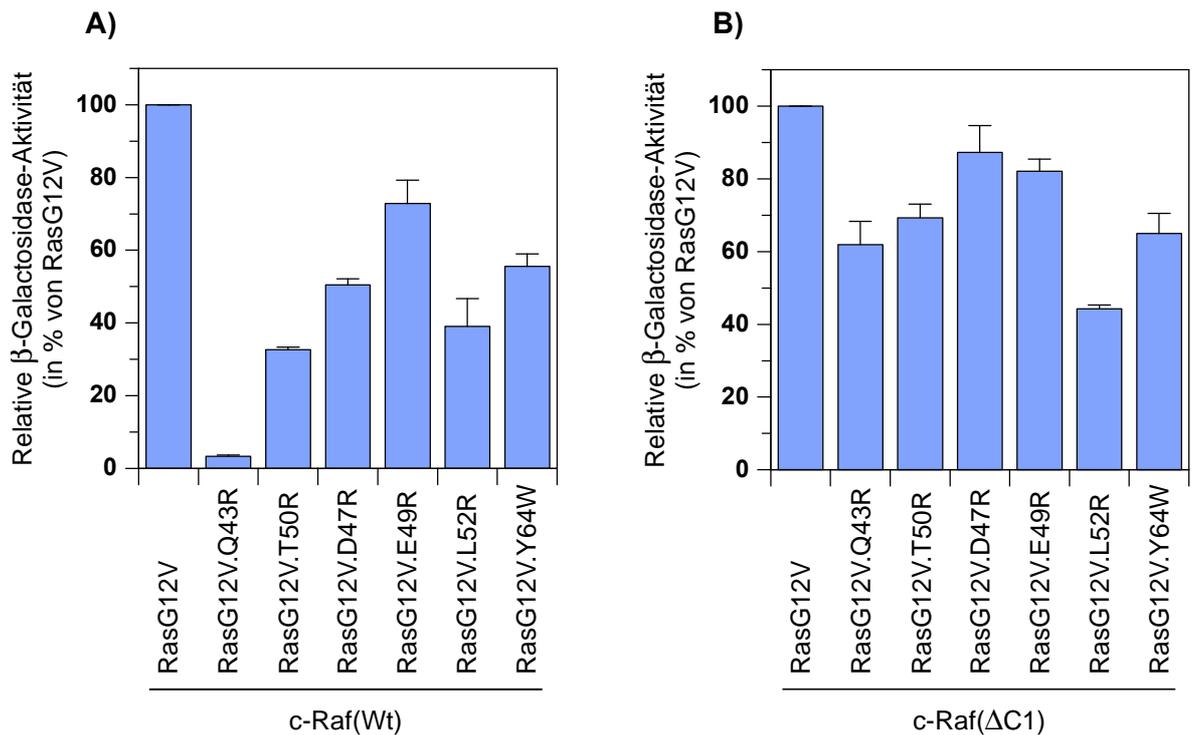


Abbildung 3.24 **Semiquantitative Bestimmung der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Aminosäure-Substitutionen in der Aktivierungs-Region im Two-Hybrid-System**

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit dem pPC97 RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Plasmid respektive mit Plasmiden der verschiedenen, ebenfalls verkürzten RasG12V-Mutanten transformiert. In **A**) bzw. **B**) erfolgte eine zusätzliche Kotransformation des pPC86 c-Raf(Wt)- bzw. pPC86 c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Nach erfolgreichem Wachstum auf LTH⁻-Platten wurden gleiche Mengen an Hefe-Zellen aufgeschlossen und die β -Galactosidase-Aktivität als Maß der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ gemessen (vgl. 2.2.4.5.2). Die Daten zeigen den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten.

Es läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die im Two-Hybrid-System ermittelten Resultate weitestgehend mit den Aktivierungsdaten des Luciferase-Reporter-Gen-Assays übereinstimmen (vgl. **Abbildung 3.23**), d.h. Aminosäure-Substitution in den Positionen 43, 45 und 50 führen zu einer deutlich reduzierten Bindung und Aktivierung von c-Raf(Wt), aber zu einer wesentlich weniger stark reduzierten Bindung und Aktivierung von c-Raf(Δ C1). Damit könnten diese drei Aminosäuren ein potentielles, mit der C1-Domäne der Raf-Kinase interagierendes Ras-Epitop definieren. Eine Ausnahme von der weitreichenden Übereinstimmung zwischen Bindungs- und Aktivierungsdaten bildet die Arginin-Substitution in Position 47 (D47R). Dieses Konstrukt zeigt eine deutliche Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) hinsichtlich der Aktivierung, aber nicht in bezug auf die Bindung (vgl. **Abbildung 3.23** und **Abbildung 3.24**). Nachfolgend werden jedoch ausschließlich Konstrukte analysiert, die in Hinsicht auf beide Kriterien wesentliche Parallelen aufweisen.

3.2.5 Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) durch verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Substitutionen in den Positionen 43, 45 und 50

In den beiden vorausgegangenen Abschnitten konnten durch Untersuchungen diverser RasG12V-Konstrukte mit Arginin- bzw. Tryptophan-Mutationen im Bereich der Aktivierungs-Region von H-Ras die Aminosäuren Q43, V45 und T50 als wichtige potentielle Interaktionspartner für eine Wechselwirkung von H-Ras mit der c-Raf C1-Domäne identifiziert werden. In diesem Teil der Arbeit soll analysiert werden, inwieweit die für diese drei Aminosäuren gezeigten Effekte im Falle einer moderateren Alanin-Substitution reproduziert werden können. Zu diesem Zweck wurden RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Mutationen in der Position 43 bzw. 50 konzipiert. Um die Effekte aller drei Aminosäuren im Gesamtkontext analysieren zu können, wurde zusätzlich die Alanin-Dreifachmutante RasG12V.Q43/V45/T50A erstellt. RK13-Zellen wurden mit den verschiedenen RasG12V-Alanin-Mutanten separat und in Kombination mit dem c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Δ C1)-Konstrukt transient transfiziert. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zell-Lysate in einem Luciferase-Reporter-Gen-Assay eingesetzt (vgl. 2.2.5.7). **Abbildung 3.25** zeigt die gemittelten Daten von drei unabhängigen Experimenten. Die RasG12V.Q43A-Mutante bewirkt eine im Vergleich zu RasG12V relativ mäßige Reduzierung der c-Raf(Wt)-Aktivierung auf 87 %. Die Aktivierung des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes durch dieselbe Ras-Mutante ist hingegen

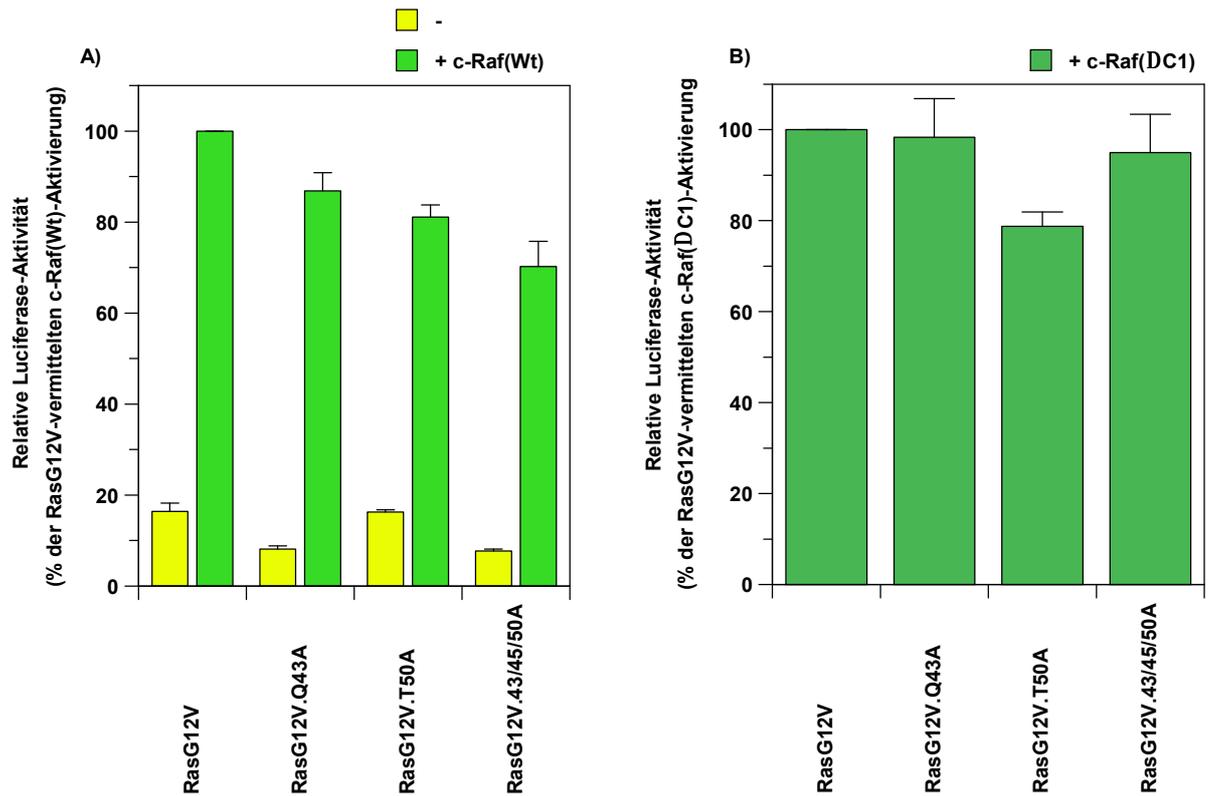


Abbildung 3.25 Vergleich der Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(Delta C1) unter Vermittlung verschiedener RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Mutationen in den Positionen 43, 45 und 50 im Reportergen-Assay

RK13-Zellen wurden mit Plasmiden der verschiedenen RasG12V-Mutanten transient transfiziert. In **A)** bzw. **B)** erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion des c-Raf(Wt)- bzw. c-Raf(Delta C1)-Konstruktes. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

kaum verringert und beträgt 98 % der RasG12V-induzierten Aktivität. Damit führt ein Alanin-Austausch in der Position 43 zu einer nur sehr schwachen Diskriminierung zwischen den beiden c-Raf-Konstrukten. Für die RasG12V.T50A-Mutante ist kein Unterschied in bezug auf die Aktivierung von c-Raf(Wt)- und c-Raf(Delta C1) detektierbar. Unabhängig von dem jeweils koexprimierten Raf-Protein kann eine Reduktion der Transaktivierung auf durchschnittlich 80 % ermittelt werden. Der inhibierende Effekt der Q43-Mutante auf die Aktivierung von c-Raf(Wt) ist auch bei einer Alanin-Substitution etwas stärker als der der entsprechenden T50-Mutante. Dies konnte auch schon für die entsprechenden Arginin- und Tryptophan-Mutanten beobachtet werden (vgl. **Abbildung 3.23 A**). Die Alanin-Dreifachmutante RasG12V.Q43/V45/T50A führt zu einer Reduzierung auf 70 % der durch RasG12V induzierten c-Raf(Wt)-Aktivierung und ist damit etwas stärker als die Inhibition durch die beiden Alanin-Einzelmutanten. Unter Berücksichtigung der durch das RasG12V.V45A-Konstrukt bewirkten Inhibition auf 36 % (vgl. **Abbildung 3.18 A**) muß festgestellt werden,

daß sich die Effekte der drei einzelnen Alanin-Mutanten nicht additiv verhalten. Dennoch führt die Kombination der drei Mutanten bei Koexpression von c-Raf(Δ C1) zu einer im Vergleich zu RasG12V nur minimalen Reduzierung der Aktivierung auf 95 %. Somit zeigt auch das RasG12V.Q43/V45/T50A-Konstrukt eine Diskriminierung zwischen c-Raf(Wt)- und c-Raf(Δ C1). Insgesamt läßt sich feststellen, daß die moderateren Alanin-Mutationen generell auch zu gemäßigten Effekten auf die Aktivierung führen. Es ist zu vermuten, daß hinsichtlich des Nachweises schwacher Effekte die Grenze der Sensitivität dieser Methode erreicht ist.

3.2.6 Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Substitutionen in den Positionen 43, 45 und 50

In diesem Teil der Arbeit sollen die im vorherigen Abschnitt hinsichtlich der Aktivierung von c-Raf(Wt)- und c-Raf(Δ C1) analysierten Ras-Mutanten im Two-Hybrid-System auf ihre Fähigkeit zur Bindung der beiden Raf-Konstrukte untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden RasG12V-Konstrukte zunächst in die entsprechenden Hefe-Vektoren umklont, wobei diese für C-terminal um 23 Aminosäuren verkürzte Proteine kodieren um die posttranslationalen Modifikationen zu unterbinden. Dies ist notwendig um eine Lokalisation der Proteine an der Plasmamembran zu verhindern und eine effiziente Translokation der Ras-Proteine in den Zellkern der Hefe zu gewährleisten.

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit den verschiedenen verkürzten RasG12V-Plasmiden und jeweils einem der beiden c-Raf-Konstrukte transformiert und auf LTH⁻-Platten ausgestrichen. Daß nach wenigen Tagen zu beobachtende Wachstum zahlreicher Kolonien auf sämtlichen Selektionsplatten zeigte zunächst die qualitative Interaktion der in den Hefen exprimierten Ras- und Raf-Proteine an. Für eine Quantifizierung wurden nach Replattierung von jeweils vier Kolonien auf neue LTH⁻-Platten und entsprechendem Wachstum jeweils die gleiche Anzahl an Hefe-Zellen aufgeschlossen und die Aktivität der in den Hefen exprimierten β -Galactosidase als Parameter der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ bestimmt. **Abbildung 3.26** zeigt die gemittelten Daten der vier unabhängigen Experimente. Die gemessenen β -Galactosidase-Aktivitäten zeigen, daß RasG12V.Q43A mit gleicher Stärke an c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(Δ C1) bindet. In beiden Fällen kann im Vergleich zu RasG12V eine

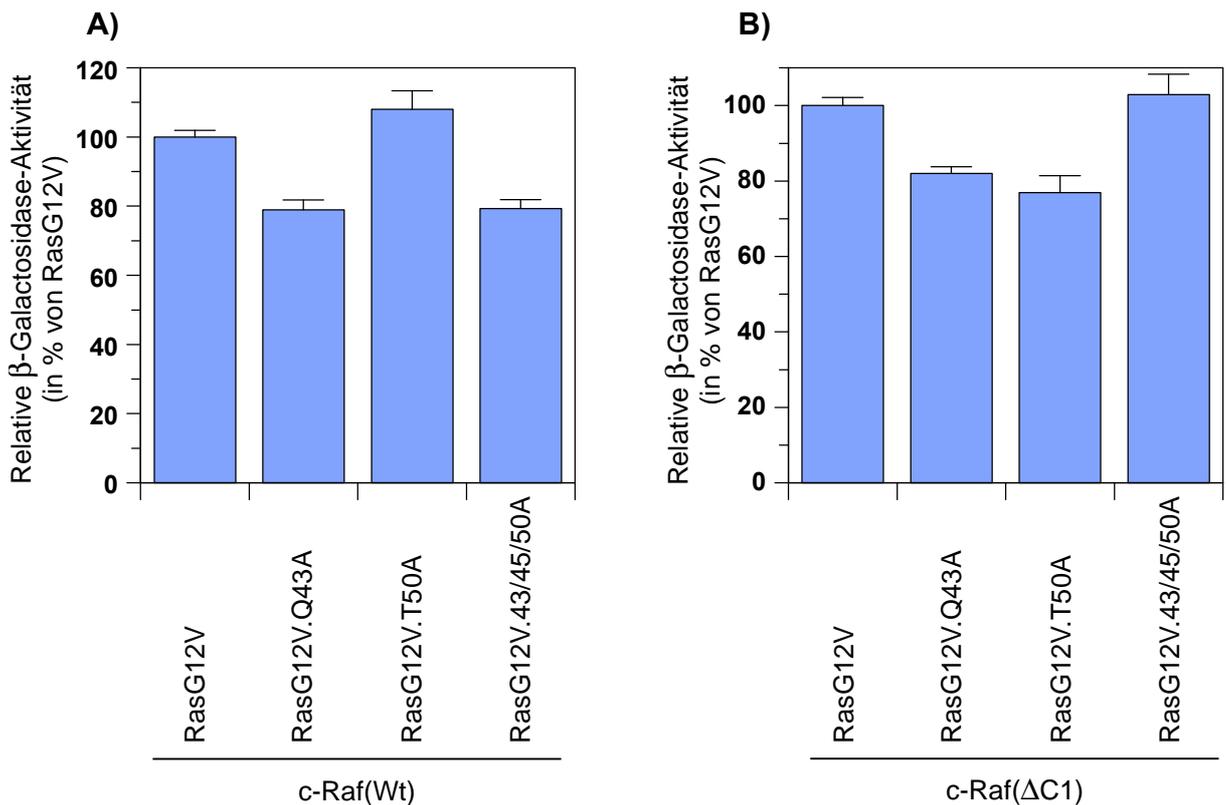


Abbildung 3.26 Semiquantitative Bestimmung der Bindung von c-Raf(Wt) und c-Raf(DC1) an verschiedene RasG12V-Konstrukte mit Alanin-Mutationen in den Positionen 43, 45 und 50 im Two-Hybrid-System

S. cerevisiae-Zellen des Stammes Y190 wurden mit dem pPC97 RasG12V₍₁₋₁₆₆₎-Plasmid respektive mit Plasmiden der verschiedenen, ebenfalls verkürzten RasG12V-Mutanten transformiert. In **A**) bzw. **B**) erfolgte eine zusätzliche Kotransformation des pPC86 c-Raf(Wt)- bzw. pPC86 c-Raf(Δ C1)-Konstruktes. Nach erfolgreichem Wachstum auf LTH⁻-Platten wurden gleiche Mengen an Hefe-Zellen aufgeschlossen und die β -Galactosidase-Aktivität als Maß der Ras/Raf-Interaktion semiquantitativ gemessen (vgl.2.2.4.5.2). Die Daten zeigen den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten.

Reduktion der Bindung auf etwa 80 % ermittelt werden. Im Gegensatz zu der untersuchten Arginin-Mutante kann also bei einer Alanin-Substitution in der Position 43 keine Diskriminierung zwischen den verschiedenen c-Raf-Konstrukten festgestellt werden. RasG12V.T50A zeigt mit 108 % bzw. 77 % der entsprechenden Bindung an RasG12V entgegen den Erwartungen eine stärkere Interaktion mit c-Raf(Wt) als mit c-Raf(Δ C1). Möglicherweise bewirkt eine Substitution des Threonin 50 durch Alanin im Ras-Protein sekundäre strukturelle Konformationsänderungen und beeinflusst dadurch in irgendeiner Weise die Wechselwirkung mit den beiden Raf-Konstrukten. Die Alanin-Dreifachmutante RasG12V.Q43/V45/T50A führt, jeweils bezogen auf die Bindung von RasG12V, zu einer Bindung zu c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(Δ C1) von 79 % bzw. 103 % und zeigt damit eine signifikante Diskriminierung zwischen den beiden c-Raf-Konstrukten, was mit den Resultaten des

Luciferase-Reportergen-Assays gut korreliert. Wie bereits bei den Aktivierungs-Experimenten, zeigt die Dreifachmutante auch auf der Ebene der Bindung keinen additiven Effekt der jeweiligen Alanin-Einzelmutanten. Wie schon für den Luciferase-Reportergen-Assay, so muß auch für das Two-Hybrid-System angenommen werden, daß hinsichtlich des Nachweises schwacher Effekte die Grenze der Sensitivität dieser Methode erreicht ist.

Summa summarum kann aus den bisherigen Resultaten geschlossen werden, daß Aminosäure-Substitutionen in den Positionen 43, 45 und 50 von H-Ras, speziell zu sterisch anspruchsvollen Aminosäureresten wie Arginin und Tryptophan, sowohl in den Aktivierungs- als auch in den Bindungsstudien eine deutliche Diskriminierung zwischen dem c-Raf(Wt)- und dem c-Raf(Δ C1)-Konstrukt zeigen. Damit konnte durch diese drei Aminosäurereste, neben der Effektor-Region von Ras, ein zweites potentiell Raf-Bindungsepitop identifiziert werden, daß jedoch mit der C1-Domäne der Raf-Kinase wechselwirkt.

3.2.7 Untersuchung der potentiellen Interaktion des identifizierten Ras-Epitops mit einem funktionellem Epitop der c-Raf C1-Domäne

Nachdem in den vorangegangenen Teilen dieser Arbeit ein putatives Raf-Bindungsepitop in H-Ras, bestehend aus den Aminosäuren Q43, V45 und T50, identifiziert werden konnte, soll nachfolgend der Versuch unternommen werden, diesem ein interagierendes Epitop auf seiten der Raf-Kinase zuzuordnen. Ein potentieller, interagierender Bereich könnte das von Daub *et al.* charakterisierte funktionelle Epitop, bestehend aus den Aminosäuren S177, T182 und M183 der c-Raf C1-Domäne, darstellen (vgl. **Abbildung 3.6**). Dazu soll das c-Raf 177/182/183A- und das RasG12V.43/45/50A-Konstrukt in einem Luciferase-Reportergen-Assay analysiert werden. Um die auftretenden Effekte dieser Konstrukte und deren Effekte aufeinander besser einordnen und bewerten zu können, sollen in diesem Kontext ein weiteres Ras-Konstrukt mit Mutation in der Effektor-Region (RasG12V.E37G) und diverse Raf-Konstrukte mit Mutationen in der Raf RBD eingesetzt werden. Somit stehen sowohl für Ras als auch für Raf Konstrukte mit Mutationen in jeweils zwei distinkten, funktionellen Bereichen zur Verfügung. Auf der Seite von Ras sind dies die Konstrukte RasG12V.E37G bzw. RasG12V.43/45/50A mit Mutationen in der Effektor- bzw. Aktivierungs-Region. Auf der Seite der Raf-Kinase sind dies verschiedene RBD-Einzelmutanten (R59A, R67A, Q66A und T68A) bzw. Konstrukte mit Veränderungen der

C1-Domäne (c-Raf(Δ C1) bzw. c-Raf 177/182/183A). Durch Kombination der verschiedenen Ras- und Raf-Konstrukte untereinander soll in einer Art „Kreuzexperiment“ die Hypothese einer potentiellen Interaktion des identifizierten Raf-Bindungsepitops mit dem von Daub *et al.* beschriebenen Ras-Bindungsepitop der C1-Domäne überprüft werden. Die Einbeziehung von bereits sowohl durch Strukturaufklärung als auch durch zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Experimente untersuchten Interaktionen soll dabei als Vergleich dienen (Block *et al.* 1996; Jaitner *et al.* 1997; Nassar *et al.* 1995; Nassar *et al.* 1996). Die verschiedenen nachfolgend verwendeten Ras- und Raf-Mutanten und deren Wechselwirkungen sind vereinfachend in der **Abbildung 3.27** graphisch dargestellt. Die **Tabelle 3.1** gibt Aufschluß über die bei den durchzuführenden Experimenten zu erwartenden Resultate, die nachfolgend kurz erläutert werden. Die Mutation E37G in Ras sollte aufgrund der Aufhebung der Interaktion mit

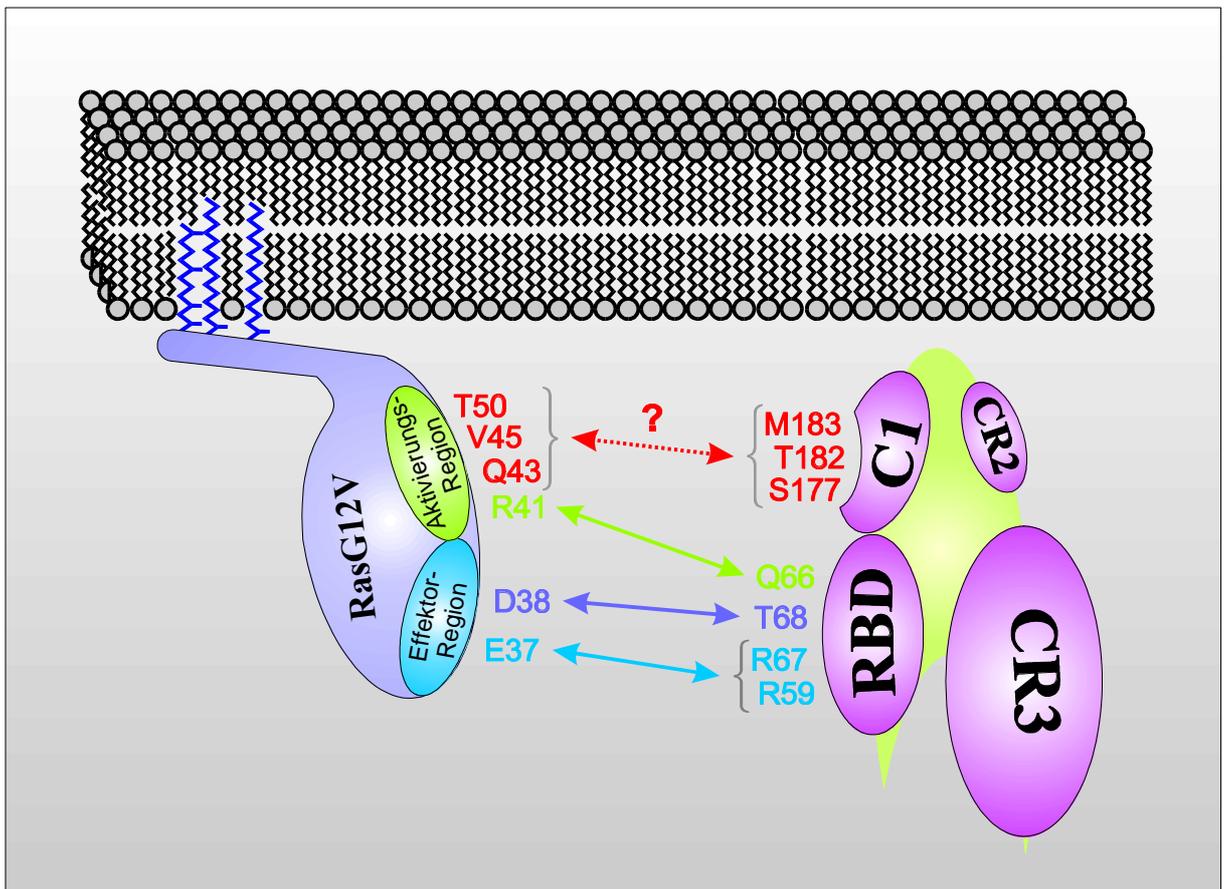


Abbildung 3.27 Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen verschiedenen funktionellen Bereichen von H-Ras und c-Raf

Dargestellt sind die verschiedenen für die nachfolgenden Experimente ausgewählten Aminosäuren in Ras- bzw. Raf und deren Zuordnung zu distinkten funktionellen Bereichen innerhalb des entsprechenden Proteins. Charakterisierte Interaktionen sind blau und grün hervorgehoben. Die fragliche Wechselwirkung zwischen der Aktivierungs-Region von Ras und der c-Raf C1-Domäne ist rot markiert. Die Abbildung gibt die komplexe Interaktion zwischen der Raf RBD und Ras nur unvollständig wieder und bezieht sich nur auf die in diesem Zusammenhang relevanten Aminosäuren.

den Aminosäuren R67 und R59 der Raf RBD zu einer Reduzierung der c-Raf(Wt)-Aktivierung führen. Aus den gleichen Gründen sollte umgekehrt auch eine Mutation der Aminosäuren R67 bzw. R59 der Raf RBD eine entsprechende Inhibition bewirken. Bei Kombination einer der beiden RBD-Mutanten mit der RasG12V.E37G-Mutante sollte es zu keiner weiteren Reduzierung der Aktivierung kommen, da es sich hierbei um korrespondierende Aminosäuren handelt, die beide dieselbe Interaktion betreffen. Dagegen sollte die Kombination dieser Raf-Konstrukte mit der RasG12V.43/45/50A-Mutante zu einer weitergehenden Reduzierung der Aktivierung führen, da nun simultan zwei verschiedene Wechselwirkungen aufgehoben werden. Aus analogen Überlegungen heraus sollte sich der inhibierende Effekt der Raf RBD-Mutante Q66A bzw. T68A sowohl bei Koexpression von RasG12V.E37G als auch von RasG12V.43/45/50A verstärken. Aufgrund dieser Überlegungen wäre hinsichtlich einer Interaktion von RasG12V.43/45/50A und c-Raf 177/182/183A eine Inhibition durch die jeweiligen einzelnen Dreifachmutanten zu erwarten, die sich jedoch bei der Kombination der beiden Mutanten nicht verstärkt. Bei Aktivierung von c-Raf 177/182/183A durch RasG12V.E37G käme es jedoch bedingt durch die zusätzlich aufgehobene Interaktion zwischen E37 in Ras und R67/R59 in Raf zu einer stärkeren Abnahme der Transaktivierung. Ein qualitativ vergleichbares Resultat sollte auch bei Ko-transfektion des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes erhalten werden, da hier die vollständige Deletion der C1-Domäne in Raf einen Verlust der potentiellen Wechselwirkung mit dem Ras-Epitop, bestehend aus den Aminosäuren 43, 45 und 50, bewirkt.

H-Ras \ c-Raf	DC1	177/182/183A	59A	67A	66A	68A
G12V	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G12V 43/45/50A	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓
G12V E37G	↓ ↓	↓ ↓	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓

Tabelle 3.1 Schematische Darstellung der bei den „Kreuzexperimenten“ zu erwartenden Resultate

Zusammenfassung der für die Kombination der verschiedenen Ras- und Raf-Mutanten prognostizierten Resultate. Erwartete inhibierende Effekte auf die Aktivierung sind durch einzelne Pfeile, stärkere Inhibitionen durch Aufhebung von zwei unterschiedlichen Interaktionen durch zwei Pfeile dargestellt. Zum besseren Verständnis korrespondieren die gewählten Farben zu denen der Abbildung 3.27 (nähere Erläuterungen im Text und in der Legende zu Abbildung 3.27).

Für die nachfolgenden Experimente wurden RK13-Zellen mit den verschiedenen oben beschriebenen Raf-Konstrukten transient transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Kotransfektion

mit RasG12V, RasG12V.43/45/50A bzw. RasG12V.E37G. In Vorversuchen wurde für jedes der drei verschiedenen Ras-Konstrukte diejenige einzusetzende Plasmidmenge ermittelt, welche zu einer Raf(Wt)-Aktivierung führt die der durch RasG12V-vermittelten Aktivierung von Raf(Wt) annähernd äquivalent ist (ohne Abbildung). Hierdurch wird gewährleistet, daß trotz der durch die verschiedenen Ras-Mutanten bewirkten inhibierenden Effekte weitere, durch die diversen Raf-Mutanten bedingten Inhibitionen detektierbar sind. Die Lysate der geernteten und aufgeschlossenen Zellen wurde in einem Luciferase-Reporter-gen-Assay eingesetzt und die Luciferase-Aktivitäten bestimmt. In **Abbildung 3.28** sind die aus vier unabhängigen Messungen erhaltenen und gemittelten Daten dargestellt.

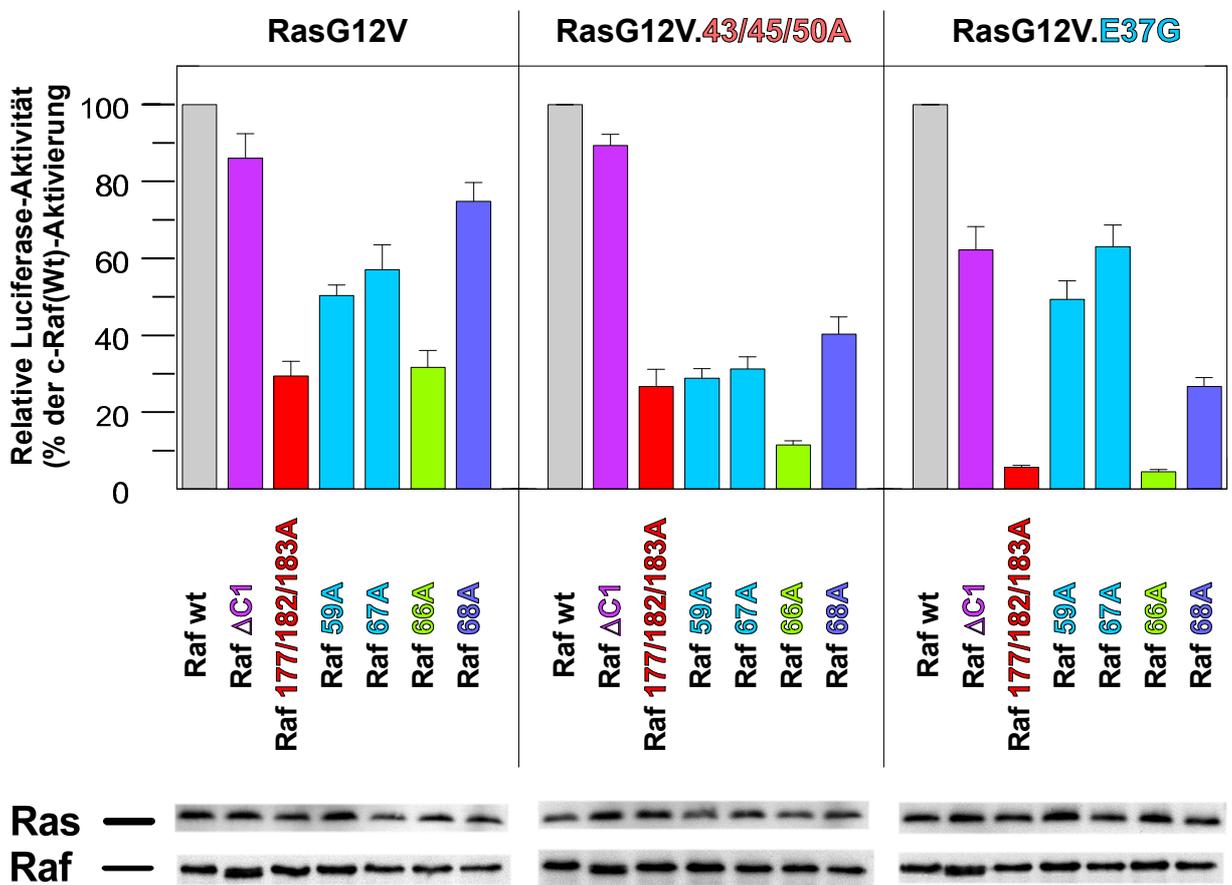


Abbildung 3.28 Vergleich der Transaktivierung verschiedener c-Raf-Konstrukte unter Vermittlung von RasG12V, RasG12V.43/45/50A und RasG12V.E37G im Reporter-gen-Assay

RK13-Zellen wurden mit Plasmiden der verschiedenen Raf-Konstrukte transient transfiziert. In drei verschiedenen Ansätzen erfolgte eine zusätzliche Kotransfektion von 80 ng, 145 ng bzw. 320 ng des RasG12V-, RasG12V.43/45/50A- bzw. des RasG12V.E37G-Plasmids. Die Daten zeigen den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten. Die für das jeweilige Ras-Konstrukt vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung wurde auf 100 % normiert. Aliquots der verschiedenen Zell-Lysate wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen um die Expressionsstärke der verschiedenen Ras- und Raf-Proteine bewerten zu können. Die Ergebnisse der Immundetektion sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Die gewählten Farben korrespondieren zu denen der Abbildung 3.27 und der Tabelle 3.1.

Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurde die für das jeweilige Ras-Konstrukt vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung auf 100 % normiert. Die ermittelten Aktivierungen sind in **Tabelle 3.2** zusammengefaßt und den zu erwartenden Resultaten der **Tabelle 3.1** gegenübergestellt. Generell ist festzustellen, daß die prognostizierten und die tatsächlich gemessenen Ergebnisse qualitativ gut korrelieren. Eine Substitution des Arginin 59 bzw. 67 der Raf RBD zu Alanin führt im Falle der Aktivierung durch RasG12V zu einer Inhibition auf 50 % bzw. 57 %. Bei Stimulation derselben Konstrukte durch RasG12V.43/45/50A wird eine stärkere Reduzierung der Aktivierung von 29 % bzw. 31 % festgestellt. Dies ist durch die Aufhebung einer zweiten, durch die Aminosäuren Q43, V45 und T50 vermittelten Interaktion bedingt. Die Koexpression des RasG12V.E37G-Proteins bewirkt eine geringere Inhibition, die mit 49 % bzw. 63 % von der Größenordnung im Bereich der Aktivierung durch RasG12V liegt. Da die RasG12V.E37G-vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung auf 100 % normiert wurde (bei der ja bereits die Interaktion zwischen E37 und R59/R67 aufgehoben ist), sollte die Veränderung der Arginine 59 und 67 der Raf RBD zu keiner weiteren Reduzierung der Aktivierung führen, d.h. sie sollte im Idealfall nahe 100 % liegen. In diesem Punkt konnten die von Jaitner *et al.* für diese Kombinationen ermittelten Aktivierungen von 86 % bzw. 90 % nicht reproduziert werden (Jaitner *et al.* 1997). Für die Stimulation durch RasG12V konnten hingegen nahezu identische Werte ermittelt werden. Diese Abweichungen sind nicht plausibel erklärbar und eventuell durch eine leicht unterschiedliche Behandlung der transfizierten Zellen, durch eine differierende Dichte der ausplattierten Zellen oder durch veränderte Inkubationszeiten begründet. Die Beseitigung der durch Q66 der Raf RBD vermittelten Wechselwirkung mit Ras durch eine entsprechende Alanin-Substitution bewirkt eine Inhibition der Aktivierung auf 32 %.

H-Ras \ c-Raf	DC1	177/182/183A	59A	67A	66A	68A
G12V	↓ 86 %	↓ 29 %	↓ 50 %	↓ 57 %	↓ 32 %	↓ 75 %
G12V 43/45/50A	↓ 89 %	↓ 27 %	↓↓ 29 %	↓↓ 31 %	↓↓ 12 %	↓↓ 40 %
G12V E37G	↓↓ 62 %	↓↓ 6 %	↓ 49 %	↓ 63 %	↓↓ 3 %	↓↓ 27 %

Tabelle 3.2 Gegenüberstellung der für die „Kreuzexperimente“ prognostizierten und der tatsächlich gemessenen Resultate

Zusammenfassung der für die Kombination der verschiedenen Ras- und Raf-Mutanten prognostizierten Resultate aus Tabelle 3.1 und der tatsächlich gemessenen Werte aus Abbildung 3.28. Erwartete inhibierende Effekte auf die Aktivierung sind durch einzelne Pfeile, stärkere Inhibitionen durch Aufhebung von zwei unterschiedlichen Interaktionen durch zwei Pfeile dargestellt. Zum besseren Verständnis korrespondieren die gewählten Farben zu denen der Abbildung 3.27 und 3.28 (nähere Erläuterungen im Text).

Gemäß der vorausgesagten Erwartungen sinkt das Aktivierungsniveau bei Induzierung durch RasG12V.43/45/50A bzw. RasG12V.E37G weiter auf Werte von 12 % bzw. 3 %. Dies ist durch eine zusätzliche Beseitigung der Interaktion der Aminosäuren Q43, V45 und T50 mit der c-RafC1-Domäne bzw. durch die Aufhebung der Wechselwirkung zwischen E37 in Ras und R59/R67 der Raf RBD bedingt. Diese Erklärung gilt analog auch für die qualitativ vergleichbaren Resultate der RBD-Mutante T68A. Hier beträgt die Aktivierung durch RasG12V 75 %; bei Stimulation durch RasG12V.43/45/50A bzw. RasG12V.E37G ist die Aktivierung deutlich geringer und liegt bei 40 % bzw. 27 %. Die Transaktivierung durch c-Raf(Δ C1) beträgt bei Induktion durch RasG12V bzw. RasG12V.43/45/50A 86 % bzw. 89 % der jeweiligen c-Raf(Wt)-Aktivierung. Bei Stimulation durch RasG12V.E37G ist dagegen eine geringere Aktivierung von 62 % meßbar. Ein qualitativ ähnliches Ergebnis kann für die c-Raf C1-Mutante S177/T182/M183A festgestellt werden. Bei Stimulierung durch RasG12V kann eine starke Inhibition der Aktivierung von 29 % gemessen werden. Damit konnte der von Daub *et al.* gezeigte inhibierende Effekt dieser Raf-Mutante eindeutig reproduziert werden, wobei dort ein Aktivierungsniveau von 35 % ermittelt wurde (Daub *et al.* 1998). Bei Kombination mit RasG12V.E37G wird die Aktivierung weitaus stärker reduziert und beträgt ca. 6 %, da zwei verschiedene Ras/Raf-Interaktionen aufgehoben werden, nämlich zum einen die zwischen E37 in Ras und R59/R67 der Raf RBD und zum anderen zwischen den potentiell korrespondierenden Epitopen Q43/V45/T50 in Ras und S177/T182/M183 der c-Raf C1-Domäne. RasG12V.43/45/50A vermittelt eine Aktivierung des Raf 177/182/183A-Konstruktes von 27 %. Diese ist damit nahezu identisch zu der durch Stimulierung durch RasG12V erhaltenen Aktivierung. Eine Interaktion dieser beiden Epitope vorausgesetzt, wäre eigentlich eine deutlich geringere Inhibition, idealerweise von annähernd 100 %, zu erwarten gewesen, da die RasG12V.43/45/50A-vermittelte c-Raf(Wt)-Aktivierung, bei der diese Interaktion bereits aufgehoben ist, auf 100 % normiert wurde. Dieses Phänomen konnte schon hinsichtlich der Untersuchungen der Wechselwirkung von E37 in Ras mit R59/R67 der Raf RBD beobachtet werden und sollte deshalb hier nicht überinterpretiert werden. Als entscheidend soll hier festgehalten werden, daß die durch die Mutanten RasG12V.Q43/V45/T50A und c-Raf 177/182/183A aufeinander ausgeübten Effekte qualitativ vergleichbar mit denen sind, die durch Kombination von RasG12V.E37G und c-RafR57A bzw. c-RafR67A auftreten, deren Interaktion bereits durch zahlreiche Experimente als gesichert gilt. Aufgrund der Parallelität dieser Ergebnisse kann die Interaktion zwischen dem Epitop der Aktivierungs-Region von Ras, bestehend aus den Aminosäuren Q43, V45 und T50

und dem Ras-Bindungssepitop der c-Raf C1-Domäne definiert durch die Aminosäuren S177, T182 und M183 als ebenfalls real angesehen werden.

Um sicherzustellen, daß die gemessenen Aktivierungen nicht auf eine unterschiedlich starke Expression der verschiedenen Ras- und Raf-Proteine zurückzuführen sind, wurden zur Kontrolle darüber hinaus Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden, gemäß der unterschiedlichen Transfektionseffizienz der verschiedenen Transfektionsansätze, entsprechende Volumina an Zell-Lysaten auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der separierten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immundetektion der Ras- bzw. Raf-Proteine durch einen entsprechenden primären Antikörper. Die in der **Abbildung 3.28** dargestellten Western-Blot-Resultate zeigen nahezu identische Expressionsniveaus für sämtliche Ras- und Raf-Konstrukte.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Funktion der Lipidmodifikationen von H-Ras für die Aktivierung von c-Raf 1

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern den posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins, insbesondere der Farnesylgruppe, eine über die reine Funktion für die Membranrekrutierung der Raf-Kinase hinausgehende Rolle in dem Raf-Aktivierungsprozeß zukommt. So finden einige Autoren, daß die Lipidmodifikationen essentiell für die Aktivierung von c-Raf und B-Raf sind (Kikuchi und Williams 1994; Okada *et al.* 1996). Durch Untersuchungen mit verschiedenen chimären Proteinen konnte gezeigt werden, daß diese durch eine N-terminale Fusion einer aus dem E1-Protein des *avian* Corona-Virus abgeleiteten Transmembran-Domäne artifiziell an die Plasmamembraninnenseite dirigiert werden können (Swift und Machamer 1991). Experimente mit einem auf diese Weise erzeugten transmembranalen, onkogenen RasQ61L-Konstrukt (TM-RasQ61L-3S), welches nicht C-terminal modifiziert ist, haben gezeigt, daß dieses zur Transformation von NIH3T3-Zellen *in vivo* fähig ist (Hart und Donoghue 1997). Die Autoren folgern daraus, daß die Ras-Lipidmodifikationen für die Transformation eukaryontischer Zellen nicht essentiell sind, solange das Ras-Protein in der Plasmamembran lokalisiert ist. In der vorliegenden Arbeit soll unter Anwendung der von Hart *et al.* beschriebenen Strategie detaillierter analysiert werden, ob die Raf-Kinase als prominentester, dem Ras-Protein nachgeschalteter Effektor bzw. die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade unabhängig von den Ras-Lipidmodifikationen aktiviert werden kann (**Abbildung 3.1 und 3.2**).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß c-Raf(Wt) durch ein solch artifizielles, transmembranales und konstitutiv aktives Ras-Konstrukt (QI-RasG12V.3S) im Luciferase-Reporter-Gen-Assay erfolgreich aktiviert werden kann (**Abbildung 3.3**). Dabei muß jedoch eine etwa fünffach höhere Menge des zu transfizierenden Plasmids eingesetzt werden, um ca. 90 % der durch „normales“ RasG12V induzierten Raf(Wt)-Aktivierung zu erreichen. Die alleinige Transfektion von steigenden Mengen an QI-RasG12V.3S führt nicht zu einer Erhöhung der durch dieses Konstrukt bedingten Basalaktivität und liegt in jedem Fall im Bereich der Leervektor-Kontrolle und damit deutlich unter der durch RasG12V vermittelten Basalaktivität. Es scheint, als sei QI-RasG12V.3S zur Aktivierung endogener Raf-Kinase nicht befähigt; eine Beobachtung, welche beispielsweise auch für die Ras-Mutante RasG12V/E37G gemacht werden kann (Jaitner *et al.* 1997). Die Fähigkeit des

QI-RasG12V.3S-Konstruktes zur Stimulation der Raf-Kinase als nachgeschalteter Effektor konnte auch durch Nachweis der unmittelbaren Phosphorylierung von MEK als Substrat der aktivierten Raf-Kinase in einem Kinase-Aktivitäts-Assay gezeigt werden (**Abbildung 3.4**). Auch hier ist die zu beobachtende Aktivierung durch QI-RasG12V.3S deutlich geringer als die durch RasG12V induzierte und beträgt, obwohl auch hier eine fünffach höhere Plasmidmenge eingesetzt wurde, im Vergleich zur Aktivierung durch RasG12V nur 41 %. Eine Erklärung für das im Vergleich zum Luciferase-Reportergen-Assay niedrigere Aktivierungsniveau besteht darin, daß es innerhalb einer Signalkaskade wie dem Ras/Raf/MEK/ERK-Modul (**Abbildung 1.7**) zu einer Amplifikation des eingehenden initialen Signals kommt. Die Aktivierung im Luciferase-Reportergen-Assay ist folglich größer, weil dort die Transkriptionsaktivität am Ende der Kaskade gemessen wird. Western-Blot-Experimente haben gezeigt, daß eine im Vergleich zu RasG12V fünffach höhere Menge des QI-RasG12V.3S-Plasmids eingesetzt werden muß, um eine annähernd äquivalente Expression zu erzielen (**Abbildung 3.5**). Das QI-RasG12V.3S-Protein wird zwar weniger effizient exprimiert, ist jedoch zur Aktivierung der Raf-Kinase sowie der nachgeschalteten Signalkaskade fähig. Als Fazit bleibt festzuhalten, daß die Ras-Lipidmodifikationen für die Aktivierung der Raf-Kinase und der nachfolgenden Aktivierungsschritte nicht essentiell sind. Dies erklärt auch die von Hart *et al.* beobachtete Transformation von NIH3T3-Zellen durch Expression von transmembranalem RasQ61L.

Die hier vorgestellten Daten wurden bereits 1998 veröffentlicht (Daub *et al.* 1998) und später durch Hart *et al.* reproduziert und somit bestätigt (Hart *et al.* 2000). Hart *et al.* zeigen neben Resultaten aus Reportergen- und Kinase-Aktivitäts-Assays, daß transmembranales, konstitutiv aktives Ras (TM-RasQ61L-3S) zur Induzierung von Differenzierungsprozessen wie dem Neuritenwachstum in PC12-Zellen fähig ist. Darüber hinaus kann dieses Ras-Konstrukt auch weitere Signalwege wie etwa den PI3-Kinase- und den Rac/Rho-Signalweg, stimulieren. TM-RasQ61L-3S zeigt im Luciferase-Reportergen-Assay eine Aktivierung von ca. 30 % und im Kinase-Aktivitäts-Assay eine Aktivierung von 42 %, jeweils verglichen mit RasQ61L. Letzteres Resultat stimmt mit den in dieser Arbeit vorgestellten Werten überein, wobei im Gegensatz zu Hart *et al.* jedoch wie erwähnt höhere Plasmidmengen eingesetzt wurden. Um eine von Hart *et al.* erzielte Aktivierung von 30 % im Luciferase-Reportergen-Assay zu erreichen, müßten unter den hier geschilderten Bedingungen etwa die doppelte Menge an Plasmid eingesetzt werden. Die Aktivierung durch TM-RasQ61L-3S wie auch durch QI-RasG12V.3S ist jedoch im allgemeinen deutlich geringer als die durch RasQ61L bzw. RasG12V.

Abweichungen zwischen den Resultaten dieser Arbeit und denen von Hart *et al.* publizierten können durch diverse Faktoren begründet sein. So werden neben verschiedenen Vektoren, die sich unter anderem durch unterschiedliche Promotoren auszeichnen, je nach Experiment auch unterschiedliche Zelllinien eingesetzt. Für den Luciferase-Reportergen-Assay benutzen Hart *et al.* NIH3T3-Zellen, für den Kinase-Aktivitäts-Assay jedoch COS-1-Zellen und in weiteren Versuchen 293T-Zellen. Darüber hinaus bestehen auch Abweichungen hinsichtlich der Zellkultur-Bedingungen, der Inkubationszeiten *etc.* Auch Hart *et al.* schlußfolgern aus ihren Untersuchungen, daß die Aktivierung der Raf-Kinase generell auch ohne Ras-Lipidmodifikationen respektive der Ras-Farnesylierung möglich ist. Die Autoren schließen jedoch nicht völlig aus, daß die posttranslationalen Modifikationen des Ras-Proteins die Möglichkeit der Aktivierung von bzw. die Interaktion mit nachgeschalteten Effektoren verstärken. Dies könnte ihrer Ansicht nach durch Lipid/Protein-Interaktion oder auch durch eine durch den C-Terminus von Ras induzierte, spezielle Konformation vermittelt werden. Auch der Einfluß der Lipidmodifikationen auf die zelluläre und membranale Lokalisation des Ras-Proteins kann hier von Bedeutung sein. In der Tat gibt es neben einer unterschiedlichen Expressionsrate zahlreiche Aspekte, welche die Signalübertragung beeinflussen und so Erklärungsmöglichkeiten dafür bieten, daß eine Stimulation von Raf durch QI-RasG12V.3S im Vergleich zur Induzierung durch RasG12V nicht völlig identische Resultate liefert. Einige dieser die Signalübertragung beeinflussenden Aspekte sollen im folgendem ausführlicher erläutert werden, da sie auch in Hinblick auf die Beurteilung der zahlreichen anderen publizierten Arbeiten mit zum Teil kontroversen Resultaten wichtig sind.

Obwohl zahlreiche fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, daß artifizelle, chimäre Proteine wie TM-RasQ61L-3S (und folglich auch QI-RasG12V.3S) in der Plasmamembran lokalisiert sind (Hart und Donoghue 1997; Machamer *et al.* 1990; Machamer und Rose 1987; Swift und Machamer 1991), muß bedacht werden, daß die Plasmamembran einer Zelle keinen homogenen *lipid bilayer* darstellt. So ist der Aufbau der Zellmembran auf der basalen und apikalen Seite oft deutlich verschieden; auch (laterale) Zell/Zell-Kontakte beeinflussen die Membranstruktur und -zusammensetzung. So lassen sich in der Plasmamembran beispielsweise cholesterinreiche, auch als *lipid rafts* bezeichnete Membranbereiche identifizieren (Simons und Ikonen 1997; Simons und Ikonen 2000; Simons und Toomre 2000; Kranenburg *et al.* 2001; Rizzo *et al.* 2001). Ein morphologisch identifizierbarer Subtyp der *lipid rafts* stellen die sogenannten *Caveolae* dar. Diese enthalten das namensgebende Strukturprotein Caveolin, welches die Aggregation der (planaren) *lipid rafts* bewirkt und nachfolgend zu einer Einstülpung der Plasmamembran führt (Hooper 1999; Kurzchalia und Parton 1999;

Masserini und Ravasi 2001). Die korrekte Lokalisation von Signalproteinen in oder außerhalb solcher Membranbereiche ist von großer Bedeutung (Mineo *et al.* 1996; Parton und Hancock 2001) und hängt u.a. von den posttranslationalen Lipidmodifikationen ab. So lassen sich in den *lipid rafts* vor allem acetylierte (= palmitylierte und myristoylierte) Proteine, jedoch kaum prenylierte (= farnesylierte und geranylgeranylierte) Proteine finden (Melkonian *et al.* 1999; Moffett *et al.* 2000). Unverändertes H-Ras, welches einfach farnesyliert und zweifach palmityliert ist, findet sich demzufolge vorwiegend in den *lipid rafts*, während nur einfach farnesyliertes K-Ras hauptsächlich außerhalb dieser lokalisiert ist. Es konnte gezeigt werden, daß dominant-negatives Caveolin die Funktion von H-Ras beeinträchtigt, indem dieses die cholesterinreichen Membrandomänen zerstört (Roy *et al.* 1999). Des Weiteren verursacht dominant-negatives Caveolin eine Imbalance der intrazellulären Cholesterin-Konzentration (Pol *et al.* 2001). Die C-terminale, polybasische Region von K-Ras bewirkt eventuell eine Rekrutierung bzw. Konzentrierung saurer Membranlipide und schafft so in der Plasmamembran neue, spezialisierte Zentren für die Signalübertragung. Die zweite posttranslationale Modifikation (Palmitylierung) respektive die polybasische Sequenz ist wahrscheinlich für die **Mikrolokalisierung** der verschiedenen Ras-Isoformen entscheidend. Die ca. 20 letzten C-terminalen Aminosäuren, welche die sogenannte hypervariable Region (HVR) bilden, sind für die exakte Lokalisierung ebenfalls von Bedeutung (Booden *et al.* 2000; Prior und Hancock 2001; Reuther und Der 2000). Berücksichtigt man den Einfluß spezieller Membranbereiche bei der Signaltransduktion, läßt sich für nicht lipidmodifiziertes, transmembranales QI-RasG12V.3S bzw. TM-RasQ61L-3S im Gegensatz zu H-Ras und K-Ras eine annähernd gleichmäßige Verteilung über die gesamte Plasmamembran erwarten. Diese unterschiedliche Distribution beeinflußt u.a. das Zusammentreffen vor- und nachgeschalteter Komponenten eines Signalweges und damit natürlich die Signalübertragungsprozesse im allgemeinen. Das Szenario wird noch komplexer, wenn man weiter berücksichtigt, daß die Raf-Kinase zwischen den strukturierten *Caveolae* und den unstrukturierten Membranbereichen zwar annähernd gleichverteilt ist, jedoch vorwiegend in letzteren und nicht in den *lipid rafts* aktiviert wird (Prior *et al.* 2001). Die Mikrolokalisierung membranständiger Proteine ist stark von deren, nach der Translation eingeschlagenem Weg durch das Cytoplasma zur Plasmamembran abhängig. Während H-Ras und N-Ras dem klassischen, sekretorischen Weg folgen, also über Vesikel vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran gelangen (Apolloni *et al.* 2000; Choy *et al.* 1999; Prior und Hancock 2001), ist K-Ras kaum in Membranen des Golgi-Apparates nachweisbar und scheint damit einen Golgi-unabhängigen **Weg zur Plasmamembran** zu nehmen. Möglicherweise dissoziiert K-Ras vom ER und gelangt, getrieben von der Wechselwirkung der C-terminalen, poly-

basischen Sequenzen und den sauren Membranlipiden, durch freie Diffusion passiv an die Plasmamembran (Roy *et al.* 2000). Dies würde zu einer gleichmäßigen Verteilung von K-Ras in der Plasmamembran, bzw. in deren ungeordneten Bereichen führen, während H-Ras präferentiell in den *lipid rafts* lokalisiert wäre. Dies könnte erklären, warum die Raf-Kinase besser durch K-Ras als durch H-Ras aktiviert werden kann (Ellis und Clark 2000; Yan *et al.* 1998). Dennoch wird in den meisten Arbeiten, so auch in der vorliegenden, H-Ras zur Raf-Aktivierung verwendet. Da die verschiedenen Ras-Isoformen eine starke Identität zeigen, die im Bereich der Effektor-Region und den angrenzenden Regionen sogar 100 % beträgt (**Abbildung 1.6**), wird im allgemeinen jedoch davon ausgegangen, daß H-Ras und K-Ras zur Vermittlung ähnlicher bzw. nahezu gleicher Effekte befähigt sind.

Der Einfluß der Mikrolokalisierung verschiedener Komponenten einer Signalkaskade auf den Aktivierungsprozeß verdeutlicht die durch H-Ras bzw. Rap1A vermittelte Aktivierung von Ral durch dessen spezifischen Austauschfaktor RalGDS (auch RalGDF genannt). Sowohl H-RasGTP als auch Rap1AGTP binden an die RBD von RalGDS, wobei die Affinität von Rap1AGTP zur RalGDS-RBD im Vergleich zu H-RasGTP etwa um den Faktor 100 höher ist (Herrmann *et al.* 1996). Dies legt zunächst nahe, daß RalGDS weniger einen Ras-, als vielmehr einen Rap-Effektor darstellt. Die unterschiedlichen C-terminalen Lipidmodifikationen der beiden GTPasen bewirken jedoch eine Lokalisation von Ras an der äußeren Plasmamembran, während Rap in intrazellulären Membranen inseriert ist (Matsubara *et al.* 1999). Die Aktivierung von Ras führt folglich zu der Rekrutierung von RalGDS an die Plasmamembran, während aktiviertes Rap1A eine Lokalisierung von RalGDS an innere Membranen bewirkt. Da Ral jedoch ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert ist, kann dessen Aktivierung demzufolge nicht durch Rap1A, sondern nur durch Ras erfolgen, obwohl die Affinität zwischen Rap1A und RalGDS höher ist als die von H-Ras und RalGDS. Möglicherweise bewirkt die Aktivierung von Rap1A die hochaffine Bindung von RalGDS in einem stabilen Rap/RalGDS-Komplex, wodurch die Ras-vermittelte Signaltransduktion über RalGDS und Ral unterbunden wird. Dies könnte die antagonistische Wirkung von Rap auf die durch onkogenes Ras verursachten zellulären Effekte erklären (Linnemann *et al.* 2002).

Bei der Beurteilung der durch QI-RasG12V.3S vermittelten Effekte muß des weiteren berücksichtigt werden, daß dieses Protein zum einen ein höheres Molekulargewicht als RasG12V hat und zum anderen N-terminal zweifach glykosyliert wird. Dadurch kann der **zeitliche Verlauf** der Translation und der Modifikation für QI-RasG12V.3S und RasG12V trotz Benutzung desselben intrazellulären Weges verschieden sein.

Nicht nur die Geschwindigkeit der Expression, sondern auch die der Degradation (durch Ubiquitinierung) von Proteinen bzw. das Verhältnis dieser beiden gegensätzlichen Prozesse, kann die Signalübertragung beeinflussen. Die Stabilität eines Proteins wird vorwiegend durch seinen aminoterminalen Aminosäurerest bestimmt (*N-end rule*). Da die in dieser Arbeit verwendeten Ras-Konstrukte (RasG12V und QI-RasG12V.3S) jedoch beide als erste Aminosäure ein Methionin besitzen, ist eine unterschiedliche **Halbwertszeit** dieser beiden Proteine als Erklärung für ihre unterschiedlich starke Potenz zur Aktivierung der Raf-Kinase auszuschließen (Bachmair *et al.* 1986; Ciechanover 1987; Varshavsky 1992; Waxman und Goldberg 1986).

Ein weiterer Punkt, der die Signaltransduktionsprozesse beeinflusst, stellt die durch die verschiedenen Lipidmodifikationen der Proteine vermittelte, unterschiedliche **Dynamik** der Membraninsertion und -dissoziation dar (Johnson und Cornell 1999). So ist die Palmitoylierung aufgrund ihrer Reversibilität dynamisch (Magee *et al.* 1987; Milligan *et al.* 1995), während die Farnesylierung nicht reversibel ist (Prior und Hancock 2001). Da QI-RasG12V.3S weder farnesyliert noch palmitoyliert ist, ist dessen Dynamik mit Sicherheit von der des RasG12V-Proteins verschieden.

Des Weiteren führt die im Vergleich zur normalen, C-terminalen Membraninsertion des RasG12V-Proteins artifizielle, N-terminale Insertion des QI-RasG12V.3S-Proteins in der Plasmamembran zu einer unterschiedlichen räumlichen **Orientierung** des entsprechenden Ras-Proteins in bezug auf die Plasmamembran selbst sowie in bezug auf vor- bzw. nachgeschaltete Komponenten der Signalkaskade (GEFs, Effektoren, Kinasen, Phosphatasen *etc.*).

Ähnliche Auswirkungen dürfte auch eine durch die differierende Membraninsertion der beiden Ras-Konstrukte bedingte, unterschiedliche **Distanz** der beiden Proteine zur Plasmamembran haben. Dies zeigt sich auch dadurch, daß ein *linker* von mindestens 11 Aminosäuren zwischen der Transmembran-Domäne und dem eigentlichen Ras-Protein für die Funktionalität des chimären Proteins essentiell ist (Daub *et al.* 1998; Hart und Donoghue 1997).

Die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen (Signal-)Proteinen und der Plasmamembran sowie der daraus resultierenden Effekte, lassen so manche der mit gereinigten Proteinen einer definierten Konzentration durchgeführten *in vitro*-Versuche als kritisch erscheinen. So kann die lokale Konzentration eines Proteins in bestimmten Membranbereichen (*lipid rafts*, *Caveolae*) deutlich höher als die auf das Gesamzellvolumen bezogene Konzentration sein. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß cytoplasmatische Proteine eine dreidimensionale Diffusion zeigen, während die Diffusion membranständiger Proteine aufgrund der ausschließ-

lich lateralen Diffusion in der Plasmamembran zweidimensional ist. Bei Proteinen, die an fibrillären Strukturen lokalisiert sind, ist die Anzahl der Freiheitsgrade für die Diffusion noch um einen weiteren Faktor geringer.

Die aktivierenden und inhibierenden Effekte der verschiedenen von Daub *et al.* durch extensive Alanin-Scanning-Mutagenese identifizierten und charakterisierten c-Raf C1-Mutanten (**Abbildung 3.6**) lassen sich ausnahmslos auch durch Stimulation mit QI-RasG12V.3S statt durch RasG12V reproduzieren (**Abbildung 3.7 und 3.8**). Die beobachteten Effekte sind also unabhängig von jedweder Lipidmodifikation des Ras-Proteins. Allein die c-Raf C1-Mutanten K144A, R164A und L160A sowie deren Kombinationen zu Doppelmутanten zeigen eine hier von signifikante Abweichung (**Abbildung 3.8**). Das Leucin 160 befindet sich in Homologie zur C1-Domäne der PKCs in einem für die DAG/Phorbolester-Bindung relevanten Bereich. Auch wenn die Raf-Kinase selbst zwar kein DAG bzw. Phorbolester bindet, so könnte das Leucin 160 aufgrund dieser Homologiebetrachtung jedoch für eine Interaktion mit einem noch nicht identifizierten Lipid-Kofaktor von Bedeutung sein. Eine derartige hypothetische, spezifische Interaktion würde auch erklären, warum eine relativ moderate Substitution eines Leucins durch ein Alanin zu einer verhältnismäßig starken Inhibition der Raf-Aktivierung führt. Für die basischen Aminosäuren Lysin 144 und Arginin 164 wird eine Wechselwirkung mit sauren Lipiden der Plasmamembran angenommen (Daub *et al.* 1998). Dies ist wie **Abbildung 4.1** verdeutlicht gut vorstellbar, insbesondere da das hydrophobe Leucin 160 in der Membran inseriert ist, was für eine postulierte Interaktion dieser Aminosäure mit einem hypothetischen *lipid messenger* essentiell wäre.

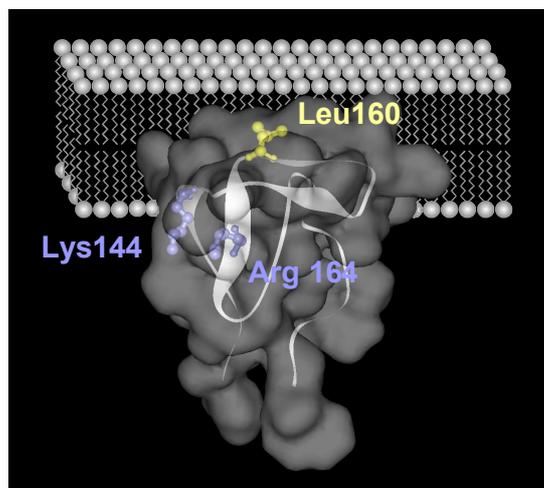


Abbildung 4.1 Modell für die Insertion der c-Raf C1-Domäne in der Plasmamembran
Das hydrophobe, in der Plasmamembran inserierte Leucin 160 ist gelb, die basischen Aminosäuren Lysin 144 und Arginin 164 sind blau dargestellt. Letztere interagieren mit sauren Membranlipiden. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt (gemäß Mott *et al.* 1996).

Die Aminosäuren Lysin 144 und Arginin 164 sind aufgrund ihres basischen Charakters potentielle, mit sauren Membranlipiden interagierende Aminosäuren. In zahlreichen Studien wurde die Funktion basischer, aber auch aliphatischer und aromatischer Aminosäuren für die Membran/Protein-Interaktion detailliert analysiert (Gelb *et al.* 1999; Han *et al.* 1999; Stahelin und Cho 2001; Yau *et al.* 1998). Diese und die hier dargestellten Resultate legen nahe, daß zumindest eine Funktion der c-Raf C1-Domäne in der Vermittlung der Membranlokalisation der Raf-Kinase besteht. So könnte die C1-Domäne nach der initialen, Ras-vermittelten Membranrekrutierung der Raf-Kinase für die Aufrechterhaltung der Membranlokalisation verantwortlich sein (vgl. **Abbildung 1.11**). Die initiale Interaktion von Ras mit der RBD der Raf-Kinase induziert eine Konformationsänderung, infolgedessen die in der inaktiven Kinase kryptische C1-Domäne für eine Interaktion mit Ras und der Plasmamembran zugänglich wird. Die Inhibition durch die c-Raf C1-Mutanten K144A, R164A und 160A sowie der Doppelmutanten K144/R164A und K144/L160A ist bei Stimulation durch QI-RasG12V.3S deutlich stärker als bei Aktivierung durch RasG12V, d.h. diese Raf-Konstrukte reagieren systematisch anders auf die Art der Membraninsertion. Dies bedeutet aber nicht, daß diese Aminosäuren der c-Raf C1-Domäne an einer Interaktion mit den C-terminalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins, speziell der Farnesylgruppe, beteiligt sind. Im Gegenteil: wenn diese Aminosäurereste für eine Bindung der Farnesylgruppe des Ras-Proteins essentiell wären, sollten die bei Stimulation mit RasG12V zu beobachtenden, inhibierenden Effekte dieser c-Raf C1-Mutanten bei Verwendung von QI-RasG12V.3S zur Aktivierung nicht zu registrieren sein, da ja in diesem Fall bereits durch das Fehlen der Farnesylgruppe eine potentielle Wechselwirkung seitens des Ras-Proteins beseitigt ist. Die RasG12V-vermittelte Aktivierung der Doppelmutanten K144/R164A und K144/L160A liegen laut Daub *et al.* bei etwa 30 % und 15 %. Die artifizielle Membraninsertion dieser c-Raf C1-Mutanten durch Fusion der von K-Ras stammenden CaaX-Sequenz (*CaaX-ing*) kann deren inhibierende Effekte nicht bzw. kaum kompensieren und führt verglichen mit c-Raf(Wt)-CaaX zu einer Aktivierung von 15 % bzw. 40 %. Im Vergleich dazu führt beispielsweise das *CaaX-ing* der c-Raf C1-Mutante S177/T182/M183A zu einer Reduzierung des durch sie vermittelten inhibierenden Effektes von 35 % auf annähernd 100 %. Die Doppelmutanten K144/R164A und K144/L160A zeigen verglichen mit c-Raf(Wt) im *Two-Hybrid-Assay* eine relativ geringe Abnahme der Ras-Bindung auf 70 % und 60 % (Daub *et al.* 1998). Die Aminosäuren K144, L160 und R164 scheinen demnach essentiell für die Raf-Aktivierung zu sein, indem sie in einem der Membranrekrutierung folgenden Aktivierungsschritt involviert sind.

Eine andere Arbeitsgruppe stellt für Mutationen im Bereich von R143 bis T145 der c-Raf C1-Domäne und konkret für die Doppelmutante R143E/K144E eine Zerstörung der Bindung von 14-3-3 ζ -Proteinen an die C1-Domäne und eine Aktivierung der Raf-Kinase *in vivo* fest, wobei die Ras/Raf-Interaktion jedoch nicht beeinträchtigt ist. Die Autoren folgern, daß 14-3-3 ζ -Proteine mit der C1-Domäne der Raf-Kinase interagieren und so für die negative Regulation der Raf-Funktion essentiell sind (Clark *et al.* 1997a). McPherson *et al.* zufolge wird die C1-Domäne jedoch nicht für die 14-3-3-Bindung selbst benötigt, sondern stabilisiert vielmehr die Raf/14-3-3-Interaktion (McPherson *et al.* 1999). Eine weitere Arbeitsgruppe kann ebenfalls für das Lysin 144 und auch für das benachbarte Arginin 143 eine wichtige Funktion für die negative Regulation der Raf-Kinase feststellen, indem diese die Wechselwirkung zwischen C- und N-Terminus der Raf-Kinase vermitteln und somit für die Aufrechterhaltung einer inaktiven Konformation der Raf-Kinase von Bedeutung sind. Diese Wechselwirkung kann gemäß den Autoren intra- oder intermolekularer Natur sein und die Beteiligung eines weiteren dritten Faktors, wie etwa von 14-3-3-Proteinen, beinhalten (Winkler *et al.* 1998). Die Resultate von Clark *et al.* und Winkler *et al.* verhalten sich in bezug auf die durch die Mutation des Lysins 144 bewirkten Effekte diametral entgegengesetzt zu denen von Daub *et al.* Wäre das Lysin 144 für eine negative Regulation relevant, hätten Daub *et al.* für die C1-Mutante K144A entgegen ihren Beobachtungen einen aktivierenden Effekt feststellen müssen. Hinsichtlich einer das Arginin 143 der C1-Domäne betreffenden Mutation besteht dagegen völlige Übereinstimmung zwischen den drei Arbeitsgruppen, da alle einen aktivierenden Effekt auf die Raf-Aktivität feststellen können. Die Arbeitsgruppe um R. Bell zeigt dagegen, daß ein Epitop der c-Raf C1-Domäne, bestehend aus den ausnahmslos basischen Aminosäuren R143, K144 und K148, für eine Interaktion mit saurem Phosphatidylserin der Plasmamembran und damit für die Assoziation mit dieser und der nachfolgenden Raf-Aktivierung essentiell ist (Improta-Brears *et al.* 1999). Abgesehen von der Übereinstimmung hinsichtlich eines durch die Mutation des Lysins 144 bewirkten inhibierenden Effekts sind die Resultate von Improta-Brears *et al.* nicht konform mit denen von Daub *et al.* Letztere konnten für die c-Raf C1-Mutante R143A wie bereits erwähnt einen aktivierenden Effekt zeigen; die c-Raf C1-Mutante K148A führt dagegen weder zu einem aktivierenden noch zu einem inhibierenden Effekt. Die teilweise widersprüchlichen Resultate der verschiedenen Arbeitsgruppen lassen sich nicht zu einem einheitlichen Modell für die Funktion dieser Aminosäurereste vereinigen, auch wenn die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten für sich betrachtet plausibel erscheinen.

Der im Vergleich zu den übrigen, inhibierenden c-Raf C1-Mutanten systematisch unterschiedliche Effekt der Mutanten K144A, L160A und R164A sowie der aus ihnen abgeleiteten Doppelmutanten K144/R164A und K144/L160A in bezug auf die Abhängigkeit von der Art der Membraninsertion des stimulierenden Ras-Proteins wurde näher untersucht, indem zur Aktivierung sämtlicher Raf-Proteine das QI-RasG12V.3C-Konstrukt verwendet wurde. Dieses artifizielle, konstitutiv aktive Ras-Konstrukt zeichnet sich durch eine zweifache Membraninsertion aus; zum einen über eine N-terminale Transmembran-Domäne und zum anderen aufgrund eines unveränderten C-Terminus über die konventionellen Lipidmodifikationen (vgl. **Abbildung 3.2**). Die QI-RasG12V.3C-vermittelte Aktivierung der verschiedenen Raf-Proteine führt, im Vergleich zu einer Aktivierung durch das QI-RasG12V.3S-Konstrukt, selektiv zu einer Verringerung der durch die Raf-Mutanten K144A, L160A, R164A, K144/R164A und K144/L160A induzierten inhibierenden Effekte (vgl. **Abbildung 3.9** und **Abbildung 3.8**). Dieser selektive Effekt kann jedoch nicht auf das Fehlen bzw. das Vorhandensein der Lipidmodifikationen der beiden verschiedenen Ras-Proteine zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt, wären im Fall einer potentiellen und für die Raf-Aktivierung essentiellen Interaktion der Aminosäuren K144A, L160A und R164A mit beispielsweise der Farnesylgruppe die bei einer Stimulation mit QI-RasG12V.3C zu beobachtenden, inhibierenden Effekte dieser mutierten Aminosäurereste bei Verwendung von QI-RasG12V.3S zur Aktivierung nicht zu registrieren, da in diesem Fall bereits durch das Fehlen der Farnesylgruppe eine potentielle Wechselwirkung seitens des Ras-Proteins beseitigt ist. Außerdem ist zumindest eine Interaktion des Lysins 143 und des Arginins 164 mit den hydrophoben Lipidmodifikationen des Ras-Proteins schon aufgrund ihres basischen Charakters respektive ihrer positiven Ladung äußerst unwahrscheinlich. Die systematisch unterschiedlichen Effekte der Raf-Mutanten K144A, L160A, R164A, K144/R164A und K144/L160A in Abhängigkeit von der Art der Membraninsertion des jeweils zur Stimulation eingesetzten Ras-Proteins (QI-RasG12V.3S bzw. QI-RasG12V.3C) ist wohl eher von generellerer Natur und resultiert wahrscheinlich aus einer verschlechterten bzw. verbesserten Orientierung, Zugänglichkeit respektive Distanz des jeweiligen Ras-Proteins und folglich der verschiedenen Raf-Mutanten zur Plasmamembran und/oder zu vor- bzw. nachgeschalteten Komponenten der Signalkaskade (**Abbildung 4.2**). Ungeachtet der unterschiedlichen experimentellen Daten, scheint der vorwiegend basischen Region um die Aminosäuren R143, K144, R164 und K148 eine besondere Funktion oder mehrere Funktionen hinsichtlich des Raf-Aktivierungsprozesses zuzukommen.

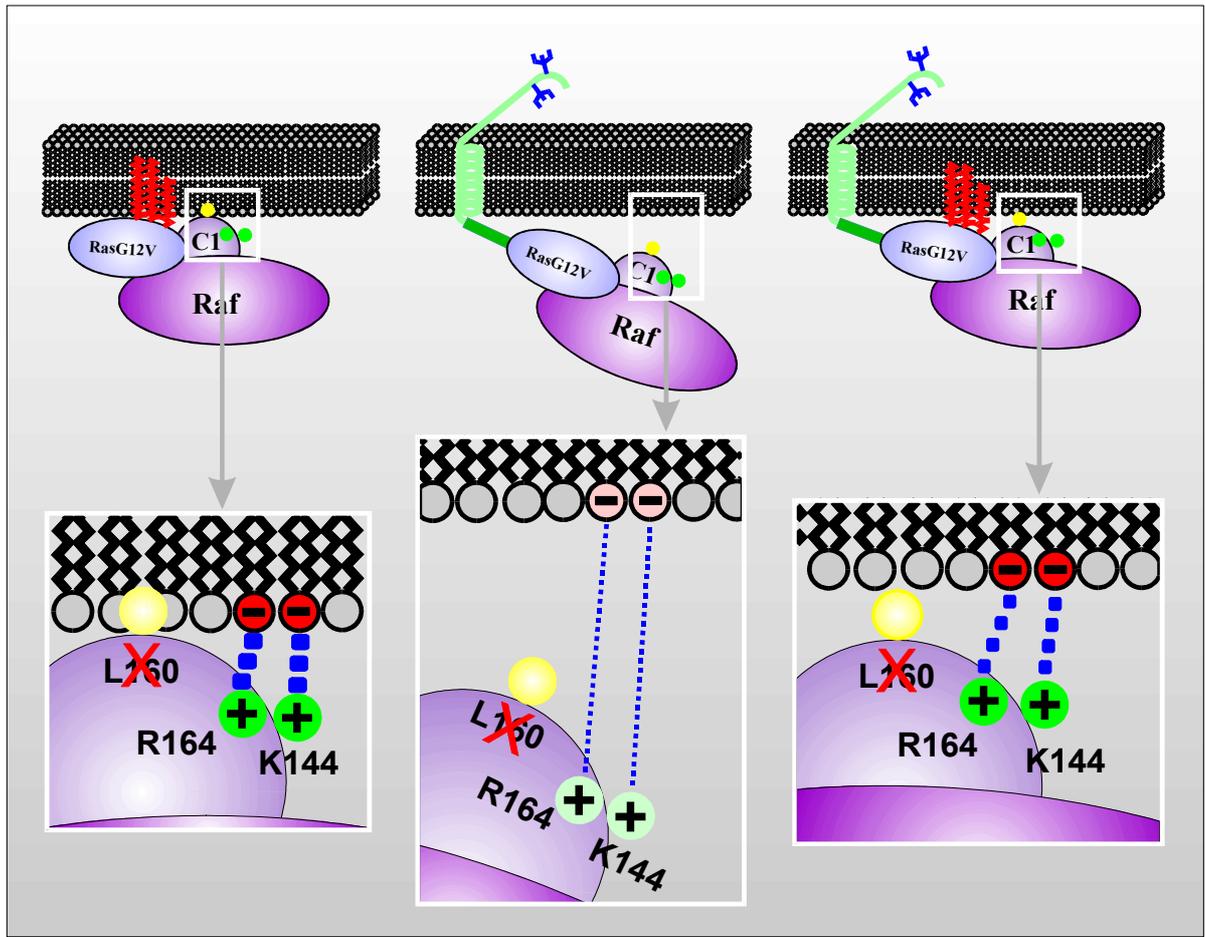


Abbildung 4.2 Hypothetischer Effekt des QI-RasG12V.3S- und des QI-RasG12V.3C-Konstruktes auf die c-Raf C1-Mutanten K144A, L160A und R164A

Die Aminosäuren K144 und R164 der c-Raf C1-Domäne sind für eine Interaktion mit sauren Lipiden der Plasmamembran, wie beispielsweise Phosphatidylserin, essentiell. L160 ist dagegen an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt und eventuell für die Interaktion mit einem noch zu identifizierenden, putativen Lipid-Kofaktor relevant. **Links:** ist eine Aminosäure (z.B. L160) mutiert, führt dies aufgrund der Beseitigung einer spezifischen Interaktion zu einer Reduktion der RasG12V-vermittelten Raf-Aktivierung. Die Mutation L160A hat folglich einen inhibierenden Effekt auf die Raf-Aktivierung. **Mitte:** bei Stimulation von Raf L160A durch QI-RasG12V.3S kommt es aufgrund einer suboptimalen, räumlichen Orientierung/Distanz dieses artifiziiellen Ras-Konstruktes und infolgedessen auch des Raf-Proteins zu einer allgemeinen Beeinträchtigung des Aktivierungsprozesses. Das Raf L160A-Konstrukt zeigt hier im Vergleich zur Stimulation mit RasG12V deshalb einen deutlich stärker inhibierenden Effekt, weil neben der völligen Aufhebung der durch L160 vermittelten Wechselwirkung auch die durch K144 und R164 vermittelten Interaktionen zumindest teilweise beeinträchtigt werden, m.a.W.: die durch die Aminosäuren K144 und R164 vermittelten Interaktionen werden unabhängig von L160 beeinträchtigt. **Rechts:** der bei Stimulation durch QI-RasG12V.3S zu beobachtende, systematisch stärker inhibierende Effekt der Raf-Mutante L160A kann durch eine partielle Wiederherstellung der natürlichen, optimalen Orientierung/Distanz des Ras-Proteins zur Plasmamembran aufgrund einer zweiten Insertion, vermittelt durch die zusätzlichen C-terminalen Lipidmodifikationen, zumindest teilweise kompensiert werden. Eine äquivalente Begründung gilt auch für die Raf-Mutanten K144A und R164A. Die Raf-Mutanten S177A, T182A und M183A hingegen führen unabhängig von dem zur Stimulation eingesetzten Ras-Konstrukt zu annähernd gleichen Aktivierungen bzw. inhibierenden Effekten, da diese gemäß Daub *et al.* zu einem Ras-Bindungsepitop gehören, dessen Wechselwirkungen mit dem Ras-Protein unabhängig von jedweden Membranfaktoren oder -komponenten sind.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde als eine weitere Raf-Mutante das als c-Raf(Δ C1) bezeichnete Konstrukt untersucht, das durch eine vollständige Deletion der C1-Domäne charakterisiert ist (**Abbildung 3.10**). Das c-Raf(Δ C1)-Konstrukt zeichnet sich durch eine relativ hohe Basalaktivität aus, welche etwa 50 % der RasG12V-vermittelten Raf(Wt)-Aktivierung beträgt (**Abbildung 3.11**). Obwohl Daub *et al.* mehrere auf der Oberfläche der c-Raf C1-Domäne lokalisierte, funktionelle Epitope mit zum Teil inhibierenden, aber auch aktivierenden Effekten identifizieren konnten (**Abbildung 3.6**), führt die Summe all dieser Effekte, wie die Aktivierung durch c-Raf(Δ C1) zeigt, letztlich zu einer basalen Aktivierung. Die erhöhte Basalaktivität unterstreicht damit die Bedeutung der C1-Domäne für die negative Regulation (Autoregulation) der Raf-Kinase (Cutler, Jr. *et al.* 1998). Scheinbar bewirkt eine Deletion der C1-Domäne eine zumindest partielle, Ras-unabhängige Stimulation der Ras/Raf/MEK/ERK- bzw. einer anderen Signalkaskade. Ungeachtet dessen kann c-Raf(Δ C1) durch Koexpression von konstitutiv aktivem RasG12V über die Basalaktivität hinaus auf ein Niveau aktiviert werden, daß dem durch RasG12V-vermitteltem Niveau der Raf(Wt)-Aktivierung nahezu äquivalent ist. Entgegen diesen Resultaten können andere Experimentatoren bei der Untersuchung eines Raf-Konstruktes mit Substitutionen der Cysteine 165 und 168 der C1-Domäne gegen Serine (CRM-Raf) keine erhöhte, sondern im Gegenteil eine erniedrigte Basalaktivität feststellen (Pumiglia *et al.* 1995). Dennoch ist dieses Konstrukt durch konstitutiv aktives Ras oder durch Src aktivierbar. Spätere Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe mit einem Raf-Konstrukt, welches eine Deletion der Aminosäuren 133 bis 180 (Raf-d4) aufweist, zeigt zwar im Vergleich zu Raf(Wt) ebenfalls eine deutlich reduzierte Basalaktivität; das Konstrukt läßt sich jedoch nur durch Src, nicht jedoch durch onkogenes Ras aktivieren (Chow *et al.* 1995). Sowohl CRM-Raf als auch Raf-d4 wurden für die Experimente gewählt, weil sie beide Raf C1-Mutanten repräsentieren, bei denen gleichermaßen die potentielle Funktion der Raf C1-Domäne gestört ist; zum einen durch die Substitution der für die Strukturgebung der C1-Domäne wichtigen Cysteine zu Serin in den Positionen 165 und 168 von Raf und zum anderen durch die (nahezu) komplette Deletion der C1-Domäne. Aus struktureller Sicht kann die Mutation der für die Zn²⁺-Komplexierung relevanten Cysteine der C1-Domäne jedoch eine Fehlfaltung der C1-Domäne bewirken, die sich sehr wahrscheinlich auch auf weitere Bereiche der Raf-Kinase, beispielsweise der für die Ras/Raf-Interaktion essentiellen Raf RBD, negativ auswirken. Dieser Aspekt sollte auch bei der Beurteilung weiterer Arbeiten, mit zum Teil widersprüchlichen Resultaten berücksichtigt werden (Bruder *et al.* 1992; Chow *et al.* 1995; Dent *et al.* 1995b; Hu *et al.* 1995; Kikuchi und Williams 1994; Luo *et al.* 1997; McPherson *et al.* 1999; Okada *et al.* 1999; Pumiglia *et al.*

1995; Roy *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1993). In dieser Hinsicht wäre auch zu dem als Raf-d4 bezeichneten Konstrukt kritisch anzumerken, daß es sich hier im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Raf(Δ C1)-Konstrukt mit einer Deletion der Aminosäuren 139 bis 184 um ein Raf-Protein mit einer weit weniger exakten Deletion der C1-Domäne handelt. Im Falle des Raf-d4-Konstruktes wurden zusätzliche sechs N-terminal der C1-Domäne lokalisierte Aminosäuren deletiert, während die vier C-terminalen Aminosäuren der C1-Domäne einschließlich des Cysteins 184 nicht entfernt wurden (vgl. **Abbildung 1.12**). Eigene vorbereitende und in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigte experimentelle Resultate zeigen, daß das c-Raf(Δ C1)-Konstrukt im Vergleich zu c-Raf(Wt) sehr sensibel auf die jeweiligen in den Versuchen eingesetzten Zelldichten reagiert. Bei nahezu vollständiger Konfluenz der ausplattierten Zellen zu Beginn der Experimente ist die Transaktivierung sowohl durch c-Raf(Wt) als auch durch c-Raf(Δ C1) sehr gering. Kontaktinhibition zwischen den Zellen vorzeitig abgeschaltet. Bei sehr geringer Dichte der ausplattierten Zellen steigt allgemein die im Luciferase-Reporter-Gen-Assay zu messende Aktivität; die Basalaktivität des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes steigt jedoch im Vergleich zu der RasG12V-vermittelten Raf(Wt)- und c-Raf(Δ C1)-Aktivierung überproportional und kann im Extremfall sogar nahezu 100 % der jeweiligen RasG12V-induzierten Aktivität der beiden Raf-Konstrukte betragen. Dieses Phänomen ist zwar nicht befriedigend erklärbar und bedarf weiterer Untersuchungen, zeigt jedoch, daß der c-Raf C1-Domäne eine besondere Bedeutung hinsichtlich der biologischen Funktion bzw. der Regulation der Aktivierung der Raf-Kinase zukommt.

Die Untersuchung der Bindung von c-Raf(Wt) bzw. c-Raf(Δ C1) an RasG12V zeigt, daß die Deletion der C1-Domäne eine deutliche Verringerung der Bindungsaffinität zwischen der Raf-Kinase und dem RasG12V-Protein auf etwa 26 % bewirkt, auch wenn dieses Resultat nicht streng äquivalent zu einer *in vitro* gemessenen Abnahme der Bindungsenergie im Sinne eines K_D -Wertes ist (**Abbildung 3.12**). Die Deletion der C1-Domäne führt u.a. zur Beseitigung des von Daub *et al.* identifizierten potentiellen zweiten Ras-Bindungsepitops, bestehend aus den Aminosäuren S177, T182 und M183 (**Abbildung 3.6**), was die Abnahme der Ras/Raf-Interaktion zumindest teilweise erklären könnte. Pumiglia *et al.* zeigen dagegen, daß sowohl Raf-d4 als auch CRM-Raf an Ras binden und schlußfolgern, daß die c-Raf C1-Domäne für die Ras/Raf-Interaktion nicht essentiell ist; ganz im Gegensatz zu den in der **Abbildung 3.12** gezeigten Ergebnissen und beispielsweise den Resultaten von Luo *et al.* (1997). Dazu wäre zu bemerken, daß eine Interaktion zwischen Ras und der Raf C1-Domäne bei einer von vielen Autoren prognostizierten geringen Bindungsaffinität durch die von den Experimentatoren gewählte Methode der Kopräzipitation zweier interagierender Proteine auf-

grund zu geringer Sensitivität der Methode nicht nachzuweisen wäre. Des Weiteren ist bei genauerer Betrachtung der von Pumiglia *et al.* erzielten Resultate für CRM-Raf und noch deutlicher für Raf-d4 eine geringe aber signifikante Abnahme der Interaktion festzustellen. Ungeachtet dessen bleibt die Kritik hinsichtlich der durch Verwendung von Konstrukten wie CRM-Raf und Raf-d4 erzielten Ergebnisse aus den oben genannten Gründen bestehen.

Weitere vergleichende Untersuchungen von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) zeigen, daß beide Raf-Proteine auch durch das bereits beschriebene QI-RasG12V.3C-Konstrukt aktivierbar sind, welches sich durch eine zweifache, C- und N-terminale Membraninsertion auszeichnet (**Abbildung 3.9**). Dabei ist der Grad der Aktivierung für beide Raf-Proteine nahezu gleich und ist des Weiteren deutlich stärker als deren Aktivierung durch QI-RasG12V.3S (**Abbildung 3.13**). Eine Begründung hierfür könnte darin bestehen, daß die aufgrund der unveränderten C-terminalen CaaX-Sequenz dieses Ras-Konstruktes stattfindenden Lipidmodifikationen des C-Terminus zu einer günstigeren Orientierung und/oder Distanz des Ras-Proteins zur Plasmamembran führen und es so zu einem Arrangement an der Plasmamembran, vergleichbar dem für RasG12V zu findenden kommt (**Abbildung 3.2** und **Abbildung 4.2**). Interessanterweise verhalten sich die dargestellten Resultate genau entgegengesetzt zu den von Hart *et al.* publizierten Ergebnissen. Die Aktivierung von Raf durch zweifach, d.h. C- und N-terminal in der Plasmamembran inseriertes, onkogenes RasQ61L ist gemäß den Angaben der Autoren drei- bis viermal geringer als durch einfach, mittels einer N-terminalen Transmembran-Domäne inseriertes RasQ61L (Hart und Donoghue 1997). Die Autoren vermuten, daß die doppelte Membraninsertion zu einer Induzierung konformationeller Spannungen in dem Ras-Molekül führt, welche eine Verringerung der Fähigkeit dieses artifiziellen Ras-Proteins zur Effektor-Aktivierung nach sich zieht.

Als Fazit kann bis hierher festgehalten werden, daß sowohl c-Raf(Wt) als auch diverse Raf-Mutanten mit aktivierenden oder inhibierenden Mutationen der C1-Domäne oder kompletter Deletion der C1-Domäne (c-Raf(Δ C1)) durch QI-RasG12V.3S in annähernd äquivalenter Weise aktiviert werden können. Die Resultate unterstützen daher nicht eine in der Literatur kontrovers diskutierte These, wonach eine Interaktion der Lipidmodifikationen des Ras-Proteins, speziell der Farnesylgruppe mit der C1-Domäne der Raf-Kinase für dessen Aktivierung essentiell ist (Hu *et al.* 1995; Hu *et al.* 1997; Luo *et al.* 1997; Tamada *et al.* 1997; Williams *et al.* 2000). Dies wird besonders durch die Tatsache unterstrichen, daß ein Raf-Konstrukt ohne C1-Domäne (c-Raf(Δ C1)) eindeutig durch ein Ras-Protein ohne C-terminale

Lipidmodifikationen und damit ohne Farnesylgruppe (QI-RasG12V.3S) in signifikantem Maß aktiviert werden kann (vgl. **Abbildung 3.13**).

Vergleichende Untersuchungen der Ras/Raf-Interaktion zur Ermittlung eines potentiellen Beitrags der Ras-Lipidmodifikationen zur Ras/Raf-Bindung unter Verwendung von lipidmodifiziertem und nicht modifiziertem Ras-Protein sind durch das Two-Hybrid-System in *S. cerevisiae in vivo* nicht möglich. Im Gegensatz zu dem nicht lipidmodifizierten Ras-Protein bewirkt die Farnesylgruppe des posttranslational modifizierten Ras-Proteins dessen präferentielle Rekrutierung an die Plasmamembran und verhindert weitestgehend dessen Translokation in den Zellkern, was jedoch für die Durchführung von Two-Hybrid-Experimenten unabdingbar ist. Daher wurden Bindungsstudien *in vitro* mit Hilfe der stopped-flow-Methode durchgeführt (B. Bader, unveröffentlichte Daten). Dazu wurde ein chimäres Fusionsprotein, bestehend aus der RBD/C1-Region der Raf-Kinase mit N-terminaler Fusion von MBP und C-terminaler Fusion eines der Aufreinigung dienenden His₆-tags, in *E. coli* exprimiert. Dieses wurde zusammen mit ebenfalls bakteriell exprimiertem, unfarnesyliertem RasG12V bzw. nach Aufreinigung *in vitro* farnesyliertem RasG12V in stopped-flow-Experimenten eingesetzt. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die für die beiden verschiedenen Proteinkombinationen ermittelten kinetischen Parameter annähernd identisch sind. So beträgt die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{on}) für farnesyliertes bzw. nicht farnesyliertes RasG12V $3,40 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bzw. $3,48 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{off}) wurde für beide Ras-Proteine mit $0,5 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die daraus ermittelten Dissoziationskonstanten (K_D) sind nahezu identisch und betragen für farnesyliertes RasG12V 147 nM und für nicht farnesyliertes RasG12V 144 nM. Dagegen konnten Williams *et al.* mittels Fluoreszenzspektroskopie eine Beteiligung der Farnesylgruppe des Ras-Proteins an der Ras/Raf-Interaktion oder vielmehr der Ras/Raf C1-Interaktion feststellen. Gemäß den Autoren bleibt dabei jedoch offen, ob dies eine direkte Interaktion ist, oder ob die Farnesylgruppe erst durch Kooperation mit einem spezifischen Bereich des Ras-Proteins ein mit der Raf C1-Domäne interagierendes Bindungsepitop auf der Seite des Ras-Proteins strukturiert. Hier muß jedoch kritisch angemerkt werden, daß Williams *et al.* bei ihren Experimenten zum einen *in vitro* farnesyliertes *full length* RasG12V mit den Mutationen C118S, C181S und C184S (was sicherstellt, daß ausschließlich das Cystein 186 farnesyliert wird) und zum anderen C-terminal verkürztes und daher nicht farnesyliertes RasG12V₍₁₋₁₆₆₎ verwenden. Falls die letzten etwa 20 C-terminalen, hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Bindung der Raf-Kinase bzw. deren C1-Domäne wenig untersuchten Aminosäuren des Ras-Proteins bei der Ras/Raf-Interaktion involviert sind, könnten sich die von Williams *et al.* erhaltenen Resultate als

Artefakte herausstellen. Die durchgehende Verwendung von nicht *in vitro* farnesyliertem *full length* RasG12V-C118S/C181S/C184S statt von verkürztem RasG12V₍₁₋₁₆₆₎ wäre für die Experimente von Williams *et al.* angezeigt gewesen. Ein zweiter kritischer, die Arbeiten von Williams *et al.* betreffender Aspekt ist, daß die C1-Domäne von Raf(Wt) mit deutlich höherer Affinität an nicht farnesyliertes Ras bindet als die C1-Domäne von Raf L149T/F151Q. Im Falle einer Interaktion zwischen den Aminosäureresten L149 und F151 der c-Raf C1-Domäne mit der Ras-Farnesylgruppe, müßten jedoch beide Varianten der C1-Domäne mit gleicher und verringerter Affinität an das unmodifizierte Ras binden, da in beiden Fällen die postulierte Interaktion bereits durch das Fehlen der Farnesylierung aufgehoben ist.

Die 18 C-terminalen, aufgrund ihrer Flexibilität in den verschiedenen Kristallstrukturen des Ras-Proteins nicht enthaltenen Aminosäuren (de Vos *et al.* 1988; Pai *et al.* 1989) lassen vermuten, daß der C-Terminus eine α -helikale Region bildet, die aus der globulären, katalytischen Region des Ras-Proteins herausragt. Diese α -Helix ist wahrscheinlich als natürlicher *linker* für die Gewährleistung einer bestimmten Distanz der katalytischen Domäne zur Plasmamembran essentiell. Im Falle des artifiziellen QI-RasG12V.3S-Konstruktes übernimmt der zwischen der m1-Domäne und der katalytischen Region inserierte *linker* aus 24 Aminosäuren (*GSS-repeats*) diese Funktion (**Abbildung 3.1** und **3.2**). Die Analyse der Konformationsenergie der letzten 18 C-terminalen Aminosäuren des Ras-Proteins haben gezeigt, daß dieser Bereich wahrscheinlich eine Helix-Turn-Helix- bzw. eine Haarnadel-Helix-Struktur ausbildet. Dadurch würden der N- und C-Terminus des Ras-Proteins in unmittelbare räumliche Nähe kommen, was eine Interaktion des N- und C-Terminus möglich erscheinen läßt (Brandt-Rauf *et al.* 1990). Hart *et al.* schließen eine solche Interaktion jedoch aus und folgen der in dieser Arbeit dargestellten Argumentation, nach der eine N-terminale, artifizielle Membraninsertion des Ras-Proteins dessen suboptimale Orientierung/Distanz zur Plasmamembran und/oder anderen vor- und nachgeschalteten Proteinen/Faktoren der Signalkaskade bewirkt oder auch dessen Zugänglichkeit beeinträchtigt. Dennoch scheint eine die letzten etwa 20 Aminosäuren umfassende Region des Ras-Proteins, die auch als HVR (**hypervariable Region**) bezeichnet wird, für die Ras-Funktion von Bedeutung zu sein. Sie spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der zellulären Verteilung, der Mikrolokalisierung und der lateralen Dynamik innerhalb der Plasmamembran der verschiedenen Ras-Isoformen (Booden *et al.* 2000; Prior *et al.* 2001). Sollte dies zutreffen, wären die weiter oben dargestellten von Williams *et al.* publizierten *in vitro*-Resultate um so kritischer zu bewerten. In diesem Zusammenhang ist auch die Art der posttranslationalen Lipidmodifikationen und die Kombination verschiedener solcher Modifikationen von Bedeutung. So konnte eine Arbeitsgruppe beispielsweise zeigen, daß die artifi-

zielle, N-terminale Myristoylierung von Ras zu einer Transformation von NIH3T3-Zellen *in vivo* führt und dies ungeachtet, ob hierfür onkogenes Ras oder Ras(Wt) verwendet wurde (Buss *et al.* 1989). Dies steht im krassen Gegensatz zu Resultaten von Hart *et al.*, welche bei Verwendung von ebenfalls nicht onkogenem, artifiziellem Ras mit N-terminaler Transmembran-Domäne keine Transformation *in vivo* feststellen konnten (Hart und Donoghue 1997). Vielleicht ist dieser Widerspruch dadurch zu erklären, daß die Myristoylierung des Ras-Proteins zu dessen falscher zellulärer bzw. membranaler Lokalisation führt, welche jedoch durch eine Transmembran-Domäne nicht vermittelt werden kann. Es muß außerdem kritisch angemerkt werden, daß Buss *et al.* und teilweise auch Hart *et al.* zur Verhinderung der posttranslationalen Palmytylierung Ras-Konstrukte mit einer Mutation des Cysteins 186 zu Serin (C186S) einsetzen. Die Mutation des Cysteins 186 verhindert dadurch die als Voraussetzung für die spätere Palmytylierung der Cysteine 184 und 181 geltende Farnesylierung des Cysteins 186. Anderen Autoren zufolge ist jedoch eine Palmytylierung auch ohne vorhergehende Prenylierung möglich (Booden *et al.* 1999; Cadwallader *et al.* 1994).

Auch wenn man davon ausgeht, daß die Lipidmodifikationen des Ras-Proteins primär der Membranverankerung dienen und für eine Interaktion mit der Raf-Kinase, speziell deren C1-Domäne, nicht essentiell sind, so könnte jedoch eine Beteiligung von Aminosäuren der C-terminalen HVR an einer solchen Wechselwirkung möglich und für die Raf-Aktivierung essentiell sein. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden neben QI-RasG12V.3S drei weitere, C-terminal unterschiedlich stark verkürzte Ras-Konstrukte (QI-RasG12V.181, QI-RasG12V.177 und QI-RasG12V.166, **Abbildung 3.14**) in den Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt und deren Fähigkeit zur Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) ermittelt. Die Resultate zeigen, daß die verschiedenen Ras-Konstrukte zwar zu einer unterschiedlich starken Aktivierung führen, welche jeweils verglichen mit der durch RasG12V-vermittelten zwischen 75 % und 130 % beträgt, die c-Raf(Wt)- und c-Raf(Δ C1)-Aktivierungen im Vergleich jedoch keine spezifischen und signifikanten Unterschiede erkennen lassen (**Abbildung 3.15**). Daher kann gefolgert werden, daß die letzten 20 C-terminalen Aminosäuren des Ras-Proteins für die Raf-Aktivierung, eventuell durch deren putative Interaktion mit der C1-Domäne der Raf-Kinase vermittelt, nicht relevant sind. Die unterschiedlichen Aktivierungs-Niveaus sind höchstwahrscheinlich auf Unterschiede in der jeweiligen Expressionsstärke zurückzuführen. Da inhibierende bzw. aktivierende Effekte im Luciferase-Reportergen-Assay fast ausnahmslos mit einer Abnahme bzw. Verstärkung der Ras/Raf-Bindung korrelieren, wurde aufgrund der ausgebliebenen Unterschiede der verschie-

denen verkürzten Ras-Konstrukte hinsichtlich der Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) auf eine Untersuchung dieser Ras-Proteine im Two-Hybrid-System verzichtet.

Als Fazit soll für diesen Teil der vorliegenden Arbeit zusammenfassend festgestellt werden, daß die durch Ras-vermittelte Aktivierung der Raf-Kinase sowie sämtlicher Raf-Mutanten und der durch diese vermittelten inhibierenden und aktivierenden Effekte weitestgehend unabhängig von den Lipidmodifikationen des Ras-Proteins erzielt werden können. Zusammengekommen mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen kann darüber hinaus festgestellt werden, daß die primäre Funktion der Ras-Lipidmodifikationen in der Membraninserierung liegt und damit für die Rekrutierung der Raf-Kinase an die Plasmamembran von Bedeutung ist. Die Art der Ras-Modifikationen scheint jedoch Einfluß auf die allgemeine Verteilung und Mikrolokalisierung des Proteins zu haben und dessen Dynamik in der Plasmamembran zu beeinflussen. Eine zusätzliche Beteiligung der HVR des Ras-Proteins erscheint möglich; in der vorliegenden Arbeit konnten hierfür jedoch keine Anhaltspunkte gefunden werden. Der einzige, signifikante Einfluß der Ras-Lipidmodifikationen ist in bezug auf die Aktivierung der c-Raf C1-Mutanten 143A, 144A und 160A zu beobachten. Dieser Effekt scheint jedoch von indirekter Natur zu sein und ist wahrscheinlich auf eine durch das artifizielle QI-RasG12V-Konstrukt bedingte, veränderte und daher suboptimale Orientierung der Raf-Kinase hinsichtlich der Plasmamembran und/oder ihr vor- bzw. nachgeschalteter Komponenten der Signalkaskade zurückzuführen. In den meisten experimentellen Arbeiten, so auch in der vorliegenden, wird zur Untersuchung des Raf-Aktivierungsprozesses H-Ras und davon abgeleitete Konstrukte eingesetzt, obwohl K-Ras nachweislich einen besseren Aktivator der Raf-Kinase darstellt. Die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen dieser beiden Ras-Isoformen und die sich daraus ergebenden, weiter oben diskutierten Konsequenzen, insbesondere bezogen auf die Mikrolokalisierung, sollten bei der andauernden Diskussion über den Raf-Aktivierungsprozeß und insbesondere hinsichtlich der Interpretation von *in vitro*-Resultaten nicht außer acht gelassen werden.

4.2 Identifizierung eines mit der c-Raf C1-Domäne interagierenden Ras-Epitops

Die Frage nach einem weiteren, neben der Effektor-Region, mit der Raf-Kinase interagierenden Ras-Epitops soll durch eine ausgedehnte Mutagenese oberflächenexponierter Aminosäurereste des Ras-Proteins geklärt werden, wobei sich die Untersuchungen auf die Aktivierungs-Region konzentrieren. Dabei sollen *in vivo* sowohl Bindung als auch Aktivierung analysiert werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob das von Daub *et al.* charakterisierte potentielle Ras-Bindungsepitop S177/T182/M183 an einer solchen Interaktion beteiligt ist.

Bereits weit zurückliegende Experimente mit chimären Ras/Rap-Konstrukten haben gezeigt, daß die Aktivierungs-Region von Ras respektive Rap für die jeweilige vollständige biologische Funktion von Bedeutung ist. Solche Untersuchungen zeigten, daß die Fähigkeit chimärer Ras/Rap-Proteine zur Induktion der zellulären Transformation maßgeblich durch die Aminosäuren der Positionen 21 bis 60 von Ras bedingt ist. Da die Aminosäure-Sequenz im Bereich 18 bis 20, 32 bis 44 und 55 bis 60 zwischen Ras und Rap identisch ist, wurde gefolgert, daß die für die transformierende Aktivität von Ras essentiellen Aminosäuren in den zwischen Ras und Rap divergierenden, auch als Aktivierungs-Region bezeichneten Bereichen 21 bis 31 und 45 bis 54 lokalisiert sind (Zhang *et al.* 1990). In weitergehenden Untersuchungen konnte demonstriert werden, daß „Rap zu Ras-Mutationen“ in den Positionen 26, 27, 30, 31 und 45 des Rap-Proteins zu artifiziellen Rap-Konstrukten führen, die sowohl in Säuger- als auch in Hefe-Zellen Ras-Funktionen zeigen (Marshall *et al.* 1991). Die Autoren postulieren, daß die Aminosäuren der Positionen 26, 27 und 45 für die Effektor-Aktivierung von Bedeutung sind, während die Aminosäuren 30 und 31 kritisch für die Protein/Protein-Interaktion sind. Für den umgekehrten Fall haben computergestützte Modellierungen gezeigt, daß Aminosäure-Substitutionen an diesen Positionen des Rap-Proteins gegen die entsprechenden Ras-homologen Aminosäurereste zu einer Struktur führen, welche hinsichtlich der Konformation eine stärkere Identität gegenüber dem Ras- denn dem Rap-Protein aufweist (Chen *et al.* 1996). Spätere Arbeiten konnten durch Röntgenstrukturanalyse, biochemische Untersuchungen und *in vivo*-Experimente zeigen, daß hauptsächlich die Aminosäuren Asp30 und Glu31 bzw. Glu30 und Lys31 für die unterschiedlichen Effektor-Affinitäten von Ras respektive Rap verantwortlich sind; vor allem die Mutation K31E in Rap erzeugt durch die Ladungsumkehr in dieser Position eine höhere Komplementarität zur Raf RBD und ermöglicht eine bevorzugte Interaktion zwischen der sauren Aminosäure Glu31 und der basischen Amino-

säure Lys84 der Raf RBD (Nassar *et al.* 1996). Während die Kerneffektor-Region (Aminosäuren 32 bis 40) für die molekulare Erkennung verantwortlich ist, vermitteln Aminosäurereste außerhalb dieser Region die Spezifität der Interaktion. Die Rap-Doppelmutante E30D/K31E führt jedoch nicht zu einer vollständigen Transformation von Rap1A zu Ras. Dies legt nahe, daß weitere Aminosäuren der Aktivierungs-Region für die Vermittlung der Effektorspezifität relevant sind. Die Identifizierung solcher Aminosäurereste war bereits Ziel zahlreicher Studien der Vergangenheit. So wurden mit wenigen Ausnahmen sämtliche Aminosäuren des Bereichs 26 bis 31 und 40 bis 53 mit den unterschiedlichsten Methoden untersucht (Akasaka *et al.* 1996; Chen *et al.* 1996; Chuang *et al.* 1994; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1991; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995; Hu *et al.* 1995; Hu *et al.* 1997; Marshall *et al.* 1991; Nassar *et al.* 1996; Nur-E-Kamal *et al.* 1992; Shinkai *et al.* 1996; Shirouzu *et al.* 1992; Shirouzu *et al.* 1994; Tamada *et al.* 1997). Die Resultate sind jedoch sehr heterogen, bisweilen sogar widersprüchlich. Dies liegt unter anderem daran, daß durch verschiedene Methoden erzielte Daten miteinander verglichen werden (Chuang *et al.* 1994; Shirouzu *et al.* 1994). Bei Resultaten aus *in vivo*-Experimenten, vor allem aus einem Zeitraum in dem Raf als Ras-Effektor noch nicht identifiziert war, handelt es sich ausschließlich um Beobachtungen morphologischer Veränderungen von Zellen wie beispielsweise dem Neuritenwachstum bei PC12-Zellen, der Focus-Bildung bei NIH3T3-Zellen und der Fähigkeit von NIH3T3-Zellen zum Wachstum in Soft-Agar. In späteren Experimenten wird vor allem die direkte Phosphorylierung des Effektors bzw. seiner nachgeschalteten Signalproteine gemessen (Kinase-Aktivitäts-Assays) bzw. Reporter-Gen-Assays eingesetzt. Die einzige Übereinstimmung unter den diversen Untersuchungen ist hinsichtlich der Bedeutung der Aminosäure 45 des Ras-respektive Rap-Proteins festzustellen. So zeigen alle Studien, daß die Mutation V45E in Ras zu einer starken Inhibition der Ras-vermittelten Aktivierung bzw. zellulären Transformation führt. Daher sollten diese Resultate zunächst in Hinblick auf die Transaktivierung des MAPK-Signalweges durch c-Raf(Wt) in einem etablierten und sensitiven Luciferase-Reporter-Gen-Assay gezielt verifiziert werden.

Abbildung 3.18 A zeigt, daß die Substitution des hydrophoben Valins 45 durch Glutaminsäure (V45E) in onkogenem Ras, verglichen mit RasG12V eine um ca. 80 % geringere Transaktivierung durch c-Raf(Wt) bewirkt, was die zumeist durch unterschiedlich gestaltete Kinase-Assays erzielten Resultate anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995; Hu *et al.* 1995; Shinkai *et al.* 1996; Tamada *et al.* 1997). Auch die Substitution des Valins 45 durch die basische Aminosäure Arginin (V45R) bzw. hydrophobe Aminosäure Tryptophan (V45W) führt zu einer vergleichbar starken Inhibition auf etwa 12 % der

RasG12V-induzierten Aktivierung von Raf(Wt). Interessanterweise konnten andere Experimentatoren für die Mutation V45K (ebenfalls eine Substitution durch eine basische Aminosäure wie im Fall von V45R) keine Verminderung des Neuritenwachstums bei PC12-Zellen beobachten (Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995). In den Ras-Mutanten V45E, V45R und V45W wurde die kleine, hydrophobe Seitenkette des Valins 45 jeweils durch eine sterisch anspruchsvollere Aminosäure sauren, basischen bzw. hydrophoben Charakters substituiert, was nahe legt, daß die beobachteten inhibitorischen Effekte vornehmlich durch sterische Hinderung als durch elektrostatische Abstoßung hervorgerufen werden. Da aber selbst eine moderate Aminosäure-Substitution des Valins 45 durch ein ebenfalls hydrophobes Alanin eine relativ starke Inhibition auf ca. 36 % der RasG12V-induzierten c-Raf(Wt)-Aktivierung bewirkt, scheint für die Aufrechterhaltung der „normalen“ biologischen Funktion spezifisch ein Valin an der Position 45 unabdingbar zu sein. Fujita *et al.* können für die V45A-Mutation keine Beeinträchtigung des Neuritenwachstums bei PC12-Zellen feststellen. In diesem System können die Autoren ausschließlich für den Austausch des Valins 45 gegen Glutaminsäure einen solchen Effekt beobachten (Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995). In der Literatur lassen sich zahlreiche Publikationen finden, in denen über die Rolle diverser Aminosäuren der Aktivierungs-Region spekuliert wird. So sind einige Autoren der Ansicht, daß das Valin 45 (und auch das Glycin 48) einer erweiterten Effektor-Region zugerechnet werden muß (Fujita-Yoshigaki *et al.* 1991). Die Strukturaufklärung des Raf RBD/Rap1A-Komplexes hat jedoch gezeigt, daß diese Aminosäurereste außerhalb des Interaktionsbereichs zwischen Raf RBD und Rap1A respektive Ras lokalisiert sind (Block *et al.* 1996; Nassar *et al.* 1995). Andere Arbeiten konnten zeigen, daß Effektor-Mutanten die Interaktion mit der RBD, nicht jedoch mit der C1-Domäne der Raf-Kinase beeinträchtigen. Umgekehrt führen die Mutationen N26G und V45E in der Aktivierungs-Region zu einer Zerstörung der Wechselwirkung dieser Ras-Mutanten mit der Raf C1-Domäne, während die Interaktion mit der Raf RBD unberührt bleibt. Die Autoren folgern daraus, daß die Aminosäuren 26 und 45 der Aktivierungs-Region einem zweiten, von der Effektor-Region verschiedenen und unabhängigen Raf-Bindungssepitop zuzurechnen sind (Hu *et al.* 1995; Hu *et al.* 1997). Da die Aminosäuren 26 und 45 außerhalb der *switch I*- und *switch II*-Region lokalisiert sind, ist die direkte Interaktion zwischen Ras und der Raf C1-Domäne unabhängig vom nucleotidgebundenen Zustand des Ras-Proteins; die C-terminalen Lipidmodifikationen der GTPase sind den Autoren zufolge jedoch für eine solche Interaktion essentiell. Die Kontroverse über die Bedeutung der Ras-Lipidmodifikationen für den Raf-Aktivierungsprozeß wurde bereits unter 3.1 und 4.1 ausführlich behandelt und soll hier nicht detaillierter diskutiert werden.

Auch seitens der Raf-Kinase belegen zahlreiche Studien, daß die C1-Domäne bzw. bestimmte Aminosäuren oder Epitope derselben neben der Raf RBD eine zweite, unabhängige Ras-Bindungsdomäne darstellen (Brtnva *et al.* 1995; Chow *et al.* 1995; Daub *et al.* 1998; Drugan *et al.* 1996; Luo *et al.* 1997; Roy *et al.* 1997; Williams *et al.* 2000). Welche Aminosäuren der Raf C1-Domäne an einer solchen Interaktion beteiligt sind und ob diese Bindung von hoher oder geringer Affinität ist, wird jedoch kontrovers diskutiert und soll später eingehender behandelt werden.

Die Annahme einer Wechselwirkung von Aminosäuren der Aktivierungs-Region und speziell des Valins 45 mit der c-Raf C1-Domäne erscheint aufgrund der bisherigen Resultate plausibel und sollte zunächst auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde das c-Raf(Δ C1)-Konstrukt herangezogen, dessen biologische Funktionalität und Aktivierbarkeit bereits unter 3.1.3 demonstriert wurde. Die hypothetische Interaktion des in der Aktivierungs-Region lokalisierten Valins 45 mit der Raf C1-Domäne wird bei Substitution dieser Aminosäure durch andere, speziell durch sterisch anspruchsvolle Aminosäurereste stark gestört. Bei Aktivierung des c-Raf(Δ C1)-Konstruktes durch die verschiedenen RasG12V.V45-Mutanten, sollten die durch die sterische Hinderung hervorgerufenen Effekte aufgrund der deletierten C1-Domäne ausbleiben oder zumindest nur in abgeschwächter Form beobachtbar sein (vgl. Arbeitshypothese in **Abbildung 3.21**). Die durch die verschiedenen RasG12V.V45-Mutanten im Luciferase-Reporter-Gen-Assay vermittelte Transaktivierung durch c-Raf(Δ C1) ist in **Abbildung 3.18 B** dargestellt. Die Resultate zeigen, verglichen mit den Daten zur Transaktivierung durch c-Raf(Wt) (vgl. **Abbildung 3.18 A**), stark verringerte inhibitorische Effekte, welche für V45R, V45W und V45A ca. 33 % und für V45E nur etwa 8 % betragen. Damit führt die Deletion der C1-Domäne zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der durch die V45E-Mutation bedingten Inhibition. Eine solche Diskriminierung von Ras-Mutanten zwischen dem c-Raf(Wt)- und dem c-Raf(Δ C1)-Konstrukt wird in folgendem als eindeutiges Indiz für eine Beteiligung der entsprechenden Aminosäuren an der Interaktion mit der C1-Domäne der Raf-Kinase gewertet.

Wie bereits vorausgehend erwähnt, wird im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen der c-Raf C1-Domäne und der Ras-Aktivierungs-Region eine Beteiligung der posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins diskutiert (Hu *et al.* 1995; Kikuchi und Williams 1994; Luo *et al.* 1997; Williams *et al.* 2000). Aus diesem Grund soll der durch die V45E-Substitution verursachte inhibitorische Effekt im Kontext des artifiziellen, N-terminal über eine Transmembranhelix in der Plasmamembran inserierten QI-RasG12V.3S-Konstruktes,

dessen biologische Funktionalität und Potenz zur Raf-Aktivierung bereits unter 3.1.1.1 und 3.1.1.2 demonstriert wurde, analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die V45E-Mutation in das QI-RasG12V.3S-Konstrukt eingeführt und dessen Fähigkeit zur Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) in einem Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Die QI-RasG12V.V45E.3S-vermittelte Transaktivierung durch c-Raf(Wt) ist im Vergleich zu der durch QI-RasG12V.3S induzierten um ca. 75 % geringer und damit vergleichbar mit der ca. 80 %igen Inhibition, die durch RasG12V45E erzielt wird (vgl. **Abbildung 3.19 A** und **Abbildung 3.18 A**). Die Aktivierung von c-Raf(Δ C1) durch QI-RasG12V.V45E.3S führt verglichen mit der Stimulation durch QI-RasG12V.3S zu einer nur geringen und darüber hinaus nicht signifikanten Inhibition von ca. 20 %, was dem durch das RasG12V.V45E-Konstrukt vermittelten inhibierenden Effekt von etwa 10 % sehr nahe kommt (vgl. **Abbildung 3.19 B** und **Abbildung 3.18 B**). Der durch die V45E-Substitution verursachte inhibierende Effekt ist also unabhängig von der Art der Membraninsertion des Ras-Proteins; d.h. die Diskriminierung der V45E-Mutante zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1) ist unabhängig von den Lipidmodifikationen des Ras-Proteins. Des weiteren belegen diese Resultate indirekt, daß das Valin 45 nicht mit den Lipidmodifikationen, speziell der Farnesylgruppe des Ras-Proteins, interagiert; andernfalls hätte zwischen der Aktivierung von Raf(Wt) durch QI-RasG12V.3S und QI-RasG12V.V45E.3S (vgl. **Abbildung 3.19 A**) kein signifikanter Unterschied detektiert werden können, da durch die Mutation der drei C-terminalen Cysteine zu Serin (3S) eine potentielle Wechselwirkung bereits seitens der beiden Ras-Konstrukte aufgehoben ist.

Im Vergleich zu den zahlreichen Aktivierungs-Experimenten, finden sich in der Literatur nur relativ wenige Arbeiten, in denen der Einfluß der verschiedenen Ras- respektive Rap-Mutanten auf die Effektor-Bindung untersucht wird (Chuang *et al.* 1994; Hu *et al.* 1995; Shinkai *et al.* 1996; Shirouzu *et al.* 1994); auch hier sind die für die Untersuchungen gewählten Methoden verschieden, so daß die erzielten Resultate schwer vergleichbar sind. Es werden neben *Two-Hybrid-Assays* sowohl kompetitive Kopräzipitations-Assays als auch nicht-kompetitive Immunpräzipitations-Assays angewandt. Unter diesem Aspekt sollen in der vorliegenden Arbeit sowohl bereits publizierte Bindungsdaten überprüft als auch neue Resultate zur Ras/Raf-Interaktion dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurde ein *Two-Hybrid-Assay* in *S. cerevisiae* eingesetzt, welcher neben einer rein qualitativen Aussage über eine Protein/Protein-Interaktion auch deren Quantifizierung ermöglicht. Untersuchungen im *Two-Hybrid-Assay* zeigen, daß die Einführung der Mutationen V45E, V45R bzw. V45A zu einer drastischen Reduzierung der Ras/Raf(Wt)-Bindung auf ca. 6 % bzw. 18 % bewirkt (vgl. **Abbildung 3.20 A**). Dagegen ist die Beeinträchtigung durch diese Ras-Mutanten in Hin-

blick auf die Bindung an c-Raf(Δ C1) mit etwa 10 % bis 20 % nur marginal (vgl. **Abbildung 3.20 B**). Die V45-Mutanten in Ras zeigen somit nicht nur in bezug auf die Aktivierung, sondern auch hinsichtlich der Bindung zwischen dem c-Raf(Wt)- und c-Raf(Δ C1)-Konstrukt eine deutliche Diskriminierung. Die Parallelität der Aktivierungs- und Bindungsdaten (vgl. **Abbildung 3.18** und **Abbildung 3.20**) demonstriert, daß Aminosäure-Substitutionen in der Position 45 des Ras-Proteins zu sterischen Hinderungen bzw. zur Aufhebung einer spezifischen durch das Valin 45 vermittelten Wechselwirkung mit der c-Raf C1-Domäne und als Konsequenz zu einer stark reduzierten Aktivierung der Raf-Kinase führen. Dieser Mechanismus kommt bei c-Raf(Δ C1) aufgrund der vollständigen Deletion der C1-Domäne nicht zur Wirkung; diese Modellvorstellung ist in der **Abbildung 3.21** schematisch dargestellt. Die für die V45-Mutanten erhaltenen Bindungsdaten decken sich nur teilweise mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen. So wurde im *Two-Hybrid-Assay* gezeigt, daß die V45E-Mutation in RasG12V die Interaktion mit einem sowohl die RBD als auch die C1-Domäne umfassenden Raf-Fragment (Raf₁₋₂₅₇) vollständig aufhebt (Zhang *et al.* 1993). Rekombinantes, in Sf9-Zellen exprimiertes und GTP γ S-gebundenes RasG12V.V45E zeigt einen kompletten Verlust der Interaktion mit einem in *E. coli* exprimierten, die C1-Domäne umfassenden, chimären MBP-Raf₁₃₂₋₂₀₆-Protein, während die Bindung an die Raf RBD (MBP-Raf₅₀₋₁₃₁) unbeeinträchtigt bleibt (Hu *et al.* 1995). Die Inkubation von rekombinantem, in *E. coli* exprimiertem, GTP γ S-komplexiertem RasV45E (ohne G12V-Hintergrund) mit Lysaten eukaryontischer Ba/F3-Zellen führt bei der anschließenden Immunpräzipitation dieses Ras-Proteins zu einer, im Vergleich zum Kontrollexperiment mit Ras(Wt), moderaten Kopräzipitation endogener Raf-Kinase (Shirouzu *et al.* 1994). Chuang *et al.* stellen dagegen in kompetitiven Kopräzipitations-Experimenten, in denen rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes und GTP γ S-beladenes RasV45E als Kompetitor des im GST-Raf₁₋₂₅₇/Ras[γ -³²P]GTP-Komplex gebundenen Ras-Proteins fungiert, eine Affinität von RasV45E an Raf fest, die annähernd der von Ras(Wt) entspricht. Kontrollexperimente mit RasG12V.V45E (mit onkogenem Hintergrund) führen zu annähernd identischen Resultaten (Chuang *et al.* 1994). Auch Shinkai *et al.* demonstrieren, daß die Ras-Mutation V45E in einem qualitativen *Two-Hybrid-Assay* in *S. cerevisiae* zu keiner Beeinträchtigung der Interaktion mit Raf₁₋₂₅₇ führt. Des Weiteren kann RasG12V.V45E aus Lysaten von Sf9-Zellen, welche RasG12V.V45E und *full length* Raf koexprimieren, durch Immunpräzipitation von Raf kopräzipitiert werden (Shinkai *et al.* 1996). Weitere *in vitro*- und *in vivo*-Experimente können keinen negativen Einfluß der V45E-Substitution auf die Ras/Raf-Interaktion feststellen. So ist die Bindung sowohl von GDP γ S- als auch GTP γ S-beladenen RasV45E an MBP-Raf₁₋₂₀₆ im Vergleich zu Ras(Wt) unverändert. Die

Koexpression von c-Raf(Wt) und Ras(Wt) bzw. RasV45E in COS7-Zellen zeigt, daß die Ras-vermittelte Membrantranslokation der Raf-Kinase durch die V45E-Mutation nicht beeinträchtigt wird (Tamada *et al.* 1997). Bezogen auf die Aktivierung von Raf, demonstrieren die Autoren in derselben Publikation durch verschiedene Kinase-Aktivitäts-Assays sowohl die direkte Phosphorylierung von MBP (*myelin basic protein*) durch immunpräzipitiertes ERK als auch die indirekte Phosphorylierung von ERK durch immunpräzipitiertes Raf bzw. durch die über Ras koimmunpräzipitierte Raf-Kinase. In allen drei Experimenten führt die V45E-Substitution, verglichen mit Ras(Wt), zu einer Verringerung der Ras-vermittelten Aktivierung um ca. 70 %. Die dargestellten Resultate anderer Arbeitsgruppen verdeutlichen, daß der Effekt der V45E-Mutation auf die Ras/Raf-Bindung kontrovers diskutiert wird, während die stark inhibierende Wirkung dieser Mutation auf die zelluläre Transformation respektive Aktivierung der Raf-Kinase/MAPK-Kaskade unumstritten ist. Die Beurteilung der diversen Bindungsstudien ist schwierig, da sehr unterschiedliche Methoden zur Anwendung kommen; so u.a. *Two-Hybrid-Assays*, die lediglich eine rein qualitative Aussage erlauben. Die verschiedenen, sehr komplexen Experimente mit immunpräzipitierten und koimmunpräzipitierten Proteinen sind äußerst kompliziert und die zahlreichen Arbeitsschritte machen diese Methoden sehr anfällig für diverse experimentelle Fehler. Dagegen handelt es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Two-Hybrid-Assay* um ein gut etabliertes und optimiertes System (Jaitner *et al.* 1997), das zuverlässig reproduzierbare Resultate liefert und das für ein *in vivo*-System relativ geringe Schwankungen zeigt.

Es ist zu vermuten, daß neben dem Valin 45 noch weitere Aminosäurereste in der Aktivierungs-Region von Ras an einer putativen Wechselwirkung mit der Raf-Kinase respektive der Raf C1-Domäne beteiligt sind. Um dies näher zu untersuchen, wurden in Analogie zu den Untersuchungen der RasV45-Mutanten sämtliche oberflächenexponierten Aminosäuren des C-terminal der Effektor-Region lokalisierten Bereichs der Aktivierungs-Region auf eine solche Beteiligung hin analysiert (vgl. **Abbildung 3.22**). Zusätzlich wurde auch die Ras-Mutation Y64W in die Untersuchungen mit einbezogen, da einige Autoren die These vertreten, daß die *switch II*-Region neben der *switch I*-Region eine zweite unabhängige RBD darstellt, deren Aminosäuren, unter anderem auch das Tyrosin 64, mit der Raf C1-Domäne interagieren, während die Aminosäuren der *switch I*-Region (Effektor-Region) mit der Raf RBD wechselwirken (Drugan *et al.* 1996). Das Untersuchungskriterium war, wie im Fall der V45-Mutanten, die Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1); zunächst wurden ausschließlich Ras-Mutanten mit sterisch anspruchsvollen Arginin- und Tryptophan-Substitutionen in Luciferase-Reporter-Gen-Assays analysiert. Der Vergleich zwischen **Abbil-**

Abbildung 3.23 A und **Abbildung 3.23 B** zeigt, daß die RasG12V.Q43-Mutanten mit durchschnittlich 25 % bzw. 80 % und in etwas geringerem Maß auch die RasG12V.T50-Konstrukte mit jeweils ca. 50 % bzw. 80 % der RasG12V-induzierten Raf(Wt)- bzw. Raf(Δ C1)-Aktivierung eine deutliche Diskriminierung in bezug auf die Aktivierung der beiden Raf-Konstrukte aufweisen. Aminosäure-Substitutionen in den Positionen 47, 49, 52 und 64 bewirken quantitativ sehr unterschiedliche Inhibitionen. Diese reichen von nur marginalen Effekten wie bei D47R und L52W bis hin zu Inhibitionen von bis zu ca. 40 % wie im Fall von E49W. Entscheidend ist jedoch, daß diese Effekte unabhängig von dem jeweils verwendeten Raf-Konstrukt gemessen werden können. Diese Ras-Mutanten zeigen somit im Gegensatz zu den Q43- und T50-Varianten des Ras-Proteins keine Diskriminierung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1). Fujita *et al.* demonstrieren anhand des Neuritenwachstums bei PC12-Zellen, daß die Ras-Mutationen V45E und G48C die Fähigkeit der Zellen zu dieser „Differenzierung“ aufheben. Für die Mutationen E49Q und T50Q sowie für die Doppelmutante L52M/D54E können die Autoren in diesem zellulären *Assay* jedoch keine Effekte beobachten (Fujita-Yoshigaki *et al.* 1991). In einer späteren Arbeit greift dieselbe Arbeitsgruppe diese Resultate nochmals auf und ergänzt sie durch zahlreiche weitere, ebenfalls durch die Beobachtung der Neuriten-Differenzierung in PC12-Zellen gewonnenen Daten (Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995). Die ermittelten Mutationen mit den stärksten Effekten auf das Neuritenwachstum sind ausnahmslos in den beiden antiparallelen β -Strängen β 2 und β 3 lokalisiert (K42A, V45E, I46A, G48A, G48C, E49A und L53A). Den in der vorliegenden Arbeit als besonders relevant für die Raf-Aktivierung und die Raf(Wt)/Raf(Δ C1)-Unterscheidung identifizierten Aminosäuren Glutamin 43 und Threonin 50 kann gemäß den Resultaten von Fujita *et al.* für die Ausdifferenzierung von Neuriten keine Bedeutung zugemessen werden. Zu den von Fujita und Kollegen produzierten Ergebnissen sind jedoch einige kritische Anmerkungen zu machen: so ist das hydrophobe Isoleucin 46 bei Betrachtung der Ras-Struktur nicht oberflächenexponiert, sondern in das Innere des Ras-Proteins gerichtet, wo es zusammen mit den ebenfalls hydrophoben Aminosäuren Valin 44 und Leucin 53 einen hydrophoben Kernbereich bildet, welcher für die Aufrechterhaltung der nativen Struktur des Proteins essentiell ist. Eine Aminosäure-Substitution in diesen Positionen führt aus struktureller Sicht sehr wahrscheinlich zu gravierenden Konformationsänderungen, die sich auf weite Bereiche des Ras-Proteins auswirken. Die Substitution des hydrophoben Isoleucins 46 durch eine Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften, wie beispielsweise ein Valin (I46V), stellt eine relativ moderate Veränderung dar und führt deshalb zu keinen signifikanten Effekten in den *in vivo*-Experimenten. Die Ras-Mutante I46A besitzt dagegen in der Position 46 lediglich eine

Methylgruppe als Seitenkette und führt zu einer Reduzierung des Neuritenwachstums um mehr als 50 %. Die Stärke der von Fujita *et al.* gemessenen Effekte hängen graduell von dem Ausmaß der Veränderungen ab. Aminosäure-Substitutionen durch Arginin oder Tryptophan, wie in dieser Arbeit verwendet, hätten mit Sicherheit zu noch drastischeren Effekten geführt. Aus den dargestellten strukturellen Überlegungen heraus wurden Ras-Konstrukte mit Mutationen in der Position 46 in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht mit einbezogen. Die von Fujita *et al.* diesbezüglich produzierten Daten sind also nur indirekte Effekte und damit als Artefakte anzusehen. Ähnliche Kritik ist auch hinsichtlich der von dieser Arbeitsgruppe für die Ras-Mutanten G48C und G48A erzielten Resultate angebracht. Das Glycin 48 besitzt als „Seitenkette“ lediglich ein Wasserstoffatom und ist in dem *loop* zwischen den beiden β -Strängen $\beta 2$ und $\beta 3$ lokalisiert. Die Substitution dieses Glycins durch ein Cystein stellt aus struktureller Sicht eine massive Veränderung dar und induziert sehr wahrscheinlich konformationelle Veränderungen im Bereich der beiden antiparallelen β -Stränge, wodurch es zu einer indirekten funktionellen Beeinträchtigung des Ras-Proteins kommt. Auch für das Glycin 48 sind die gemessenen Effekte graduell von dem Ausmaß der durchgeführten Veränderungen abhängig. Während die Mutation G48C das Neuritenwachstum völlig unterbindet, ist im Falle einer moderaten Alanin-Mutation (G48A) eine nur um 50 % reduzierte Neuriten-Differenzierung zu beobachten. In bezug auf die von Fujita *et al.* ermittelte komplette Inhibition dieses Differenzierungsprozesses durch die Ras-Mutation L53A, ist die schon für die Mutationen I46V und I46A dargelegte Kritik anzubringen. Die Veränderung dieser, zu einem hydrophoben Kernbereich gehörenden Aminosäure führt zu indirekten Effekten und sind als Artefakte zu bewerten. An dieser Stelle soll noch kritisch bemerkt werden, daß die von Fujita *et al.* angewandte *in vivo*-Methode, welche das Neuritenwachstum in PC12-Zellen als Kriterium für die Beurteilung der Onkogenität verschiedener Ras-Proteine heranzieht, schwer zu quantifizieren ist. Weiterhin handelt es sich bei der Ausbildung von Neuriten aufgrund der Reversibilität dieses Prozesses streng genommen nicht um eine echte Differenzierung. An einer solch komplexen morphologischen Veränderung sind darüber hinaus neben der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade noch weitere Signalkomponenten beteiligt (vgl. **Abbildung 1.5**), was die Beurteilung der durch dieses System gewonnenen Daten zusätzlich erschwert.

Als weitere wichtige Aminosäure wurde von Fujita *et al.* die in der Position 49 lokalisierte Glutaminsäure identifiziert, welche bei Substitution durch Alanin (E49A) zu einer Reduktion des Neuritenwachstums in PC12-Zellen auf ca. 20 % führt; ein Austausch gegen Glutamin (E49Q) hat jedoch keinen Effekt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Mutante

RasG12V.E49R bzw. RasG12V.E49W eine Reduzierung der durch sie vermittelten Raf(Wt)-Aktivierung auf ca. 80 % bzw. 60 % bewirkt (vgl. **Abbildung 3.23 A**). Obwohl hier durch die Substitution einer sauren Aminosäure gegen eine basische bzw. sterisch anspruchsvolle, hydrophobe Aminosäure ein drastischer Eingriff vorgenommen wurde, sind die gemessenen Inhibitionen deutlich geringer als die durch Fujita *et al.* ermittelten. Da die beiden Ras-Mutanten zwischen der Aktivierung von c-Raf(Wt) und c-Raf(Δ C1) jedoch keinen signifikanten Unterschied zeigen, wird die Glutaminsäure 49 zumindest als für die Ras/Raf C1-Interaktion nicht relevante Aminosäure eingestuft. Da selbst massive Veränderungen in der Position 49 zu keinen starken Effekten führen, wurde eine weitergehende Untersuchung einer moderaten Alanin-Mutante (E49A) nicht in Betracht gezogen. Eine gravierende Inhibition der Raf(Wt)-Aktivierung durch die E49A kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, darf jedoch als wenig wahrscheinlich angesehen werden.

Der **Abbildung 3.23** ist zu entnehmen, daß die Mutante RasG12V.D47R sowohl die Aktivierung von Raf(Wt) als auch Raf(Δ C1) nicht beeinträchtigt. Im Fall von RasG12V.D47W kann bezüglich beider Raf-Konstrukte eine Inhibition auf durchschnittlich etwa 65 % der jeweiligen durch RasG12V-vermittelten Aktivierung festgestellt werden. Da für beide Ras-Mutanten keine Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen den beiden Raf-Konstrukten detektierbar ist, wird die Asparaginsäure 47 wie die Glutaminsäure 49 als irrelevant für die Ras/Raf C1-Interaktion angesehen. Auch Fujita *et al.* können für die Ras-Mutation D47A keine signifikante Reduzierung des Neuritenwachstums beobachten. Interessanterweise zeigt RasG12V.D47R im Gegensatz zu RasG12V.D47W in reproduzierbarer Weise eine gegenüber RasG12V deutlich erhöhte Basalaktivität (vgl. **Abbildung 3.23.A**), welche jedoch nicht erklärbar ist.

Die Ras-Mutanten RasG12V.L52R und RasG12V.L52W führen unabhängig von dem jeweils eingesetzten Raf-Konstrukt zu einer Reduzierung der durch sie vermittelten Aktivierung, die durchschnittlich ca. 80 % der jeweiligen durch RasG12V induzierten entspricht (vgl. **Abbildung 3.23**). Dies deckt sich im wesentlichen mit dem von Fujita *et al.* beobachteten Effekt der Ras-Doppelmutante L52M/D54E.

Das Ras-Konstrukt RasG12V.Y64W zeigt wie die Ras-Mutanten RasG12V.L52R und RasG12V.L52W keine Diskriminierung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1); für beide Raf-Varianten wird eine im Vergleich zu RasG12V um ca. 25 % reduzierte Aktivierung auf etwa 75 % gemessen (vgl. **Abbildung 3.23**).

Die Untersuchung sämtlicher Ras-Arginin-Mutanten sowie von RasG12V.Y64W im *Two-Hybrid-Assay* zeigt, daß die Ras-Konstrukte RasG12V.Q43R und RasG12V.T50R auch hinsichtlich der Bindung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1) diskriminieren (vgl. **Abbildung 3.24**). Dies korreliert gut mit den zuvor für die Aktivierung gezeigten Daten. Wie schon für die Aktivierung ist auch hier der Effekt des Q43R-Konstrukts auf die Interaktion deutlich größer als der des T50R-Konstruktes. Die Ras-Mutanten E49R, L52R und Y64W zeigen hingegen keinen Unterschied in bezug auf die durch sie bedingte Beeinträchtigung der Interaktion zu Raf(Wt) und Raf(Δ C1). Auch dies korreliert sehr gut mit den in **Abbildung 3.23** dargestellten Aktivierungsdaten. E49, L52 und Y64 stellen also Aminosäuren dar, welche im Fall einer Substitution die Raf-Bindung respektive die Raf-Aktivierung in unterschiedlich starken Maß beeinträchtigen, dies jedoch unabhängig von der Raf C1-Domäne bewirken. Damit widerlegen diese Resultate die von Drugan *et al.* vertretene Auffassung, daß das in der *switch II*-Region lokalisierte Tyrosin 64 an einer Interaktion mit der c-Raf C1-Domäne beteiligt ist.

Bei Betrachtung der in **Abbildung 3.22** dargestellten Struktur des Ras-Proteins ist besonders auffällig, daß sämtliche für eine potentielle Interaktion mit der Raf C1-Domäne relevanten Aminosäuren (Q43, V45 und T50) im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Aminosäureresten unmittelbar benachbart lokalisiert sind und eine vergleichbare räumliche Orientierung aufweisen. Für das Tyrosin 64 sowie für weitere Aminosäuren der *switch II*-Region konnte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß diese für die GAP-induzierte GTPase-Aktivität des Ras-Proteins essentiell sind (Antonny *et al.* 1991; Moodie *et al.* 1995; Nur-E-Kamal *et al.* 1992; Polakis und McCormick 1993). Die Struktur des Ras/GAP-Komplexes zeigt, daß das Tyrosin 64 durch hydrophobe Interaktion mit dem invariablen Leucin 910 von GAP-334 an der Ausbildung eines hydrophoben Interaktionsbereichs zwischen Ras und GAP beteiligt ist. Darüber hinaus vermittelt das Tyrosin 64 eine polare Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe der Hauptkette des ebenfalls invarianten Leucins 902 (Scheffzek *et al.* 1997). Andere Arbeitsgruppen demonstrieren, daß das Tyr64 in Ras, aber auch das Phe64 in Rap für die Interaktion mit Austauschfaktoren (GEFs) von Bedeutung sind (Quilliam *et al.* 1996; van den Berghe *et al.* 1999). Die Kristallstruktur des Ras/SOS-Komplexes zeigt, daß die Seitenketten des Tyr64, Met67 und Tyr71 der *switch II*-Region ein hydrophobes *cluster* bilden, welches von einem Bereich planarer und geladener Ras/SOS-Interaktionen umgeben ist (Boriack-Sjodin *et al.* 1998). Das Tyr64 vermittelt den wichtigsten Kontakt innerhalb des Ras/SOS-Komplexes, indem es mit den Aminosäuren Ile825, Leu872 und Phe929, welche eine hydrophobe Vertiefung bilden, interagiert. So führt die Mutation Y64A durch Verlust der hydrophoben Interaktion zu einer 50-fachen Abnahme der Ras/SOS-Bindung (Hall *et al.*

2001). Die moderatere Auswirkung der Y64W-Substitution (vgl. **Abbildung 3.24**) liegt vermutlich weniger in einer Beeinträchtigung der hydrophoben Wechselwirkung, als in einer sterischen Hinderung durch das im Vergleich zum Tyrosin räumlich anspruchsvollere Tryptophan begründet. Die durch die Y64W-Mutation hervorgerufenen Effekte sind demzufolge nicht durch eine reduzierte Ras/Raf-Interaktion, als vielmehr durch die Beeinträchtigung der Wechselwirkung des Ras-Proteins mit den vorgeschalteten GEFs und nachgeschalteten GAPs bedingt. Des Weiteren haben neuere Untersuchungen gezeigt, daß das Tyrosin 64 auch für die Aktivierung des Ras-Effektors RalGDS, ein Ral-spezifischer Austauschfaktor, von Bedeutung ist (Linnemann *et al.* 2002).

Das Ras-Konstrukt RasG12V.D47R ist die einzige der bisher diskutierten Ras-Mutanten, deren Aktivierungs- und Bindungsdaten nicht korrelieren. Während die Arginin-Substitution in der Position 47 weder auf die Aktivierung von Raf(Wt) noch von Raf(Δ C1) Einfluß hat (vgl. **Abbildung 3.23**), führt derselbe Austausch im Bindungs-Assay zu einer Verminderung der Interaktion mit Raf(Wt) um etwa 50 % und zu Raf(Δ C1) um ca. 15 % (vgl. **Abbildung 3.24**). Damit zeigt diese Ras-Mutante in bezug auf die Bindung, nicht aber in Hinblick auf die Aktivierung eine Diskriminierung zwischen den beiden Raf-Konstrukten. Vielleicht stellt dies auch nur vordergründig einen Widerspruch dar, wenn man in Betracht zieht, daß RasG12V.D47R eine im Vergleich zu RasG12V etwa doppelt so hohe Basalaktivität aufweist, welche bei einer Aktivierung von Raf(Wt) durch dieses Ras-Konstrukt impliziert ist. Auch andere Arbeitsgruppen finden Aktivierungs- und Bindungsdaten, die nicht zu der These passen, nach der eine verminderte Interaktion eine reduzierte Aktivierung bewirkt (Chuang *et al.* 1994; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1995; Shirouzu *et al.* 1994). Fujita *et al.* bieten als Erklärungsmöglichkeit an, daß eine Mutation in Ras zu einer Verringerung der Bindung zu B-Raf führt und hierüber einen Effekt, beispielsweise auf das Neuritenwachstum in PC12-Zellen ausübt, während die Interaktion mit c-Raf 1 unbeeinträchtigt bleibt. Ein *crossstalk* wäre jedoch auch durch andere Signalwege denkbar. So könnten Ras-Mutanten über PI3K und Akt/PKB (Jun *et al.* 1999; Rommel *et al.* 1997; Rommel *et al.* 1999; Zimmermann und Moelling 1999) oder PI3K und Pak3 (Chiloeches *et al.* 2001; Sun *et al.* 2000; King *et al.* 1998) sogar entgegengesetzte Effekte auf die Aktivität der Raf-Kinase ausüben. Da bei dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Luciferase-Reportergen-Assay spezifisch eine Überexpression der an der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade beteiligten Komponenten erfolgt, sollte man jedoch annehmen, daß solche „Nebenreaktionen“ über andere, endogene Signalwege, welche nicht durch Überexpression artifiziell verstärkt wurden, bei den Messungen lediglich in sehr geringem Maß zum Hintergrund beitragen. Eine Ras-Mutante könnte ihre inhibierenden Effekte aber

auch über eine weitere, dritte Signalkomponente innerhalb eines ternären Proteinkomplexes vermitteln ohne notwendigerweise die Wechselwirkung zwischen Ras und Raf zu beeinflussen. Aber auch die Beseitigung eines Aminosäurerestes, dessen Phosphorylierung zur Aktivierung eines nachgeschalteten Effektors notwendig ist, der jedoch nicht in einem Protein/Protein-Interaktionsbereich lokalisiert ist, könnte ein einfaches Beispiel für ein solches Szenario darstellen. Im Falle der D47R-Mutante stellt sich die Datenlage allerdings gerade umgekehrt dar, da durch die Arginin-Substitution zwar die Bindung zu Raf, jedoch nicht die Aktivierung von Raf beeinträchtigt ist. Letztlich kann der durch die D47R-Mutation hervorgerufene Widerspruch jedoch nicht zufriedenstellend aufgelöst werden. Generell muß somit festgehalten werden, daß Aktivierung und Bindung nicht grundsätzlich streng korreliert sein müssen.

Das Asparagin 26 und das Histidin 27 des Ras-Proteins stellen wie schon das Valin 45 prominente Aminosäuren der Aktivierungs-Region dar, für die ebenfalls eine herausragende Bedeutung für die Raf-Aktivierung respektive Effektorspezifität diskutiert wird (Chen *et al.* 1996; Chuang *et al.* 1994; Hu *et al.* 1995; Marshall *et al.* 1991; Nur-E-Kamal *et al.* 1992; Shirouzu *et al.* 1994). Untersuchungen der genannten Arbeitsgruppen zeigen übereinstimmend, daß die Substitution dieser Aminosäuren in Ras durch die entsprechenden Aminosäuren des Rap-Proteins (N26G, H27I und N26G/H27I) zu einer Reduzierung der durch onkogenes Ras vermittelten Aktivität führen. Der inhibierende Effekt dieser Mutationen auf die Aktivierung der Raf-Kinase ist vergleichbar mit dem durch V45E hervorgerufenen. Hinsichtlich des Einflusses dieser Mutationen auf die Bindung zu Raf existieren wiederum nur wenige und teilweise widersprüchliche Daten. So können Chung *et al.* keine Beeinträchtigung der Ras/Raf-Interaktion durch die Doppelmutante N26G/H27I feststellen, während andere Autoren für RasG12V.N26G eine partielle Reduzierung der Bindung an Raf finden (Shirouzu *et al.* 1994). Hu *et al.* demonstrieren, daß die Mutation N26G (sowie V45E) zu einem spezifischen Verlust der Interaktion mit der Raf C1-Domäne führt, wogegen die Interaktion mit der Raf RBD unbeeinträchtigt bleibt (Hu *et al.* 1995). Eigene initiale Experimente mit RasG12V.N26G/H27I im Luciferase-Reportergen-Assay zeigten zunächst eine Verringerung der Aktivierung von Raf(Wt) um ca. 70 % und der von Raf(Δ C1) um etwa 35 %. Hinsichtlich ihres inhibierenden Effektes und ihrer Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen den beiden Raf-Konstrukten wäre diese Doppelmutante mit RasG12V.Q43W vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate konnten zu einem späteren Zeitpunkt nicht erfolgreich reproduziert werden. Weiterhin führte die Untersuchung der verschiedenen Einzelmутanten (N26G, N26R, N26W, H27I, H27R und H27W) in Hinblick auf die Aktivierung von Raf(Wt) und

Raf(Δ C1) zu uneinheitlichen und zuweilen auch widersprüchlichen Ergebnissen. Moderate Alanin-Substitutionen in den Positionen 26 und 27 zeigten keine signifikanten Unterschiede in bezug auf die Raf(Wt) und Raf(Δ C1)-Aktivierung. Aufgrund dieser unsicheren Datenlage wurden weder im Luciferase-Reportergen-Assay noch im *Two-Hybrid-Assay* weitergehende Experimente durchgeführt. Möglicherweise führen Aminosäure-Substitutionen in diesem Bereich der Aktivierungs-Region zu konformationellen Veränderungen, welche sekundäre Effekte, beispielsweise über die C-terminal angrenzende Effektor-Region, verursachen. Die Aufmerksamkeit richtete sich zu diesem Zeitpunkt der Arbeit außerdem zunehmend auf die Aminosäuren Gln43, Val45 und Thr50, für die eindeutige, signifikante und reproduzierbare Resultate erzielt wurden und welche in der Ras-Struktur zum einen eine ähnliche räumliche Ausrichtung zeigen und zum anderen ein kleines, zusammenhängendes Epitop innerhalb der Aktivierungs-Region des Ras-Proteins definieren (vgl. **Abbildung 3.22**).

Nachdem durch die Untersuchungen von Arginin- und Tryptophan-Substitutionen in den Positionen 43, 45 und 50 von Ras eine putative Beteiligung der Aminosäuren Gln43, Val45 und Thr50 an der Interaktion mit der c-Raf C1-Domäne gezeigt werden konnte, sollte die Spezifität der durch diese drei Aminosäurereste vermittelten Wechselwirkungen näher analysiert werden. Dazu wurden Ras-Konstrukte mit moderaten Alanin-Mutationen generiert und in Luciferase-Reportergen-Assays eingesetzt. **Abbildung 3.25 A** zeigt, daß der inhibierende Effekt von RasG12V.Q43A und RasG12V.T50A auf die Aktivierung von Raf(Wt) in Relation zu den entsprechenden Arginin- und Tryptophan-Mutanten (vgl. **Abbildung 3.23 A**) mit 15 % bzw. 20 % deutlich schwächer ist. Auch im Vergleich zu der V45A-Mutation, welche eine Inhibition der Aktivierung von Raf(Wt) um etwa 65 % bewirkt, ist der Effekt der Q43A- und T50A-Mutante relativ gering (vgl. **Abbildung 3.18 A**). Entgegen den Erwartungen führt die Kombination der drei einzelnen Alanin-Substitutionen (RasG12V.43/45/50A) nicht zu einem „additiven Effekt“, d.h. das Ausmaß der Inhibition durch RasG12V.43/45/50A entspricht nicht der Summe der einzelnen Effekte der drei verschiedenen Einzelmutanten. Für das RasG12V.43/45/50A-Konstrukt wäre eine Inhibition zu erwarten, die mindestens so groß wie die stärkste durch eine der adäquaten Einzelmutanten hervorgerufene Inhibition ist, also wie für RasG12V.V45A mindestens 65 % beträgt. Tatsächlich führt die Dreifachmutante jedoch zu einer nur etwa 30 %igen Reduzierung der Raf(Wt)-Aktivierung. RasG12V.T50A zeigt keinen Unterschied in Hinblick auf die Aktivierung von Raf(Wt) und Raf(Δ C1) (vgl. **Abbildung 3.25 B**); in beiden Fällen beträgt die Inhibition ca. 20 %. Damit zeigt RasG12V.T50A keine Diskriminierung zwischen den beiden Raf-Varianten. Für RasG12V.Q43A läßt sich bezüglich der Aktivierung der beiden Raf-Konstrukte nur ein marginaler Effekt messen, der

unter Berücksichtigung der gegebenen Standardabweichungen als nicht signifikant angesehen werden muß. Die schon für die Arginin- und Tryptophan-Substitutionen beobachtete Tendenz, daß die durch die verschiedenen Mutanten erzeugten, quantitativen Effekte graduell von V45R/W über Q43R/W bis T50R/W abnehmen, setzt sich hier auch für die entsprechenden Alanin-Austausche fort. RasG12V.43/45/50A zeigt in bezug auf die Fähigkeit zur Aktivierung von Raf(Wt) und Raf(Δ C1) eine entgegen den Erwartungen niedrige, aber dennoch deutliche Differenz von ca. 25 % (vgl. **Abbildung 3.25 A** und **Abbildung 3.25 B**). Es muß angenommen werden, daß die Sensitivität des Luciferase-Reportergen-Assays für die Detektion nur schwacher, durch einzelne Alanin-Mutanten hervorgerufene Effekte auf die Raf-Aktivierung nicht ausreichend ist.

Die durch das *Two-Hybrid-System* gewonnenen Bindungsdaten (vgl. **Abbildung 3.26 A** und **Abbildung 3.26 B**) lassen vermuten, daß die Nachweisgrenze auch für dieses System erreicht ist. RasG12V.Q43A bewirkt ungeachtet des jeweils eingesetzten Raf-Konstruktes eine um ca. 20 % verminderte Bindung und zeigt damit keine Diskriminierung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1). Dies korreliert gut mit den für diese Mutante gemessenen Aktivierungsdaten. Die Substitution des Tyrosins 50 durch Alanin führt in Kombination mit Raf(Wt) zu keinem signifikanten Interaktionsverlust. Die Wechselwirkung mit Raf(Δ C1) ist durch die T50A-Mutation dagegen um etwa 25 % reduziert. Damit zeigen die für RasG12V.T50A ermittelten Resultate bezüglich der Diskriminierung zwischen den beiden Raf-Konstrukten sowohl im Vergleich zu RasG12V.T50R als auch RasG12V.Q43R sowie den diversen RasG12V.V45-Mutanten ein inverses Verhalten. Dieses Ergebnis läßt sich nicht befriedigend erklären, ist aber im höchsten Maße reproduzierbar. Zusätzliche, eingehendere Untersuchungen der RasG12V.T50A-Mutante führten teilweise sogar zu einer im Vergleich zu RasG12V deutlich stärkeren Bindung zu Raf(Wt). Dies erscheint zunächst widersprüchlich; ein ähnliches Phänomen kann jedoch auch für die RafRBD/Ras-Interaktion gefunden werden. So bewirkt die Substitution des Ala85 und Val88 der Raf RBD durch basische Aminosäuren verglichen mit der unveränderten Raf RBD eine stark erhöhte Bindung zu v-Ras•GTP (Fridman *et al.* 2000a; Fridman *et al.* 2000b). Die Autoren vermuten, daß die durch eine Lysin-Substitution zusätzlich eingeführte positive Ladung in der Position 85 im Zusammenspiel mit den benachbarten und ebenfalls basischen Aminosäuren Lys84 und Arg89 zu einer Verstärkung von Coulombschen Wechselwirkungen mit Ras führt; wahrscheinlich bedingt durch die Ausbildung einer Salzbrücke zu Asp38 in Ras. Analog führt die Substitution von Val88 durch Arginin (V88R) zu einer Interaktion mit Glu31 in Ras. Untersuchungen der Doppelmutante 85K/88R zeigen, daß die Effekte der Einzelmutanten hier ebenfalls nicht kumulativ sind. Die Resultate demon-

strieren, daß es aus evolutiver Sicht nicht notwendigerweise zu einer Selektion auf eine maximale Bindung, sondern vielmehr auf eine für die Vermittlung der jeweiligen biologischen Funktion optimale Bindung kommt. Ähnliches könnte wie **Abbildung 4.3** graphisch veranschaulicht auch für Aminosäure-Substitutionen in der Position 50 von Ras gelten. Die Einführung eines basischen Arginins könnte durch dessen positive Ladung respektive räumlich wesentlich anspruchsvollere Seitenkette zu einer sterischen Hinderung führen, die sich in einer verminderten Bindung zu Raf ausdrückt (**Abbildung 4.3 B**). Eine Alanin-Substitution bewirkt dagegen zum einen durch die im Vergleich zum Tyrosin kleinere Seitenkette des Alanins und zum anderen durch den hydrophoben Charakter des Alanins zusammen mit dem benachbarten Valin 45 eine Vergrößerung des hydrophoben Interaktionsbereichs und damit eine stärkere Wechselwirkung zwischen Ras und Raf (**Abbildung 4.3 C**). Bei Deletion der C1-Domäne bleibt der verstärkende Effekt der Alanin-Substitution T50A auf die Ras/Raf-Bindung aus und führt, eventuell bedingt durch strukturelle Veränderungen innerhalb des Ras/Raf(Δ C1)-Komplexes, zu einer Verminderung der Interaktion.

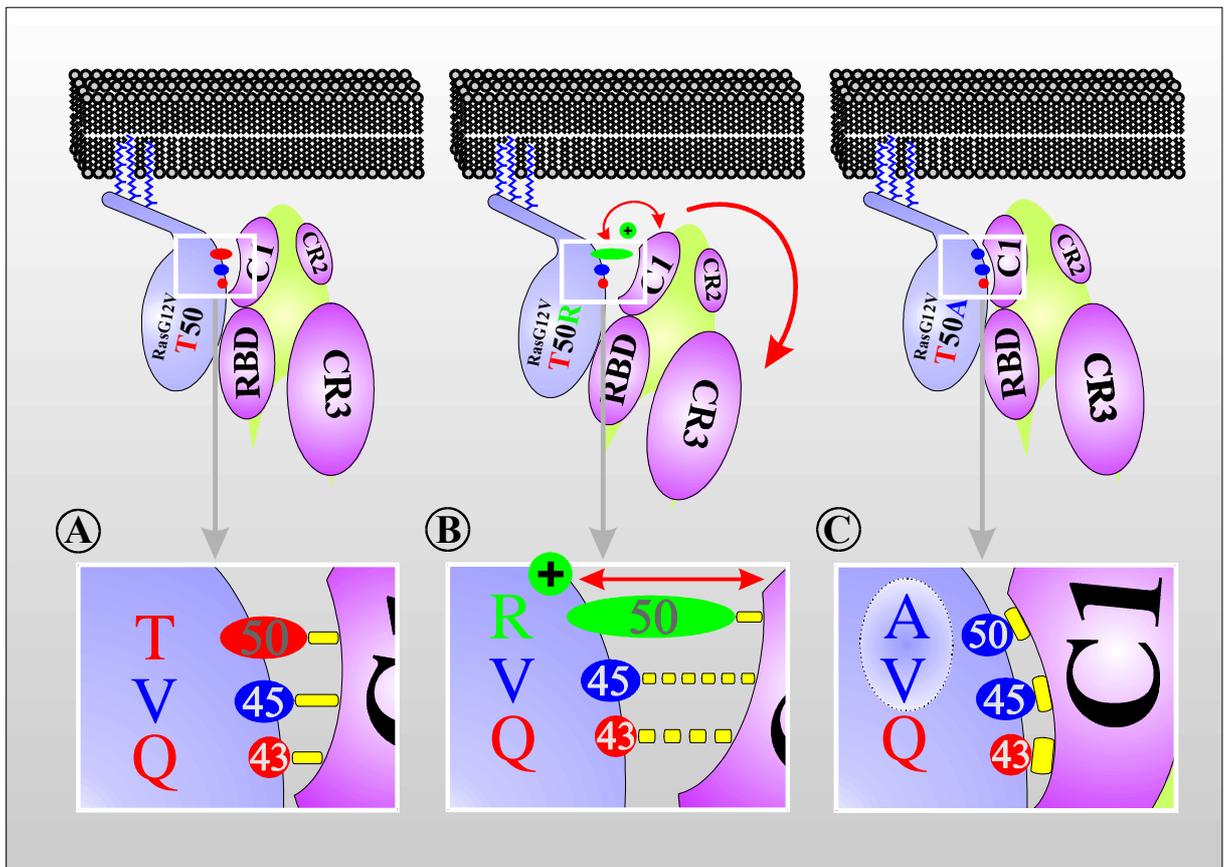


Abbildung 4.3

Schematische Detail-Darstellung der hypothetischen Ras/Raf-Interaktion im b2/b3-Bereich des Ras-Proteins

Nähere Erläuterungen siehe Text.

Wie bereits für die Aktivierung von Raf(Wt), führt die Kombination der drei Einzelmutanten (RasG12V.43/45/50A) auch hinsichtlich der Bindung an Raf(Wt) nicht zu einer Kumulation der Einzeleffekte. So ist für diese Tripelmutante, bezogen auf die Interaktion mit Raf(Wt) und Raf(Δ C1), eine Differenz von ca. 20 % meßbar (**Abbildung 3.26 A** und **Abbildung 3.26 B**), während diese für die V45A-Einzelmutante etwa 70 % beträgt (vgl. **Abbildung 3.20 A** und **Abbildung 3.20 B**).

Zusammenfassend scheint es, als sei das Valin 45 an einer spezifischen, hydrophoben Interaktion mit der Raf C1-Domäne beteiligt, welche sowohl durch drastische als auch gemäßigte Aminosäure-Austausche zerstört wird. Die Wechselwirkung von Q43 und in noch stärkerem Maß von T50 mit der C1-Domäne ist dagegen eher unspezifisch und wird nur bei massiven Aminosäure-Substitutionen beeinträchtigt. Insgesamt definieren die Aminosäuren Gln43, Val45 und Tyr50 jedoch ein zusammenhängendes, oberflächenexponiertes Epitop in der Aktivierungs-Region von Ras, welches aufgrund der Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1) als putatives, mit der Raf C1-Domäne interagierendes Epitop angesprochen werden kann.

Neben den zahlreichen diskutierten Arbeiten zur Bedeutung der Aktivierungs-Region des Ras-Proteins für die Raf-Aktivierung, existieren etliche Publikationen, welche sich umgekehrt mit der Funktion der c-Raf C1-Domäne für die Ras-vermittelte Raf-Aktivierung auseinandersetzen (vgl. auch 1.5.4). Frühe Arbeiten haben gezeigt, daß die c-Raf C1-Domäne wichtig für die Interaktion mit Ras ist (Zhang *et al.* 1993). Die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren der C1-Domäne wurden als für die Ras-Bindung essentieller Teil eines hochaffinen Bindungsbereichs charakterisiert (Ghosh *et al.* 1994; Ghosh und Bell 1994). Andere Autoren können die Bedeutung dieser Aminosäuren als kritische Bindungsdeterminante durch unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführte *in vitro*-Experimente nicht bestätigen (Gorman *et al.* 1996). Eine weitere Arbeitsgruppe vertritt die Auffassung, daß die C1-Domäne eine zweite, unabhängige Ras-Bindungsdomäne darstellt, die wie die Raf RBD eine präferentielle Interaktion mit GTP-gebundenem Ras zeigt (Brtva *et al.* 1995). Weitergehende Studien dieser Autoren zeigen, daß die C1-Domäne mit Aminosäureresten der *switch II*-Region interagiert, während die RBD mit der *switch I*-Region wechselwirkt. Da die *switch I*- und *switch II*-Region die einzigen Bereiche des Ras-Proteins darstellen, die in Abhängigkeit von dem jeweils gebundenen Nucleotid konformationelle Strukturänderungen zeigen, erklärt dies, weshalb beide Interaktionen GTP-abhängig sind (Drugan *et al.* 1996). Diese Resultate sind jedoch nicht unumstritten; Hu *et al.* zeigen, daß die in der Aktivierungs-Region von Ras lokalisierten Aminosäuren

Asn26 und Val45 für die Bindung zu Raf essentiell sind. Da die Aktivierungs-Region jedoch im Gegensatz zu der *switch I*- und *switch II*-Region keine nucleotidabhängige Konformationsänderung zeigt, ist die Interaktion zwischen der Raf C1-Domäne und Ras GTP-unabhängig (Hu *et al.* 1995). Eigene Experimente mit der Ras-Mutante RasG12V.Y64W haben zudem gezeigt, daß das Tyrosin 64 der *switch II*-Region nicht an einer Interaktion mit der C1-Domäne beteiligt ist (vgl. **Abbildung 3.24**); außerdem sind sämtliche für eine solche Wechselwirkungen relevanten Aminosäuren in der Aktivierungs-Region lokalisiert worden.

Einige Autoren finden für die Bindung der Raf C1-Domäne an die Ras-Aktivierungs-Region eine Abhängigkeit von den posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins. So zeigen Luo *et al.*, daß die C1-Domäne mit einem von der Effektor-Region verschiedenen Ras-Epitop interagieren, welches jedoch nur bei prenyliertem Ras existent ist. Die Bedeutung der Ras-Lipidmodifikationen für die Ras/Raf-Interaktion respektive der Raf-Aktivierung ist jedoch ebenfalls umstritten. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß nicht nur Raf(Wt), sondern auch ein Raf-Konstrukt mit komplett deletierter C1-Domäne unabhängig von jedweden Lipidmodifikationen des Ras-Proteins aktiviert werden kann (vgl. **Abbildung 3.13**). Des Weiteren sind sowohl die durch verschiedene Raf RBD-Mutanten (vgl. **Abbildung 3.7** und **Abbildung 3.8**) als auch die durch die Ras-Mutation V45E (vgl. **Abbildung 3.19**) vermittelten Effekte auf die Raf-Aktivierung unabhängig von den posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins. Ob die C1-Domäne eine eigenständige Bindungsdomäne mit hoher oder niedriger Bindungsaffinität zu Ras darstellt, oder ob sie die durch die RBD vermittelte Bindung lediglich verstärkt und damit gleichsam eine Erweiterung der Raf RBD repräsentiert, wird ebenfalls kontrovers diskutiert (Brtva *et al.* 1995; Fujita-Yoshigaki *et al.* 1991; Ghosh *et al.* 1994). Anderen Überlegungen zufolge ist die C1-Domäne nicht wie die RBD für die Membranrekrutierung, sondern für die diesem Prozeß folgende Aktivierung der Raf-Kinase von Bedeutung (Roy *et al.* 1997). Sowohl Roy *et al.* als auch Luo *et al.* benutzen, wie viele andere Experimentatoren auch, Raf-Konstrukte, in denen die Zn²⁺-komplexierenden und für die Strukturgebung essentiellen Cysteine 165 und 168 durch Serine substituiert sind. Die durch Einsatz dieser Raf-Konstrukte gewonnenen Resultate sind daher äußerst kritisch zu bewerten.

Während ein Beitrag der C1-Domäne für die Ras/Raf-Interaktion durch zahlreiche Arbeiten belegt ist, existieren dagegen kaum experimentelle Daten zu einer näheren Eingrenzung der für diese Wechselwirkung relevanten Aminosäurereste seitens der c-Raf C1-Domäne. Gemäß Williams *et al.* sind die Aminosäuren Leu149 und Phe151 der C1-Domäne für die

Ras/Raf C1-Interaktion essentiell. Die Aufhebung einer potentiellen hydrophoben Wechselwirkung dieser Aminosäurereste durch die Doppelmutation L149T/F151Q führt zu einer Reduzierung der Ras/Raf C1-Bindung auf etwa 42 %; dies jedoch unabhängig davon, ob das eingesetzte Ras•GDP farnesyliert ist oder nicht. Damit können die Autoren nicht überzeugend demonstrieren, daß die Ras-Lipidmodifikationen in einer Interaktion zwischen H-Ras und der c-Raf C1-Domäne involviert sind. Im Fall einer Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren L149 und F151 mit der Ras-Farnesylgruppe, müßte jedoch sowohl die Wt-Form als auch die mutierte Variante der C1-Domäne mit gleicher und verringerter Affinität an das unmodifizierte Ras•GDP binden, da in beiden Kombinationen die postulierte Interaktion bereits durch das Fehlen der Farnesylierung aufgehoben ist. Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten den negativen Effekt der C1-Doppelmutante L149T/F151Q und L149A/F151A auf die Ras-Bindung reproduzieren; es ergab sich dabei eine Reduzierung auf 45 % und 42 % (Lucas 2001 und eigene, nicht dargestellte Resultate). Ein inhibierender Effekt dieser C1-Mutationen auf die Raf-Aktivierung konnte im Gegensatz zu den Beobachtungen von Williams *et al.* nicht festgestellt werden. Raf L149T/F151Q bzw. Raf L149A/F151A zeigten sogar eine stark erhöhte Basalaktivität von 80 % bzw. 60 % der RasG12V-vermittelten Raf(Wt)-Aktivierung. Bei Stimulation dieser Raf-Konstrukte durch RasG12V ergaben sich im Vergleich zu Raf(Wt) eine Aktivierung von 205 % bzw. 120 % (Lucas 2001 bzw. eigene, nicht dargestellte Resultate).

Durch eine ausgedehnte Alanin-Scanning-Mutagenese oberflächenexponierter Aminosäuren der c-Raf C1-Domäne, gelang Daub *et al.* die Identifizierung zahlreicher Aminosäuren, welche mehrere distinkte Epitope definieren (vgl. **Abbildung 3.6**) und aktivierende bzw. inhibierende Effekte auf die Ras-vermittelte Raf-Aktivierung ausüben. Die Substitution der Aminosäuren S177, T182 und M183 durch Alanin bewirkt im Luciferase-Reporter-Gen-Assay eine Reduzierung Ras-induzierter Raf-Aktivierung auf ca. 30 %. Parallel dazu führt die gleiche Dreifachmutante im *Two-Hybrid-Assay* verglichen mit Raf(Wt) zu einer drastischen Verringerung der Ras/Raf-Bindung auf etwa 10 %. Der inhibierende Effekt der S177/T182/M183A-Mutation auf die Aktivierung der Raf-Kinase wird durch eine artifizielle, Ras-unabhängige Membranrekrutierung über die C-terminale Fusion der aus K-Ras stammenden CaaX-Box kompensiert. Eine solche Rekonstitution durch *CaaX-ing* kann für die inhibitorische Raf-Doppelmutante K144/R164A dagegen nicht beobachtet werden (Daub *et al.* 1998). Diese Resultate zeigen, daß den Aminosäuren Ser177, Thr182 und Met183 durch die Interaktion mit Ras eine Bedeutung für die Ras-vermittelte Membranrekrutierung zukommt, während die Aminosäuren Lys144 und Arg164 eine der Membraninsertion folgende Funktion

für die Raf-Aktivierung besitzen (vgl. 4.1). Die Resultate legen nahe, daß es sich bei dem von Daub *et al.* identifizierten putativen Ras-Bindungsepitop S177/T182/M183 und dem in dieser Arbeit charakterisierten Ras-Epitop, bestehend aus den Aminosäuren Gln43, Val45 und Thr50, um zwei korrespondierende Interaktionsbereiche handelt (vgl. **Abbildung 3.27**). Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden in „Kreuzexperimenten“ die Effekte des RasG12V.43/45/50A- und des Raf 177/182/183A-Konstruktes aufeinander sowie deren Auswirkungen auf verschiedene Raf RBD-Mutanten respektive die Effektor-Mutante RasG12V.E37G analysiert (vgl. **Abbildung 3.28**). Der Vergleich der für die verschiedenen Raf-Mutanten gemessenen und in unterschiedlichen Farben dargestellten „Aktivitätsmuster“ zeigt, daß sich Raf 177/182/183A und Raf(Δ C1) in bezug auf RasG12V.43/45/50A verhalten wie Raf 59A und Raf 67A in Relation zu RasG12V.E37G (vgl. **Tabelle 3.2**). Die Aktivierung von Raf(Δ C1) und Raf 177/182/183A durch RasG12V.E37G führt im Vergleich zu der Aktivierung durch RasG12V.43/45/50A zu einer stärkeren Inhibition, da in dieser Kombination zwei verschiedene Interaktionen zwischen Ras und Raf beeinträchtigt sind. Für Raf 59A und Raf 67A kommt es bei der Aktivierung durch RasG12V.43/45/50A verglichen mit der Stimulation durch RasG12V.E37G zu einer stärkeren Beeinträchtigung, da in diesem Fall ebenfalls zwei unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Ras und Raf betroffen sind. Die in Hinblick auf die gegenseitig aufeinander ausgeübten Effekte starke Parallelität von RasG12V.43/45/50A und Raf 177/182/183A gegenüber RasG12V.E37G und Raf 59A bzw. Raf 67A, deren Interaktion durch verschiedene Arbeiten als gesichert gilt (Block *et al.* 1996; Jaitner *et al.* 1997; Nassar *et al.* 1995; Nassar *et al.* 1996), wird als deutliches Indiz für eine Wechselwirkung des Ras-Epitops Q43/V45/T50 und des Raf-Epitops S177/T182/M183 gewertet. Die geringen Standardabweichungen der aus insgesamt vier unabhängigen Experimenten resultierenden Daten und die gleichmäßige Expression der verschiedenen Ras- und Raf-Konstrukte belegen die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der dargestellten Resultate. Kontrollexperimente mit Raf 66A und Raf 68A zeigen, daß sowohl die Stimulation durch RasG12V.E37G als auch durch RasG12V.43/45/50A zu einer verstärkten Inhibition führt; in beiden Fällen kommt es zur Aufhebung einer zusätzlichen, zweiten Wechselwirkung. **Abbildung 4.4** verdeutlicht das aus den dargestellten Resultaten abgeleitete Modell der Interaktion zwischen der c-Raf C1-Domäne und Ras. Die C1-Domäne ist an der Plasmamembran lokalisiert, wobei das Leu160 in der Lipid-Doppelschicht inseriert ist und die basischen Aminosäuren Lys144 und Arg164 mit sauren Lipiden der Membran interagieren. Hervorgehoben sind außerdem die von Daub *et al.* charakterisierten Aminosäuren Ser177, Thr182 und Met183. Des weiteren zeigt die Abbildung die Struktur des Rap1A/Raf RBD-Komplexes

(stellvertretend für den Ras/Raf RBD-Komplex) unter Hervorhebung der Aminosäuren Gln43, Val45 und Thr50 der Aktivierungs-Region. Die Abbildung läßt bei der gezeigten Orientierung der C1-Domäne und des Rap1A/Raf RBD-Komplexes eine Interaktion zwischen dem Epitop S177/T182/M183 der C1-Domäne und dem die Aminosäuren Q43, V45 und T50 umfassenden Ras-Epitop als wahrscheinlich erscheinen. Allerdings kann die Möglichkeit einer zusätzlichen Beteiligung des ^{cis}Prolins 181 der C1-Domäne an einer solchen Wechselwirkung nicht ausgeschlossen werden. Das ^{cis}Prolin in der Position 181 ist für die Struktur- bzw. Aufrechterhaltung der Struktur im C-terminalen Bereich der C1-Domäne essentiell und war somit der Untersuchung durch eine Alanin-Scanning-Mutagenese nicht zugänglich (Daub 1999). Die Raf-Mutante S177/T182/M183 betreffend soll noch angemerkt werden, daß der durch diese bewirkte inhibitorische Effekt theoretisch auch über eine beeinträchtigte Wechselwirkung der Aminosäuren Ser177, Thr182 und Met183 mit der Raf RBD verursacht sein kann, wobei die an einer solchen Interaktion seitens der Raf RBD beteiligten Aminosäuren jedoch von denen des Ras/Raf RBD-Interaktionsbereichs verschieden wären.

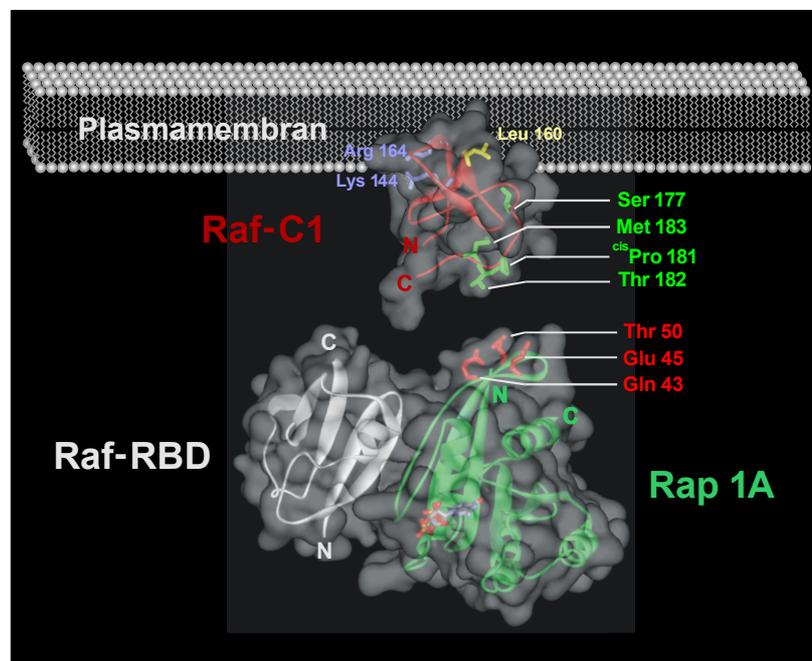


Abbildung 4.4 Modell der Interaktion zwischen der c-Raf C1-Domäne und Ras

Das hydrophobe, in der Plasmamembran inserierte Leucin 160 der c-Raf C1-Domäne (Mott *et al.* 1996) ist gelb, die basischen Aminosäuren Lysin 144 und Arginin 164 sind blau dargestellt. Letztere interagieren mit sauren Membranlipiden. Das von Daub *et al.* identifizierte potentielle Ras-Bindungssepitop (Ser177, Thr182 und Met183) ist grün hervorgehoben. In der Struktur des Komplexes der Raf RBD und des Ras-homologen Rap1A-Proteins (Nassar *et al.* 1995) sind die Aminosäuren des potentiellen mit der c-Raf C1-Domäne interagierenden Ras-Epitops rot markiert. In Rap1A ist verglichen mit Ras in der Position 45 ein Glutaminsäurerest statt eines Valinrestes lokalisiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLabViewer 4.0 erstellt.

Erste initiale und hier nicht dargestellte Experimente mit den Konstrukten RasG12V.R41E und RasG12V.K42E zeigen, daß die Ras-Mutante K42E, nicht jedoch R41E sowohl in bezug auf die Aktivierung als auch die Bindung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1) diskriminieren. Diese vorläufigen Resultate korrelieren gut mit der aus den Untersuchungen des Rap1A/Raf RBD-Komplexes gewonnenen Erkenntnissen, daß Arg41 mit den Aminosäuren Gln66 und Asn64 der RBD interagieren, während Lys42 an der Rap1A/Raf RBD-Wechselwirkung nicht beteiligt ist (Nassar *et al.* 1995). Diese Ergebnisse deuten an, daß eventuell auch Lys42, wie schon für Asn26 und His27 diskutiert, dem identifizierten Ras-Epitop Q43/V45/T50 zugerechnet werden muß.

Die angeführten Unklarheiten können letztlich nur durch die Strukturaufklärung eines Komplexes zwischen Ras und der Raf-Kinase respektive zwischen Ras und der N-terminalen regulatorischen Domäne der Raf-Kinase befriedigend gelöst werden.

Im Gegensatz zu den Arbeiten anderer Autoren (Garcia *et al.* 2001; Kuroda *et al.* 1996; Ohtsuka *et al.* 1996; Okada *et al.* 1996; Vossler *et al.* 1997) konnte in eigenen, hier nicht dargestellten Experimenten keine Aktivierung von B-Raf durch Rap1A festgestellt werden. Die RasG12V-vermittelte Aktivierung von B-Raf wird jedoch wie die von c-Raf 1 durch die Mutation V45E stark beeinträchtigt. Die Untersuchung der durch die Aminosäure-Substitution in den Positionen 43, 45 und 50 des Ras-Proteins verursachten Effekte auf die Ras-induzierte Aktivierung von B-Raf respektive B-Raf(Δ C1) (Lucas 2001) könnte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Analog wäre auch der Einfluß der entsprechenden Aminosäuren in Rap auf die Interaktion zwischen Rap und dessen Effektoren zu analysieren.

5 Zusammenfassung

Der initiale Schritt des Raf-Aktivierungsprozesses innerhalb der MAPK-Signalkaskade stellt die Membranrekrutierung der cytoplasmatischen Raf-Kinase durch die aktivierte, über C-terminale Lipidmodifikationen in der Plasmamembran inserierte GTPase Ras dar.

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern den posttranslationalen Lipidmodifikationen des Ras-Proteins eine über die reine Funktion für die Membrantranslokation der Raf-Kinase hinausgehende Bedeutung in dem Raf-Aktivierungsprozeß zukommt. Es konnte demonstriert werden, daß die Raf-Kinase durch das artifizielle, chimäre, über eine N-terminale Transmembran-Domäne in der Plasmamembran inserierte QI-RasG12V.3S-Konstrukt aktiviert werden kann. Auch die aktivierenden und inhibierenden Effekte der diversen von Daub *et al.* identifizierten Raf C1-Mutanten sind bei Stimulation durch QI-RasG12V.3S beobachtbar und damit, wie bereits die Aktivierung von Raf(Wt), unabhängig von jedweden Ras-Lipidmodifikationen. Des Weiteren konnte auch Raf(Δ C1), ein Raf-Konstrukt mit kompletter Deletion der C1-Domäne, durch QI-RasG12V.3S erfolgreich aktiviert werden. Dies zeigt, daß eine Interaktion der Lipidmodifikationen mit der Raf C1-Domäne für die Raf-Aktivierung nicht essentiell ist. Darüber hinaus kann für mehrere, C-terminal unterschiedlich stark verkürzte QI-RasG12V-Konstrukte keine Diskriminierung hinsichtlich der Aktivierung von Raf(Wt) und Raf(Δ C1) konstatiert werden, wodurch eine hypothetische Wechselwirkung der C-terminalen HVR (hypervariable Region) des Ras-Proteins mit der c-Raf C1-Domäne und damit Funktion für die Raf-Aktivierung ausgeschlossen werden kann. Raf-Konstrukte mit Substitutionen der potentiell für die Membraninteraktion relevanten Aminosäuren Lys144, Leu160 und Arg164 gegen Alanin bewirken bei Aktivierung durch QI-RasG12V.3S eine im Vergleich zu den übrigen inhibierenden Raf C1-Mutanten überproportional starke Inhibition, welche bei Stimulation durch das zusätzlich C-terminal modifizierte und somit doppelt in der Plasmamembran inserierte QI-RasG12V.3C-Konstrukt selektiv rekonstituiert wird. Diese Resultate sowie die, verglichen mit QI-RasG12V.3S, stärkere Aktivierung sowohl von Raf(Wt) als auch Raf(Δ C1) durch QI-RasG12V.3C zeigen, daß die zusätzliche C-terminale Membraninsertion durch die Ras-Lipidmodifikationen zu einer optimaleren Orientierung bzw. Distanz des Ras-Proteins respektive des Ras/Raf-Komplexes kommt, wodurch der Raf-Aktivierungsprozeß positiv beeinflusst wird. Eine über die Membranrekrutierung hinausgehende Funktion der Ras-Lipidmodifikationen für die Raf-Aktivierung kann somit nicht festgestellt werden.

Die N- und C-terminal der für die Effektor-Bindung essentiellen Kerneffektor-Region lokalisierte Aktivierungs-Region des Ras-Proteins ist für die Vermittlung der Effektorspezifität und die Modulation der Affinitäten zu verschiedenen Effektoren von Bedeutung, wobei nach allgemeiner Auffassung eine Interaktion zwischen bestimmten Aminosäuren der Aktivierungs-Region und der c-Raf C1-Domäne angenommen wird. Zwecks Identifizierung solcher Aminosäuren wurde in dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit eine ausgedehnte Mutagenese oberflächenexponierter Aminosäurereste der Ras-Aktivierungs-Region durchgeführt und die resultierenden Ras-Konstrukte in Reporter-Gen-Assays und *Two-Hybrid-Assays* auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung von und Bindung an Raf(Wt) respektive Raf(Δ C1) hin analysiert. Potentielle, mit der c-Raf C1-Domäne interagierende Aminosäuren führen im Fall einer Substitution durch sterisch anspruchsvolle oder geladene Aminosäuren wie Arginin oder Tryptophan in bezug auf Raf(Wt) sowohl zu einer signifikanten Reduzierung der Aktivierung als auch der Bindung. Hinsichtlich der Aktivierung bzw. Bindung von Raf(Δ C1) zeigen dieselben Ras-Mutanten dagegen aufgrund der durch die Deletion der C1-Domäne ausbleibenden sterischen Hinderung keine oder nur marginale inhibierende Effekte. Durch diese Diskriminierung zwischen Raf(Wt) und Raf(Δ C1) konnten die Aminosäuren Gln43, Val45 und Thr50 der Ras-Aktivierungs-Region als für die Wechselwirkung mit der c-Raf C1-Domäne relevante Aminosäuren identifiziert werden, wobei für den durch die V45E-Mutation vermittelten inhibierenden Effekt eine Unabhängigkeit von den Ras-Lipidmodifikationen demonstriert werden konnte. Gln43, Val45 und Thr50 zeigen in der Ras-Struktur eine ähnliche räumliche Ausrichtung und definieren ein zusammenhängendes, oberflächenexponiertes Ras-Epitop, für das aufgrund der aus weitergehenden, vergleichenden Experimenten unter Einbeziehung weiterer Ras- und Raf-Mutanten erhaltenen Resultate eine Interaktion mit dem putativen Ras-Bindungs-epitop S177/T182/M183 der c-Raf C1-Domäne postuliert wird.

6 Literatur

- Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B. A., Dilworth, S. M., Mischak, H., Kolch, W., und Baccarini, M.** (2000). Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* **275**, 22300-22304.
- Adari, H., Lowy, D. R., Willumsen, B. M., Der, C. J., und McCormick, F.** (1988). Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* **240**, 518-521.
- Ahmed, S., Kozma, R., Lee, J., Monfries, C., Harden, N., und Lim, L.** (1991). The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C und diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding. *Biochem J* **280 (Pt 1)**, 233-241.
- Ahn, N. G., Seger, R., und Krebs, E. G.** (1992). The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 992-999.
- Aitken, A.** (1995). 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci* **20**, 95-97.
- Aitken, A.** (1996). 14-3-3 und its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends In Cell Biology* **6**, 341-347.
- Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G., und Soll, J.** (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* **17**, 498-501.
- Akasaka, K., Tamada, M., Wang, F., Kariya, K., Shima, F., Kikuchi, A., Yamamoto, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., und Kataoka, T.** (1996). Differential structural requirements for interaction of Ras protein with its distinct downstream effectors. *J Biol Chem* **271**, 5353-5360.
- Altschuler, D. und Lapetina, E. G.** (1993). Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b. *J.Biol.Chem.* **268**, 7527-7531.
- Altschuler, D. L., Peterson, S. N., Ostrowski, M. C., und Lapetina, E. G.** (1995). Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b. *J.Biol.Chem.* **270**, 10373-10376.
- Antonelli, V., Bernasconi, F., Wong, Y. H., und Vallar, L.** (2000). Activation of B-Raf und regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the G(o) α chain. *Mol Biol Cell* **11**, 1129-1142.
- Antonny, B., Chardin, P., Roux, M., und Chabre, M.** (1991). GTP hydrolysis mechanisms in ras p21 und in the ras-GAP complex studied by fluorescence measurements on tryptophan mutants. *Biochemistry* **30**, 8287-8295.
- Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., und Hancock, J. F.** (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 2475-2487.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., und Zhang, X. F.** (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog.Horm.Res.* **56**, 127-155.
- Avruch, J., Zhang, X. F., und Kyriakis, J. M.** (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* **19**, 279-283.
- Bachmair, A., Finley, D., und Varshavsky, A.** (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.
- Ballester, R., Furth, M. E., und Rosen, O. M.** (1987). Phorbol ester- und protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *J.Biol.Chem.* **262**, 2688-2695.

- Barbacid, M.** (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**, 779-827.
- Barettino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R., und Stunnenberg, H. G.** (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **22**, 541-542.
- Barnard, D., Diaz, B., Clawson, D., und Marshall, M.** (1998). Oncogenes, growth factors und phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene* **17**, 1539-1547.
- Beale, A. J.** (1963) *Lancet* **2**, 640.
- Bilan, P. J., Moyers, J. S., und Kahn, C. R.** (1998). The ras-related protein rad associates with the cytoskeleton in a non-lipid-dependent manner. *Exp Cell Res* **242**, 391-400.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Block, C., Janknecht, R., Herrmann, C., Nassar, N., und Wittinghofer, A.** (1996). Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nat Struct Biol* **3**, 244-251.
- Boguski, M. S. und McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras und its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- Booden, M. A., Baker, T. L., Solski, P. A., Der, C. J., Punke, S. G., und Buss, J. E.** (1999). A non-farnesylated Ha-Ras protein can be palmitoylated und trigger potent differentiation und transformation. *J Biol Chem* **274**, 1423-1431.
- Booden, M. A., Sakaguchi, D. S., und Buss, J. E.** (2000). Mutation of Ha-Ras C terminus changes effector pathway utilization. *J Biol Chem* **275**, 23559-23568.
- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., und Kuriyan, J.** (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**, 337-343.
- Bos, J. L.** (1988). The ras gene family und human carcinogenesis. *Mutat Res* **195**, 255-271.
- Bos, J. L.** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review [published erratum appears in *Cancer Res* 1990 Feb 15;50(4):1352]. *Cancer Res* **49**, 4682-4689.
- Bos, J. L.** (1997). Ras-like GTPases. *Biochim.Biophys.Acta* **1333**, M19-M31.
- Bos, J. L.** (1998). All in the family? New insights und questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 und Ral. *EMBO J* **17**, 6776-6782.
- Bos, J. L., de Rooij, J., und Reedquist, K. A.** (2001). Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 369-377.
- Bosch, E., Cherwinski, H., Peterson, D., und McMahon, M.** (1997). Mutations of critical amino acids affect the biological und biochemical properties of oncogenic A-Raf und Raf-1. *Oncogene* **15**, 1021-1033.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., und McCormick, F.** (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., und McCormick, F.** (1991). The GTPase superfamily: conserved structure und molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandt-Rauf, P. W., Carty, R. P., Chen, J. M., Lee, G., Rackovsky, S., und Pincus, M. R.** (1990). The structure of the carboxyl terminus of the p21 protein. Structural relationship to the nucleotide-binding/transforming regions of the protein. *J.Protein Chem.* **9**, 137-142.

- Brenwald, P. und Novick, P.** (1993). Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 und Sec4. *Nature* **362**, 560-563.
- Brown, M. S. und Goldstein, J. L.** (1993). Protein prenylation. Mad bet for Rab [news; comment]. *Nature* **366**, 14-15.
- Brtva, T. R., Drugan, J. K., Ghosh, S., Terrell, R. S., Campbell-Burk, S., Bell, R. M., und Der, C. J.** (1995). Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* **270**, 9809-9812.
- Bruder, J. T., Heidecker, G., und Rapp, U. R.** (1992). Serum-, TPA-, und Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev* **6**, 545-556.
- Buday, L. und Downward, J.** (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, und Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620.
- Buss, J. E., Solski, P. A., Schaeffer, J. P., MacDonald, M. J., und Der, C. J.** (1989). Activation of the cellular proto-oncogene product p21Ras by addition of a myristylation signal. *Science* **243**, 1600-1603.
- Cadwallader, K. A., Paterson, H., Macdonald, S. G., und Hancock, J. F.** (1994). N-terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol Cell Biol* **14**, 4722-4730.
- Caloca, M. J., Fernandez, N., Lewin, N. E., Ching, D., Modali, R., Blumberg, P. M., und Kazanietz, M. G.** (1997). β 2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J.Biol.Chem.* **272**, 26488-26496.
- Campbell, S. L., Khosravifar, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., und Der, C. J.** (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395-1413.
- Carroll, M. P. und May, W. S.** (1994). Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem* **269**, 1249-1256.
- Carter, P., Bedouelle, H., und Winter, G.** (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4431-4443.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., und Nishizuka, Y.** (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**, 7847-7851.
- Chen, J. M., Brandt-Rauf, P. W., und Pincus, M. R.** (1996). Oncogenic amino acid substitutions in the inhibitory rap-1A protein cause it to adopt a ras-p21-like conformation as computed using molecular dynamics. *J.Biomol.Struct.Dyn.* **13**, 925-933.
- Chevray, P. M. und Nathans, D.** (1992). Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5789-5793.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., und Fields, S.** (1991). The two-hybrid system: a method to identify und clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9578-9582.
- Chiloeches, A., Mason, C. S., und Marais, R.** (2001). S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase und Pak3. *Mol.Cell Biol.* **21**, 2423-2434.
- Cho, W.** (2001). Membrane targeting by c1 und c2 domains. *J.Biol.Chem.* **276**, 32407-32410.
- Chong, H., Lee, J., und Guan, K. L.** (2001). Positive und negative regulation of Raf kinase activity und function by phosphorylation. *EMBO J.* **20**, 3716-3727.
- Chothia, C.** (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **53**, 537-572.

- Chow, Y. H., Pumiglia, K., Jun, T. H., Dent, P., Sturgill, T. W., und Jove, R.** (1995). Functional mapping of the N-terminal regulatory domain in the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* **270**, 14100-14106.
- Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., und Philips, M. R.** (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER und Golgi [see comments]. *Cell* **98**, 69-80.
- Chuang, E., Barnard, D., Hettich, L., Zhang, X. F., Avruch, J., und Marshall, M. S.** (1994). Critical binding und regulatory interactions between Ras und Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf und specific Ras effector residues. *Mol Cell Biol* **14**, 5318-5325.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., und Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation und storage of bacterial cells in the same solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2172-2175.
- Ciechanover, A.** (1987). Regulation of the ubiquitin-mediated proteolytic pathway: role of the substrate α -NH₂ group und of transfer RNA. *J Cell Biochem* **34**, 81-100.
- Clark, G. J., Drugan, J. K., Rossman, K. L., Carpenter, J. W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C. J., und Campbell, S. L.** (1997a). 14-3-3 ζ negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem* **272**, 20990-20993.
- Clark, G. J., Kinch, M. S., Rogers-Graham, K., Sebt, S. M., Hamilton, A. D., und Der, C. J.** (1997b). The Ras-related protein Rheb is farnesylated und antagonizes Ras signaling und transformation. *J Biol Chem* **272**, 10608-10615.
- Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D., und Barbacid, M.** (1991). Mechanism of activation of the vav protooncogene. *Cell Growth Differ* **2**, 95-105.
- Corbett, K. D., Alber, T., Tian, X., und Feig, L. A.** (2002). The many faces of Ras: recognition of small GTP-binding proteins
Basis for signaling specificity difference between Sos und Ras-GRF guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* 2001 Dec;26(12):710-6.
- Crews, C. M., Alessandrini, A., und Erikson, R. L.** (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-480.
- Crews, C. M. und Erikson, R. L.** (1993). Extracellular signals und reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* **74**, 215-217.
- Cutler, R. E., Jr., Stephens, R. M., Saracino, M. R., und Morrison, D. K.** (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 9214-9219.
- Daub, M.** (1999). Kontrolle der Ras-abhängigen Raf-Aktivierung durch regulatorische Epitope in der Raf-C1-Domäne. Dissertation, Ruhr-Universität-Bochum, Fakultät für Biologie, Bochum, Deutschland.
- Daub, M., Jöckel, J., Quack, T., Weber, C. K., Schmitz, F., Rapp, U. R., Wittinghofer, A., und Block, C.** (1998). The RafC1 Cysteine-Rich Domain Contains Multiple Distinct Regulatory Epitopes Which Control Ras-Dependent Raf Activation. *Molecular und Cellular Biology* **18**, 6698-6710.
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J., und Rapp, U. R.** (1994). The ins und outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* **19**, 474-480.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., und Bos, J. L.** (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP [see comments]. *Nature* **396**, 474-477.
- de Vos, A. M., Tong, L., Milburn, M. V., Matias, P. M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E., und Kim, S. H.** (1988). Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* **239**, 888-893.

- Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A., Vincent, L. A., Roberts, T. M., und Sturgill, T. W.** (1992). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells und in vitro [see comments]. *Science* **257**, 1404-1407.
- Dent, P., Jelinek, T., Morrison, D. K., Weber, M. J., und Sturgill, T. W.** (1995a). Reversal of Raf-1 activation by purified und membrane-associated protein phosphatases [published erratum appears in *Science* 1995 Sep 22;269(5231):1657]. *Science* **268**, 1902-1906.
- Dent, P., Reardon, D. B., Morrison, D. K., und Sturgill, T. W.** (1995b). Regulation of Raf-1 und Raf-1 mutants by Ras-dependent und Ras-independent mechanisms in vitro [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1995 Sep;15(9):5203]. *Mol Cell Biol* **15**, 4125-4135.
- Dent, P. und Sturgill, T. W.** (1994). Activation of (His)6-Raf-1 in vitro by partially purified plasma membranes from v-Ras-transformed und serum-stimulated fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 9544-9548.
- Dhanasekaran, N.** (1998). Cell Signaling: An overview. *Oncogene* **17**, 1329-1330.
- Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A., und Marshall, M.** (1997). Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation und biological signaling. *Mol Cell Biol* **17**, 4509-4516.
- Dickson, B. und Hafen, E.** (1994). Genetics of signal transduction in invertebrates. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**, 64-70.
- Donaldson, J. G. und Klausner, R. D.** (1994). ARF: a key regulatory switch in membrane traffic und organelle structure. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 527-532.
- Drivas, G. T., Shih, A., Coutavas, E., Rush, M. G., und D'Eustachio, P.** (1990). Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol* **10**, 1793-1798.
- Drugan, J. K., Khosravi-Far, R., White, M. A., Der, C. J., Sung, Y. J., Hwang, Y. W., und Campbell, S. L.** (1996). Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation. *J Biol Chem* **271**, 233-237.
- Ebinu, J. O., Bottorff, D. A., Chan, E. Y., Stang, S. L., Dunn, R. J., und Stone, J. C.** (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- und diacylglycerol-binding motifs. *Science* **280**, 1082-1086.
- Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M., und Weinberg, R. A.** (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction und transformation [see comments]. *Nature* **363**, 45-51.
- Ellis, C. A. und Clark, G.** (2000). The importance of being K-Ras [In Process Citation]. *Cell Signal* **12**, 425-434.
- Ellis, R. W., Defeo, D., Shih, T. Y., Gonda, M. A., Young, H. A., Tsuchida, N., Lowy, D. R., und Scolnick, E. M.** (1981). The p21 src genes of Harvey und Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* **292**, 506-511.
- Emerson, S. D., Waugh, D. S., Scheffler, J. E., Tsao, K. L., Prinzo, K. M., und Fry, D. C.** (1994). Chemical shift assignments und folding topology of the Ras-binding domain of human Raf-1 as determined by heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 7745-7752.
- Fabian, J. R., Daar, I. O., und Morrison, D. K.** (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic und biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* **13**, 7170-7179.
- Fabian, J. R., Vojtek, A. B., Cooper, J. A., und Morrison, D. K.** (1994). A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding und alters Raf-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5982-5986.
- Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Gross, R. W., und Williams, L. T.** (1994). Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* **371**, 612-614.

- Farrar, M. A., Alberol, I., und Perlmutter, R. M.** (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization [see comments]. *Nature* **383**, 178-181.
- Fauman, E. B. und Saper, M. A.** (1996). Structure und function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**, 413-417.
- Ferretti, L. und Sgaramella, V.** (1981). Specific und reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3695-3705.
- Fields, S. und Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fields, S. und Sternglanz, R.** (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**, 286-292.
- Flory, E., Weber, C. K., Chen, P., Hoffmeyer, A., Jassoy, C., und Rapp, U. R.** (1998). Plasma membrane-targeted Raf kinase activates NF- κ B und human immunodeficiency virus type 1 replication in T lymphocytes. *J Virol* **72**, 2788-2794.
- Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F., und Wittinghofer, A.** (1990). Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science* **249**, 169-171.
- Freed, E., Symons, M., Macdonald, S. G., McCormick, F., und Ruggieri, R.** (1994). Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf und effects on its activation. *Science* **265**, 1713-1716.
- Fridman, M., Maruta, H., Gonez, J., Walker, F., Treutlein, H., Zeng, J., und Burgess, A.** (2000a). Point mutants of c-raf-1 RBD with elevated binding to v-Ha-Ras [In Process Citation]. *J Biol Chem* **275**, 30363-30371.
- Fridman, M., Tikoo, A., Varga, M., Murphy, A., Nur, E. K. M., und Maruta, H.** (1994). The minimal fragments of c-Raf-1 und NF1 that can suppress v-Ha-Ras-induced malignant phenotype. *J Biol Chem* **269**, 30105-30108.
- Fridman, M., Walker, F., Catimel, B., Domagala, T., Nice, E., und Burgess, A.** (2000b). c-Raf-1 RBD associates with a subset of active v-H-Ras. *Biochemistry* **39**, 15603-15611.
- Fu, H., Subramanian, R. R., und Masters, S. C.** (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, und regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 617-647.
- Fujita-Yoshigaki, J., Shirouzu, M., Ito, Y., Hattori, S., Furuyama, S., Nishimura, S., und Yokoyama, S.** (1995). A constitutive effector region on the C-terminal side of switch I of the Ras protein. *J.Biol.Chem.* **270**, 4661-4667.
- Fujita-Yoshigaki, J., Shirouzu, M., Koide, H., Nishimura, S., und Yokoyama, S.** (1991). Identification of amino acid residues of Ras protein that are essential for signal-transducing activity but not for enhancement of GTPase activity by GAP. *FEBS Lett.* **294**, 187-190.
- Gale, N. W., Kaplan, S., Lowenstein, E. J., Schlessinger, J., und Bar-Sagi, D.** (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras [see comments]. *Nature* **363**, 88-92.
- Garcia, J., de Gunzburg, J., Eychene, A., Gisselbrecht, S., und Porteu, F.** (2001). Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- und Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2659-2670.
- Garvey, W. T., Maianu, L., Kennedy, A., Wallace, P., Ganaway, E., Hamacher, L. L., Yarnall, D. P., Lenhard, J. M., und Burns, D. K.** (1997). Muscle Rad expression und human metabolism: potential role of the novel Ras-related GTPase in energy expenditure und body composition. *Diabetes* **46**, 444-450.

- Gelb, M. H., Cho, W., und Wilton, D. C.** (1999). Interfacial binding of secreted phospholipases A(2): more than electrostatics und a major role for tryptophan. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**, 428-432.
- Geyer, M. und Wittinghofer, A.** (1997). GEFs, GAPs, GDIs und effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 786-792.
- Ghosh, S. und Bell, R. M.** (1994). Identification of discrete segments of human Raf-1 kinase critical for high affinity binding to Ha-Ras. *J Biol Chem* **269**, 30785-30788.
- Ghosh, S., Strum, J. C., Sciorra, V. A., Daniel, L., und Bell, R. M.** (1996). Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine und phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **271**, 8472-8480.
- Ghosh, S., Xie, W. Q., Quest, A. F., Mabrouk, G. M., Strum, J. C., und Bell, R. M.** (1994). The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, und is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *J Biol Chem* **269**, 10000-10007.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E., und Wittinghofer, A.** (1992). Mutational und kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* **12**, 2050-2056.
- Gilbert, E. J. und Maxwell, A.** (1994). The 24 kDa N-terminal sub-domain of the DNA gyrase B protein binds coumarin drugs. *Mol Microbiol* **12**, 365-373.
- Goldsmith, E. J. und Cobb, M. H.** (1994). Protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **4**, 833-840.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Stradley, S. J., Reiss, Y., und Gierasch, L. M.** (1991). Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase. *J Biol Chem* **266**, 15575-15578.
- Gorman, C., Skinner, R. H., Skelly, J. V., Neidle, S., und Lowe, P. N.** (1996). Equilibrium und kinetic measurements reveal rapidly reversible binding of Ras to Raf. *J.Biol.Chem.* **271**, 6713-6719.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Grammatikakis, N., Lin, J. H., Grammatikakis, A., Tschlis, P. N., und Cochran, B. H.** (1999). p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol* **19**, 1661-1672.
- Grand, R. J. und Owen, D.** (1991). The biochemistry of ras p21. *Biochem J* **279 (Pt 3)**, 609-631.
- Gutierrez, L., Magee, A. I., Marshall, C. J., und Hancock, J. F.** (1989). Post-translational processing of p21ras is two-step und involves carboxyl-methylation und carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J* **8**, 1093-1098.
- Hagemann, C. und Rapp, U. R.** (1999). Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* **253**, 34-46.
- Hall, A.** (1990). ras und GAP--who's controlling whom? *Cell* **61**, 921-923.
- Hall, A.** (1994). A biochemical function for ras--at last [comment]. *Science* **264**, 1413-1414.
- Hall, B. E., Yang, S. S., Boriack-Sjodin, P. A., Kuriyan, J., und Bar-Sagi, D.** (2001). Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 und switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *J.Biol.Chem.* **276**, 27629-27637.
- Hall, C., Monfries, C., Smith, P., Lim, H. H., Kozma, R., Ahmed, S., Vanniasingham, V., Leung, T., und Lim, L.** (1990). Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C und BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. *J.Mol.Biol.* **211**, 11-16.

- Han, S. K., Kim, K. P., Koduri, R., Bittova, L., Munoz, N. M., Leff, A. R., Wilton, D. C., Gelb, M. H., and Cho, W.** (1999). Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A2. *J.Biol.Chem.* **274**, 11881-11888.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., and Marshall, C. J.** (1991a). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO J* **10**, 641-646.
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., Paterson, H., and Marshall, C. J.** (1991b). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J* **10**, 4033-4039.
- Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J.** (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**, 1167-1177.
- Hancock, J. F., Paterson, H., and Marshall, C. J.** (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**, 133-139.
- Hannun, Y. A. and Bell, R. M.** (1986). Phorbol ester binding and activation of protein kinase C on triton X-100 mixed micelles containing phosphatidylserine. *J Biol Chem* **261**, 9341-9347.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hart, K. C. and Donoghue, D. J.** (1997). Derivatives of activated H-ras lacking C-terminal lipid modifications retain transforming ability if targeted to the correct subcellular location. *Oncogene* **14**, 945-953.
- Hart, K. C., Robertson, S. C., and Donoghue, D. J.** (2000). Activation of H-ras61L-specific signaling pathways does not require posttranslational processing of H-ras. *Exp Cell Res* **257**, 89-100.
- Harvey, J. J.** (1964). An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* **204**, 1104-1105.
- Hata, Y., Kaibuchi, K., Kawamura, S., Hiroyoshi, M., Shirataki, H., and Takai, Y.** (1991). Enhancement of the actions of smg p21 GDP/GTP exchange protein by the protein kinase A-catalyzed phosphorylation of smg p21. *J.Biol.Chem.* **266**, 6571-6577.
- Hata, Y., Kikuchi, A., Sasaki, T., Schaber, M. D., Gibbs, J. B., and Takai, Y.** (1990). Inhibition of the ras p21 GTPase-activating protein-stimulated GTPase activity of c-Ha-ras p21 by smg p21 having the same putative effector domain as ras p21s. *J.Biol.Chem.* **265**, 7104-7107.
- Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J. L., Kolch, W., Beck, T. W., Lloyd, P., Pawson, T., and Rapp, U. R.** (1990). Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol* **10**, 2503-2512.
- Heidecker, G., Kolch, W., Morrison, D. K., and Rapp, U. R.** (1992). The role of Raf-1 phosphorylation in signal transduction. *Adv Cancer Res* **58**, 53-73.
- Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M., and Wittinghofer, A.** (1996). Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J.Biol.Chem.* **271**, 6794-6800.
- Herrmann, C., Martin, G. A., and Wittinghofer, A.** (1995). Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* **270**, 2901-2905.
- Herrmann, C. and Nassar, N.** (1996). Ras and its effectors. *Prog Biophys Mol Biol* **66**, 1-41.
- Ho, C., Slater, S. J., Stagliano, B., and Stubbs, C. D.** (2001). The c1 domain of protein kinase c as a lipid bilayer surface sensing module. *Biochemistry* **40**, 10334-10341.

- Hooper, N. M.** (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts und caveolae (review). *Mol.Membr.Biol.* **16**, 145-156.
- Hoshijima, M., Kikuchi, A., Kawata, M., Ohmori, T., Hashimoto, E., Yamamura, H., und Takai, Y.** (1988). Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase of a human platelet Mr 22,000 GTP-binding protein (smg p21) having the same putative effector domain as the ras gene products. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **157**, 851-860.
- Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., und Marshall, C. J.** (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**, 335-342.
- Hu, C. D., Kariya, K., Okada, T., Qi, X. D., Song, C. H., und Kataoka, T.** (1999). Effect of phosphorylation on activities of Rap1A to interact with Raf-1 und to suppress Ras-dependent Raf-1 activation. *Journal of Biological Chemistry* **274**(1), 48-51.
- Hu, C. D., Kariya, K., Tamada, M., Akasaka, K., Shirouzu, M., Yokoyama, S., und Kataoka, T.** (1995). Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras. *J Biol Chem* **270**, 30274-30277.
- Hu, C. D., Kariya, K., Kotani, G., Shirouzu, M., Yokoyama, S., und Kataoka, T.** (1997). Coassociation of Rap1A und Ha-Ras with Raf-1 N-terminal region interferes with ras-dependent activation of Raf-1. *J Biol Chem* **272**, 11702-11705.
- Hunter, T.** (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**, 249-270.
- Hunter, T.** (1997). Oncoprotein networks. *Cell* **88**, 333-346.
- Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., und Nishizuka, Y.** (1997). Taxonomy und function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* **6**, 477-480.
- Ichikawa, S., Hatanaka, H., Takeuchi, Y., Ohno, S., und Inagaki, F.** (1995). Solution structure of cysteine-rich domain of protein kinase C α . *J Biochem (Tokyo)* **117**, 566-574.
- Improta-Brears, T., Ghosh, S., und Bell, R. M.** (1999). Mutational analysis of Raf-1 cysteine rich domain: requirement for a cluster of basic aminoacids for interaction with phosphatidylserine. *Mol Cell Biochem* **198**, 171-178.
- Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H., und Kaziro, Y.** (2000). Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J Biol Chem* **275**, 3737-3740.
- Irie, K., Gotoh, Y., Yashar, B. M., Errede, B., Nishida, E., und Matsumoto, K.** (1994). Stimulatory effects of yeast und mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science* **265**, 1716-1719.
- Ishikawa, F., Sakai, R., Ochiai, M., Takaku, F., Sugimura, T., und Nagao, M.** (1988). Identification of a transforming activity suppressing sequence in the c-raf oncogene. *Oncogene* **3**, 653-658.
- Itoh, T., Kaibuchi, K., Sasaki, T., und Takai, Y.** (1991). The smg GDS-induced activation of smg p21 is initiated by cyclic AMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of smg p21. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **177**, 1319-1324.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., und Fields, S.** (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-1696.
- Jaitner, B. K.** (1997). Die Raf-Kinase - Funktionelle Analyse ihrer Interaktion mit Ras und Regulation ihrer Kinaseaktivität. Dissertation, Ruhr-Universität-Bochum, Bochum, Deutschland.
- Jaitner, B. K., Becker, J., Linnemann, T., Herrmann, C., Wittinghofer, A., und Block, C.** (1997). Discrimination of amino acids mediating Ras binding from noninteracting residues affecting raf activation by double mutant analysis. *J Biol Chem* **272**, 29927-29933.

- Janknecht, R.** (1996). Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81. *Mol Cell Biol* **16**, 1550-1556.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Houthaeye, T., und Nordheim, A.** (1993a). C-terminal phosphorylation of the serum-response factor. *Eur J Biochem* **216**, 469-475.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., und Nordheim, A.** (1993b). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J* **12**, 5097-5104.
- Jaumot, M. und Hancock, J. F.** (2001). Protein phosphatases 1 und 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* **20**, 3949-3958.
- Jeng, A. Y., Srivastava, S. K., Lacal, J. C., und Blumberg, P. M.** (1987). Phosphorylation of ras oncogene product by protein kinase C. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **145**, 782-788.
- Johannes, F. J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., und Pfizenmaier, K.** (1994). PKC α is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J.Biol.Chem.* **269**, 6140-6148.
- Johnson, J. E. und Cornell, R. B.** (1999). Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol Membr Biol* **16**, 217-235.
- Jordan, M., Schallhorn, A., und Wurm, F. M.** (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* **24**, 596-601.
- Jun, T., Gjoerup, O., und Roberts, T. M.** (1999). Tangled Webs: Evidence of Cross-Talk Between c-Raf-1 und Akt. www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;1999/13/pe1
- Kahn, R. A., Goddard, C., und Newkirk, M.** (1988). Chemical und immunological characterization of the 21-kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **263**, 8282-8287.
- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., und Graybiel, A. M.** (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- Kawata, M., Kikuchi, A., Hoshijima, M., Yamamoto, K., Hashimoto, E., Yamamura, H., und Takai, Y.** (1989). Phosphorylation of smg p21, a ras p21-like GTP-binding protein, by cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system und in response to prostaglandin E1 in intact human platelets. *J.Biol.Chem.* **264**, 15688-15695.
- Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., und Takai, Y.** (1988). A novel small molecular weight GTP-binding protein with the same putative effector domain as the ras proteins in bovine brain membranes. Purification, determination of primary structure, und characterization. *J.Biol.Chem.* **263**, 18965-18971.
- Kikuchi, A. und Williams, L. T.** (1994). The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation. *J Biol Chem* **269**, 20054-20059.
- Kimmelman, A., Tolkacheva, T., Lorenzi, M. V., Osada, M., und Chan, A. M.** (1997). Identification und characterization of R-ras3: a novel member of the RAS gene family with a non-ubiquitous pattern of tissue distribution. *Oncogene* **15**, 2675-2685.
- King, A. J., Sun, H. Y., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W. Y., Bagrodia, S., und Marshall, M. S.** (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* **396**, 180-183.
- King, A. J., Wireman, R. S., Hamilton, M., und Marshall, M. S.** (2001). Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 und cooperativity with Src. *FEBS Lett.* **497**, 6-14.
- Kirsten, W. H. und Mayer, L. A.** (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute* **39**, 311-335.

- Kishida, S., Koyama, S., Matsubara, K., Kishida, M., Matsuura, Y., und Kikuchi, A.** (1997). Colocalization of Ras und Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* **15**, 2899-2907.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., und Noda, M.** (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* **56**, 77-84.
- Klebe, R. J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D., und Douglas, M. G.** (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria und yeast. *Gene* **25**, 333-341.
- Koide, H., Satoh, T., Nakafuku, M., und Kaziro, Y.** (1993). GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8683-8686.
- Kolch, W.** (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351**, 289-305.
- Kolch, W.** (2001). To be or not to be: a question of B-Raf? *Trends Neurosci.* **24**, 498-500.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., und Rapp, U. R.** (1993). Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-252.
- Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, P., und Rapp, U. R.** (1991). Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* **349**, 426-428.
- Kranenburg, O., Verlaan, I., und Moolenaar, W. H.** (2001). Regulating c-Ras function. cholesterol depletion affects caveolin association, GTP loading, and signaling. *Curr.Biol.* **11**, 1880-1884.
- Kraulis, P. J.** (1991). MOLSCRIPT - A Program to produce both detailed und schematic plots of protein structures. *Journal Of Applied Crystallography* **24**, 946-950.
- Kuroda, S., Ohtsuka, T., Yamamori, B., Fukui, K., Shimizu, K., und Takai, Y.** (1996). Different effects of various phospholipids on Ki-Ras-, Ha-Ras-, und Rap1B-induced B-Raf activation. *J Biol Chem* **271**, 14680-14683.
- Kurzchalia, T. V. und Parton, R. G.** (1999). Membrane microdomains und caveolae. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 424-431.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., und Avruch, J.** (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421.
- Lämml, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., und Stankova, J.** (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal.Biochem.* **219**, 164.
- Lee, C. H. J., Della, N. G., Chew, C. E., und Zack, D. J.** (1996). Rin, a neuron-specific und calmodulin-binding small G-protein, und Rit define a novel subfamily of ras proteins. *J Neurosci* **16**, 6784-6794.
- Lee, J., Ahmed, S., Kozma, R., Teo, M., Monfries, C., und Lim, L.** (1992). The N-terminal region of n-Chimaerin allows lipid modulation of the C-terminal p21rac-GTPase activating domain. *Biochem Soc Trans* **20**, 310S.
- Leevers, S. J., Paterson, H. F., und Marshall, C. J.** (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414.
- Lenzen, C., Cool, R. H., Prinz, H., Kuhlmann, J., und Wittinghofer, A.** (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras und the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* **37**, 7420-7430.

- Lerosey, I., Pizon, V., Tavitian, A., und de Gunzburg, J.** (1991). The cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the rap1 protein in vitro as well as in intact fibroblasts, but not the closely related rap2 protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **175**, 430-436.
- Li, B. und Fields, S.** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., und Schlessinger, J.** (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 und links receptor tyrosine kinases to Ras signalling [see comments]. *Nature* **363**, 85-88.
- Li, S., Janosch, P., Tanji, M., Rosenfeld, G. C., Waymire, J. C., Mischak, H., Kolch, W., und Sedivy, J. M.** (1995). Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *EMBO J* **14**, 685-696.
- Li, W., Chong, H., und Guan, K. L.** (2001). Function of the Rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *J.Biol.Chem.* **276**, 34728-34737.
- Linnemann, T., Kiel, C., Herter, P., und Herrmann, C.** (2002). The Activation of RalGDS Can Be Achieved Independently of Its Ras Binding Domain. IMPLICATIONS OF AN ACTIVATION MECHANISM IN Ras EFFECTOR SPECIFICITY AND SIGNAL DISTRIBUTION. *J Biol Chem* **277**, 7831-7837.
- Lowy, D. R. und Willumsen, B. M.** (1993). Function und regulation of ras. *Annu Rev Biochem* **62**, 851-891.
- Lucas, B.** (2001). Vergleich der Isoform-spezifischen Aktivierung von B-Raf und c-Raf durch Ras. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Chemie, Bochum, Deutschland.
- Luo, Z., Diaz, B., Marshall, M. S., und Avruch, J.** (1997). An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras und for ras-dependent Raf activation in situ. *Mol Cell Biol* **17**, 46-53.
- Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P. J., Vavvas, D., Marshall, M., und Avruch, J.** (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism [see comments]. *Nature* **383**, 181-185.
- Macara, I. G., Lounsbury, K. M., Richards, S. A., McKiernan, C., und Bar-Sagi, D.** (1996). The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J* **10**, 625-630.
- Machamer, C. E., Mentone, S. A., Rose, J. K., und Farquhar, M. G.** (1990). The E1 glycoprotein of an avian coronavirus is targeted to the cis Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6944-6948.
- Machamer, C. E. und Rose, J. K.** (1987). A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. *J Cell Biol* **105**, 1205-1214.
- Mackay, D. J. und Hall, A.** (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**, 20685-20688.
- Magee, A. I., Gutierrez, L., McKay, I. A., Marshall, C. J., und Hall, A.** (1987). Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J.* **6**, 3353-3357.
- Magee, T. und Marshall, C.** (1999). New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane [comment]. *Cell* **98**, 9-12.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., und Marshall, C. J.** (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* **14**, 3136-3145.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., und Marshall, C. J.** (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, und B-Raf by oncogenic ras und tyrosine kinases. *J.Biol.Chem.* **272**, 4378-4383.
- Marais, R. und Marshall, C. J.** (1996). Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras und Raf. *Cancer Surv* **27**, 101-125.
- Marshall, C. J.** (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* **259**, 1865-1866.
- Marshall, C. J.** (1996a). Cell signalling. Raf gets it together [news; comment]. *Nature* **383**, 127-128.

- Marshall, C. J.** (1996b). Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 197-204.
- Marshall, M. S.** (1995a). Interactions between Ras und Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol Reprod Dev* **42**, 493-499.
- Marshall, M. S.** (1995b). Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* **9**, 1311-1318.
- Marshall, M. S., Davis, L. J., Keys, R. D., Mosser, S. D., Hill, W. S., Scolnick, E. M., und Gibbs, J. B.** (1991). Identification of amino acid residues required for Ras p21 target activation. *Mol Cell Biol* **11**, 3997-4004.
- Martin, C. S., Olesen, C. E. M., Liu, B., Voyta, J. C., Shumway, J. L., Juo, R. R., und Bronstein, I.** (1997). Continuous sensitive detection of b-galactosidase with a novel chemiluminescent 1,2-dioxetane. In 'Bioluminescence und Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons'. (Eds. J. W. Hastings, L. J. Kricka, und P. E. Stanley.)
- Maruta, H., Holden, J., Sizeland, A., und D'Abaco, G.** (1991). The residues of Ras und Rap proteins that determine their GAP specificities. *J.Biol.Chem.* **266**, 11661-11668.
- Maruyama, I. N. und Brenner, S.** (1991). A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 5729-5733.
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J., und Marais, R.** (1999). Serine und tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* **18**, 2137-2148.
- Masserini, M. und Ravasi, D.** (2001). Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains. *Biochim.Biophys.Acta* **1532**, 149-161.
- Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M., und Kikuchi, A.** (1999). Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* **18**, 1303-1312.
- Matsumoto, K., Asano, T., und Endo, T.** (1997). Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene* **15**, 2409-2417.
- McCormick, F. und Wittinghofer, A.** (1996). Interactions between Ras proteins und their effectors. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 449-456.
- McPherson, R. A., Harding, A., Roy, S., Lane, A., und Hancock, J. F.** (1999). Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine und 14-3-3. *Oncogene* **18**, 3862-3869.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., und Brown, D. A.** (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J.Biol.Chem.* **274**, 3910-3917.
- Meloche, S., Pages, G., und Pouyssegur, J.** (1992). Functional expression und growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol Biol Cell* **3**, 63-71.
- Michaud, N. R., Fabian, J. R., Mathes, K. D., und Morrison, D. K.** (1995). 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- und Ras-independent manner. *Mol Cell Biol* **15**, 3390-3397.
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., und Kim, S. H.** (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active und inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-945.
- Milligan, G., Parenti, M., und Magee, A. I.** (1995). The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem.Sci.* **20**, 181-187.

- Mineo, C., Anderson, R. G., und White, M. A.** (1997). Physical association with ras enhances activation of membrane-bound raf (RafCAAX). *J.Biol.Chem.* **272**, 10345-10348.
- Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., und Anderson, R. G.** (1996). Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem* **271**, 11930-11935.
- Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A., und Kolch, W.** (1996). Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol.Cell Biol.* **16**, 5409-5418.
- Mittal, R., Ahmadian, M. R., Goody, R. S., und Wittinghofer, A.** (1996). Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, und GTPase-activating proteins. *Science* **273**, 115-117.
- Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H., und Kaziro, Y.** (2001). Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett.* **507**, 295-298.
- Moffett, S., Brown, D. A., und Linder, M. E.** (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J.Biol.Chem.* **275**, 2191-2198.
- Mongkolsuk, S.** (1988). Novel eukaryotic expression vectors which permit single-stranded replication in *Escherichia coli* und in vitro translational analysis of cloned genes. *Gene* **70**, 313-319.
- Moodie, S. A., Paris, M., Villafranca, E., Kirshmeier, P., Willumsen, B. M., und Wolfman, A.** (1995). Different structural requirements within the switch II region of the Ras protein for interactions with specific downstream targets. *Oncogene* **11**, 447-454.
- Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., und Wolfman, A.** (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 und mitogen-activated protein kinase kinase [see comments]. *Science* **260**, 1658-1661.
- Moore, M. S.** (1998). Ran und nuclear transport. *J Biol Chem* **273**, 22857-22860.
- Moore, S. L., Schaber, M. D., Mosser, S. D., Rands, E., O'Hara, M. B., Garsky, V. M., Marshall, M. S., Pompliano, D. L., und Gibbs, J. B.** (1991). Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem* **266**, 14603-14610.
- Moran, M. F., Koch, C. A., Anderson, D., Ellis, C., England, L., Martin, G. S., und Pawson, T.** (1990). Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8622-8626.
- Morrison, D. K. und Cutler, R. E.** (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 174-179.
- Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R., und Copeland, T. D.** (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* **268**, 17309-17316.
- Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Rapp, U., und Roberts, T. M.** (1988). Signal transduction from membrane to cytoplasm: growth factors und membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation und associated protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8855-8859.
- Moss, J. und Vaughan, M.** (1998). Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* **273**, 21431-21434.
- Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M., und Campbell, S. L.** (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras und phospholipid binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8312-8317.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **51 Pt 1**, 263-273.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.

- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., und Shaw, A. S.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R., und Wittinghofer, A.** (1996). Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal [see comments]. *Nat Struct Biol* **3**, 723-729.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., und Wittinghofer, A.** (1995). 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 analogue. *Nature* **375**, 554-560.
- Naumann, U., Hoffmeyer, A., Flory, E., und Rapp, U. R.** (1996). Raf protein serine/threonine kinase. In 'Protein Phosphorylation'. (Ed. F. Marks.) pp. 203-36. (VCH: Weinheim.)
- Nicholls, A., Sharp, K. A., und Honig, B.** (1991). Protein folding und association: insights from the interfacial und thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281-296.
- Nishizuka, Y.** (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C und its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
- Nishizuka, Y.** (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids und activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.
- Nur-E-Kamal M.S., Sizeland, A., D'Abaco, G., und Maruta, H.** (1992). Asparagine 26, glutamic acid 31, valine 45, und tyrosine 64 of Ras proteins are required for their oncogenicity. *J.Biol.Chem.* **267**, 1415-1418.
- Ohmori, T., Kikuchi, A., Yamamoto, K., Kim, S., und Takai, Y.** (1989). Small molecular weight GTP-binding proteins in human platelet membranes. Purification und characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 22,000. *J.Biol.Chem.* **264**, 1877-1881.
- Ohtsuka, T., Shimizu, K., Yamamori, B., Kuroda, S., und Takai, Y.** (1996). Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. *J Biol Chem* **271**, 1258-1261.
- Okada, T., Hu, C. D., Jin, T. G., Kariya, K., Yamawaki-Kataoka, Y., und Kataoka, T.** (1999). The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases. *Mol Cell Biol* **19**, 6057-6064.
- Okada, T., Masuda, T., Shinkai, M., Kariya, K., und Kataoka, T.** (1996). Post-translational modification of H-Ras is required for activation of, but not for association with, B-Raf. *J Biol Chem* **271**, 4671-4678.
- Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J., und Wittinghofer, A.** (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.
- Pai, E. F., Krengel, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W., und Wittinghofer, A.** (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- Palmer, D. J., Helms, J. B., Beckers, C. J., Orci, L., und Rothman, J. E.** (1993). Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem* **268**, 12083-12089.
- Papin, C., Denouelgaly, A., Laugier, D., Calothy, G., und Eychene, A.** (1998). Modulation of Kinase Activity und Oncogenic Properties by Alternative Splicing Reveals a Novel Regulatory Mechanism for B-Raf. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24939-24947.
- Parker, J. M., Guo, D., und Hodges, R. S.** (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity und X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* **25**, 5425-5432.
- Parton, R. G. und Hancock, J. F.** (2001). Caveolin und Ras function. *Methods Enzymol.* **333**, 172-183.

- Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., und Henkemeyer, M.** (1993). Proteins with SH2 und SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **340**, 279-285.
- Pelech, S. L.** (1996). Kinase connections on the cellular intranet. Signalling pathways. *Curr Biol* **6**, 551-554.
- Pfeffer, S. R.** (1992). GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends In Cell Biology* **2**, 41-46.
- Pizon, V., Chardin, P., Lerosey, I., Olofsson, B., und Tavitian, A.** (1988). Human cDNAs rap1 und rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene* **3**, 201-204.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., und Parton, R. G.** (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies und induces intracellular cholesterol imbalance. *J.Cell Biol.* **152**, 1057-1070.
- Polakis, P. und McCormick, F.** (1993). Structural requirements for the interaction of p21ras with GAP, exchange factors, und its biological effector target. *J Biol Chem* **268**, 9157-9160.
- Prior, I. A. und Hancock, J. F.** (2001). Compartmentalization of Ras proteins. *J.Cell Sci.* **114**, 1603-1608.
- Prior, I. A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R. G., und Hancock, J. F.** (2001). GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat.Cell Biol.* **3**, 368-375.
- Pumiglia, K., Chow, Y. H., Fabian, J., Morrison, D., Decker, S., und Jove, R.** (1995). Raf-1 N-terminal sequences necessary for Ras-Raf interaction und signal transduction. *Mol Cell Biol* **15**, 398-406.
- Quilliam, L. A., Hisaka, M. M., Zhong, S., Lowry, A., Mosteller, R. D., Han, J., Drugan, J. K., Broek, D., Campbell, S. L., und Der, C. J.** (1996). Involvement of the switch 2 domain of Ras in its interaction with guanine nucleotide exchange factors. *J.Biol.Chem.* **271**, 11076-11082.
- Ramstad, C., Sundvold, V., Johansen, H. K., und Lea, T.** (2000). cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating Ser-43 of Raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cell Signal* **12**, 557-563.
- Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H. J., und Stephenson, J. R.** (1983a). Structure und biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4218-4222.
- Rapp, U. R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J. L., Choi, W. C., Pawson, T., Ihle, J. N., und Anderson, W. B.** (1988). raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53 Pt 1**, 173-184.
- Rapp, U. R., Reynolds, F. H. J., und Stephenson, J. R.** (1983b). New mammalian transforming retrovirus: demonstration of a polyprotein gene product. *J Virol* **45**, 914-924.
- Rebollo, A. und Martinez, A.** (1999). Ras proteins: recent advances und new functions. *Blood* **94**, 2971-2980.
- Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., und Barbacid, M.** (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300**, 149-152.
- Reiss, Y., Stradley, S. J., Gierasch, L. M., Brown, M. S., und Goldstein, J. L.** (1991). Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21ras protein farnesyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 732-736.
- Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P., und Rush, M. G.** (1993). Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J Cell Biol* **120**, 313-323.
- Resh, M. D.** (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation und prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* **8**, 403-412.

- Reusch, H. P., Zimmermann, S., Schaefer, M., Paul, M., and Moelling, K.** (2001). Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **276**, 33630-33637.
- Reuther, G. W. und Der, C. J.** (2000). The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 157-165.
- Reynet, C. und Kahn, C. R.** (1993). Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science* **262**, 1441-1444.
- Ridley, A. J. und Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions und actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Rizzo, M. A., Kraft, C. A., Watkins, S. C., Levitan, E. S., and Romero, G.** (2001). Agonist-dependent traffic of raft-associated Ras and Raf-1 is required for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J.Biol.Chem.* **276**, 34928-34933.
- Rommel, C., Clarke, B. A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G. D., und Glass, D. J.** (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* **286**, 1738-1741.
- Rommel, C. und Hafen, E.** (1998). Ras - a versatile cellular switch. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 412-418.
- Rommel, C., Radziwill, G., Lovric, J., Noeldeke, J., Heinicke, T., Jones, D., Aitken, A., und Moelling, K.** (1996). Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene* **12**, 609-619.
- Rommel, C., Radziwill, G., Moelling, K., und Hafen, E.** (1997). Negative regulation of Raf activity by binding of 14-3-3 to the amino terminus of Raf in vivo. *Mech Dev* **64**, 95-104.
- Ron, D. und Kazanietz, M. G.** (1999). New insights into the regulation of protein kinase C und novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**, 1658-1676.
- Roy, M. O., Leventis, R., und Silvius, J. R.** (2000). Mutational und biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* **39**, 8298-8307.
- Roy, S., Lane, A., Yan, J., McPherson, R., und Hancock, J. F.** (1997). Activity of plasma membrane-recruited Raf-1 is regulated by Ras via the Raf zinc finger. *J Biol Chem* **272**, 20139-20145.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., und Parton, R. G.** (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains [see comments]. *Nat Cell Biol* **1**, 98-105.
- Roy, S., McPherson, R. A., Apolloni, A., Yan, J., Lane, A., Clyde-Smith, J., und Hancock, J. F.** (1998). 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro und in vivo. *Mol Cell Biol* **18**, 3947-3955.
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., und Bowtell, D.** (1993). The SH2 und SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1 [see comments]. *Nature* **363**, 83-85.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saikumar, P., Ulsh, L. S., Clanton, D. J., Huang, K. P., und Shih, T. Y.** (1988). Novel phosphorylation of c-ras p21 by protein kinases. *Oncogene Res.* **3**, 213-222.
- Sakoda, T., Kaibuchi, K., Kishi, K., Kishida, S., Doi, K., Hoshino, M., Hattori, S., und Takai, Y.** (1992). smg/rap1/Krev-1 p21s inhibit the signal pathway to the c-fos promoter/enhancer from c-Ki-ras p21 but not from c-raf-1 kinase in NIH3T3 cells. *Oncogene* **7**, 1705-1711.

- Salmeron, A., Ahmad, T. B., Carlile, G. W., Pappin, D., Narsimhan, R. P., und Ley, S. C. (1996). Activation of MEK-1 und SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J* **15**, 817-826.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). 'Molecular Cloning: A laboratory manual.' (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.)
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Schaap, D., de Widt, J., van der, W. J., Vandekerckhove, J., van Damme, J., Gussow, D., Ploegh, H. L., van Blitterswijk, W. J., und van der Bend, R. L. (1990). Purification, cDNA-cloning und expression of human diacylglycerol kinase. *FEBS Lett* **275**, 151-158.
- Schagger, H. und Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Scheffler, J. E., Waugh, D. S., Bekesi, E., Kiefer, S. E., Losardo, J. E., Neri, A., Prinzo, K. M., Tsao, K. L., Wegrzynski, B., Emerson, S. D., und Fry, D. C. (1994). Characterization of a 78-residue fragment of C-Raf-1 that comprises a minimal binding domain for the interaction with Ras-GTP. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 22340-22346.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., und Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation und its loss in oncogenic Ras mutants [see comments]. *Science* **277**, 333-338.
- Schimmöller, F., Itin, C., und Pfeffer, S. (1997). Vesicle traffic: get your coat! *Curr Biol* **7**, R235-R237.
- Schlichting, I., Almo, S. C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E. F., und Petsko, G. A. (1990). Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis [see comments]. *Nature* **345**, 309-315.
- Schönwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., und Parker, P. J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, und atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol.* **18**, 790-798.
- Schultz, A. M., Copeland, T. D., Mark, G. E., Rapp, U. R., und Oroszlan, S. (1985). Detection of the myristylated gag-raf transforming protein with raf-specific antipeptide sera. *Virology* **146**, 78-89.
- Scolnick, E. M., Papageorge, A. G., und Shih, T. Y. (1979). Guanine nucleotide-binding activity as an assay for src protein of rat-derived murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5355-5359.
- Seabra, M. C., Reiss, Y., Casey, P. J., Brown, M. S., und Goldstein, J. L. (1991). Protein farnesyltransferase und geranylgeranyltransferase share a common α subunit. *Cell* **65**, 429-434.
- Sendoh, H., Hu, C. D., Wu, D., Song, C., Yamawaki-Kataoka, Y., Kotani, J., Okada, T., Shima, F., Kariya, K., und Kataoka, T. (2000). Role of Raf-1 conserved region 2 in regulation of Ras-dependent Raf-1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 596-602.
- Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., und Der, C. J. (2000). Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* **10**, 147-154.
- Shinkai, M., Masuda, T., Kariya, K., Tamada, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., und Kataoka, T. (1996). Difference in the mechanism of interaction of Raf-1 und B-Raf with H-Ras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 729-734.
- Shirouzu, M., Fujita-Yoshigaki, J., Ito, Y., Koide, H., Nishimura, S., und Yokoyama, S. (1992). A glutamic acid residue at position 31 of Ras protein is essential to the signal transduction for neurite outgrowth of PC12 cells und the stimulation of GTPase activity by GAPRas. *Oncogene* **7**, 475-480.

- Shirouzu, M., Koide, H., Fujita-Yoshigaki, J., Oshio, H., Toyama, Y., Yamasaki, K., Fuhrman, S. A., Villafranca, E., Kaziro, Y., and Yokoyama, S. (1994). Mutations that abolish the ability of Ha-Ras to associate with Raf-1. *Oncogene* **9**, 2153-2157.
- Sidovar, M. F., Kozlowski, P., Lee, J. W., Collins, M. A., He, Y., and Graves, L. M. (2000). Phosphorylation of serine 43 is not required for inhibition of c-Raf kinase by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 28688-28694.
- Siess, W., Winegar, D. A., and Lapetina, E. G. (1990). Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **170**, 944-950.
- Silverstein, A. M., Grammatikakis, N., Cochran, B. H., Chinkers, M., and Pratt, W. B. (1998). p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J.Biol.Chem.* **273**, 20090-20095.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons, K. und Ikonen, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721-1726.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000). LIPID RAFTS AND SIGNAL TRANSDUCTION. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**, 31-39.
- Simons, K. und Zerial, M. (1993). Rab proteins und the road maps for intracellular transport. *Neuron* **11**, 789-799.
- Slupsky, J. R., Weber, C. K., Ludwig, S., und Rapp, U. R. (1998). Raf-dependent signaling pathways in cell growth und differentiation. In 'Cell Growth und Oncogenesis'. (Eds. P. Bannasch, D. Kanduc, S. Papa, und J. M. Tager.) pp. 75-95. (Birkhäuser: Basel/Switzerland.)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150**, 76-85.
- Sozeri, O., Vollmer, K., Liyanage, M., Frith, D., Kour, G., Mark, G. E., III, und Stabel, S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* **7**, 2259-2262.
- Stahelin, R. V. und Cho, W. (2001). Differential roles of ionic, aliphatic, und aromatic residues in membrane-protein interactions: a surface plasmon resonance study on phospholipases A2. *Biochemistry* **40**, 4672-4678.
- Stancato, L. F., Chow, Y. H., Hutchison, K. A., Perdew, G. H., Jove, R., und Pratt, W. B. (1993). Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 und p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* **268**, 21711-21716.
- Stanton, V. P. J., Nichols, D. W., Laudano, A. P., und Cooper, G. M. (1989). Definition of the human raf amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. *Mol Cell Biol* **9**, 639-647.
- Sternberg, P. W. und Alberola, J. (1998). Conspiracy Theory: RAS und RAF Do Not Act Alone. *Cell* **95**, 447-450.
- Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M., und Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane [see comments] [published erratum appears in Science 1994 Dec 16;266(5192):1792-3]. *Science* **264**, 1463-1467.
- Stokoe, D. und McCormick, F. (1997). Activation of c-Raf-1 by Ras und Src through different mechanisms: activation in vivo und in vitro. *EMBO J* **16**, 2384-2396.
- Storm, S. M., Cleveland, J. L., und Rapp, U. R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* **5**, 345-351.
- Stryer, L. (1979). „Biochemie“; 3. Auflage (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin.)

- Suhasini, M., Li, H. E., Lohmann, S. M., Boss, G. R., und Pilz, R. B. (1998). Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Inhibits the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 6983-6994.
- Sun, H., King, A. J., Diaz, H. B., und Marshall, M. S. (2000). Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac und Pak. *Curr Biol* **10**, 281-284.
- Swift, A. M. und Machamer, C. E. (1991). A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Biol* **115**, 19-30.
- Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R., und Chang, E. H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**, 143-149.
- Tamada, M., Hu, C. D., Kariya, K., Okada, T., und Kataoka, T. (1997). Membrane recruitment of Raf-1 is not the only function of Ras in Raf-1 activation. *Oncogene* **15**, 2959-2964.
- Tanaka, K., Lin, B. K., Wood, D. R., und Tamanoi, F. (1991). IRA2, an upstream negative regulator of RAS in yeast, is a RAS GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 468-472.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H. O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., und Yokoyama, K. (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli. *Nucleic Acids Res* **22**, 2857-2858.
- Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karim, F. D., Wassarman, D. A., und Rubin, G. M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction [see comments]. *Cell* **83**, 879-888.
- Therrien, M., Michaud, N. R., Rubin, G. M., und Morrison, D. K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes Dev* **10**, 2684-2695.
- Thorson, J. A., Yu, L. W. K., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnicaworms, H., und Shaw, A. S. (1998). 14-3-3 Proteins Are Required for Maintenance of Raf-1 Phosphorylation und Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 5229-5238.
- Toker, A., Ellis, C. A., Sellers, L. A., und Aitken, A. (1990). Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain und sequence similarity to lipocortins und 14-3-3 protein. *Eur J Biochem* **191**, 421-429.
- Tong, L., Milburn, M. V., de Vos, A. M., und Kim, S. H. (1989). Structure of ras proteins [letter]. *Science* **245**, 244.
- Trahey, M. und McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**, 542-545.
- Traverse, S., Cohen, P., Paterson, H., Marshall, C., Rapp, U., und Grand, R. J. (1993). Specific association of activated MAP kinase kinase kinase (Raf) with the plasma membranes of ras-transformed retinal cells. *Oncogene* **8**, 3175-3181.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 205-215.
- Troppmair, J., Bruder, J. T., App, H., Cai, H., Liptak, L., Szeberenyi, J., Cooper, G. M., und Rapp, U. R. (1992). Ras controls coupling of growth factor receptors und protein kinase C in the membrane to Raf-1 und B-Raf protein serine kinases in the cytosol. *Oncogene* **7**, 1867-1873.
- Troppmair, J., Bruder, J. T., Munoz, H., Lloyd, P. A., Kyriakis, J., Banerjee, P., Avruch, J., und Rapp, U. R. (1994). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, und 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf und is necessary for transformation. *J Biol Chem* **269**, 7030-7035.
- Tzivion, G., Luo, Z., und Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**, 88-92.

- Urabe, M., Kume, A., Tobita, K., und Ozawa, K.** (2000). DNA/Calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable und maintain high transfection efficiency. *Anal Biochem* **278**, 91-92.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., und Sander, C.** (1991). The ras protein family: evolutionary tree und role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648.
- Valverde, A. M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J., und Rozengurt, E.** (1994). Molecular cloning und characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol und phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8572-8576.
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., und Wigler, M.** (1993). Complex formation between RAS und RAF und other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6213-6217.
- Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C.** (1997). Rho GTPases und signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322.
- van den, B. N., Cool, R. H., und Wittinghofer, A.** (1999). Discriminatory residues in Ras und Rap for guanine nucleotide exchange factor recognition. *J Biol Chem* **274**, 11078-11085.
- Van Lint, J. V., Sinnett-Smith, J., und Rozengurt, E.** (1995). Expression und characterization of PKD, a phorbol ester und diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. *J.Biol.Chem.* **270**, 1455-1461.
- Varshavsky, A.** (1992). The N-end rule. *Cell* **69**, 725-735.
- Voet, D. und Voet, J. G.** (1990). „Biochemie“ (VCH-Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.)
- Vogelstein, B. und Kinzler, K. W.** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**, 138-141.
- Vojtek, A. B. und Der, C. J.** (1998). Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* **273**, 19925-19928.
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., und Cooper, J. A.** (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214.
- Völkert, M., Wagner, M., Peters, C., und Waldmann, H.** (2001). The chemical biology of Ras lipidation. *Biol.Chem.* **382**, 1133-1145.
- Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S., und Stork, P. J.** (1997). cAMP activates MAP kinase und Elk-1 through a B-Raf- und Rap1-dependent pathway. *Cell* **89**, 73-82.
- Warne, P. H., Viciano, P. R., und Downward, J.** (1993). Direct interaction of Ras und the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* **364**, 352-355.
- Wartmann, M. und Davis, R. J.** (1994). The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* **269**, 6695-6701.
- Waxman, L. und Goldberg, A. L.** (1986). Selectivity of intracellular proteolysis: protein substrates activate the ATP-dependent protease (La). *Science* **232**, 500-503.
- Weber, C. K., Slupsky, J. R., Kalmes, H. A., und Rapp, U. R.** (2001). Active Ras induces heterodimerization of c-Raf und B-Raf. *Cancer Res.* **61**, 3595-3598.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D., und Fitzpatrick, J. D.** (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal.Biochem.* **175**, 231-237.
- Wiesmüller, L. und Wittinghofer, F.** (1994). Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal* **6**, 247-267.
- Williams, J. G., Drugan, J. K., Yi, G. S., Clark, G. J., Der, C. J., und Campbell, S. L.** (2000). Elucidation of binding determinants und functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions. *J Biol Chem* **275**, 22172-22179.

- Williams, N. G., Roberts, T. M., und Li, P.** (1992). Both p21ras und pp60v-src are required, but neither alone is sufficient, to activate the Raf-1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2922-2926.
- Winkler, D. G., Cutler, R. E., Drugan, J. K., Campbell, S., Morrison, D. K., und Cooper, J. A.** (1998). Identification of Residues in the Cysteine-rich Domain of Raf-1 That Control Ras Binding und Raf-1 Activity. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 21578-21584.
- Wittinghofer, A.** (1998). Signal Transduction via Ras. *Biological Chemistry* **379**, 933-937.
- Wittinghofer, A. und Herrmann, C.** (1995). Ras-effector interactions, the problem of specificity. *FEBS Lett* **369**, 52-56.
- Wittinghofer, A. und Nassar, N.** (1996). How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* **21**, 488-491.
- Wittinghofer, A. und Pai, E. F.** (1991). The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* **16**, 382-387.
- Wolthuis, R. M., Bauer, B., van't Veer, L. J., de Vries-Smits, A. M., Cool, R. H., Spaargaren, M., Wittinghofer, A., Burgering, B. M., und Bos, J. L.** (1996). RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras und Rap 1A-associating protein. *Oncogene* **13**, 353-362.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J., und Sturgill, T. W.** (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate [see comments]. *Science* **262**, 1065-1069.
- Xia, K., Mukhopadhyay, N. K., Inhorn, R. C., Barber, D. L., Rose, P. E., Lee, R. S., Narsimhan, R. P., D'Andrea, A. D., Griffin, J. D., und Roberts, T. M.** (1996). The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21ras-dependent manner. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11681-11686.
- Xing, H. R. und Kolesnick, R.** (2001). Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1. *J.Biol.Chem.* **276**, 9733-9741.
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., und Hancock, J. F.** (1998). Ras Isoforms Vary in Their Ability to Activate Raf-1 und Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24052-24056.
- Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S., und Kolesnick, R.** (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* **378**, 307-310.
- Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., und White, S. H.** (1998). The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **37**, 14713-14718.
- Yee, W. M. und Worley, P. F.** (1997). Rheb interacts with Raf-1 kinase und may function to integrate growth factor- und protein kinase A-dependent signals. *Mol Cell Biol* **17**, 921-933.
- Yip-Schneider, M. T., Miao, W., Lin, A., Barnard, D. S., Tzivion, G., und Marshall, M. S.** (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation und 14-3-3 association. *Biochem J* **351**, 151-159.
- Yokoyama, K., Goodwin, G. W., Ghomashchi, F., Glomset, J. A., und Gelb, M. H.** (1991). A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5302-5306.
- York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W., und Stork, P. J.** (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor [see comments]. *Nature* **392**, 622-626.
- Zhang, B. H. und Guan, K. L.** (2001). Regulation of the Raf kinase by phosphorylation. *Exp.Lung Res.* **27**, 269-295.

- Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., und Hurley, J. H. (1995a). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C δ in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917-924.
- Zhang, K., Noda, M., Vass, W. C., Papageorge, A. G., und Lowy, D. R. (1990). Identification of small clusters of divergent amino acids that mediate the opposing effects of ras und Krev-1. *Science* **249**, 162-165.
- Zhang, K., Papageorge, A. G., Martin, P., Vass, W. C., Olah, Z., Polakis, P. G., McCormick, F., und Lowy, D. R. (1991). Heterogeneous amino acids in Ras und Rap1A specifying sensitivity to GAP proteins. *Science* **254**, 1630-1634.
- Zhang, X. F., Marshall, M. S., und Avruch, J. (1995b). Ras-Raf complexes in vitro. *Methods Enzymol* **255**, 323-331.
- Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R., und Avruch, J. (1993). Normal und oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**, 308-313.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., McGinley, M., P.Y., Lichenstein, H., und Kolesnick, R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89**, 63-72.
- Zimmermann, S. und Moelling, K. (1999). Phosphorylation und regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286**, 1741-1744.
- Zwartkruis, F. J. und Bos, J. L. (1999). Ras und Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp Cell Res* **253**, 157-165.
- Zwartkruis, F. J. T., Wolthuis, R. M. F., Nabben, N. M. J. M., Franke, B., und Bos, J. L. (1998). Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *EMBO Journal* **17**, 5905-5912.
- Zwerver, K. and Hirt, H. (2001). Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biol.Chem.* **382**, 1123-1131.

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom August 1997 bis August 2001 in der Abteilung für *Strukturelle Biologie* des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Dr. C. Block und Prof. Dr. A. Wittinghofer angefertigt.

Prof. A. Wittinghofer danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation in seiner sympathischen Abteilung.

Dr. C. Block danke ich für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas.

Prof. W. Kunz danke ich für die Anfertigung des Erstgutachtens.

Prof. R. Wagner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung *Strukturelle Biologie*, welche zu dem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt Beate Voß für die Übernahme zahlreicher organisatorischer Aufgaben, die Einweisung in die verschiedenen Methoden der Arbeitsgruppe sowie für die Bereitstellung diverser Laborutensilien und ihrer in langjähriger Laborpraxis erworbenen Erfahrung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Johannes Jöckel, Martina Daub, Jens Tränkle und Rolf Wagner mit denen ich neben aller Arbeit trotzdem sehr viel Spaß hatte und die mich dadurch den (zuweilen) trockenen und frustrierenden Laboralltag vergessen ließen.

Johannes Jöckel, Holger Rehmann, Jens Tränkle und Rolf Wagner danke ich für ihr reges Interesse an meiner Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und für die zahlreichen Anregungen die sich daraus ergaben.

Spezieller Dank gilt Jens Tränkle und Rolf Wagner für ihre Ratschläge und Unterstützung in Sachen Computer-Hardware und -Software.

Bei den Leidensgenossen Holger Rehmann und Udo Kirschner bedanke ich mich für die zahlreichen, unterhaltsamen Gespräche während der Nutzung des öffentlichen Nahverkehrs.

Ich danke Belén Lucas, die ich das Vergnügen hatte im Rahmen der Anfertigung ihrer Diplomarbeit betreuen zu dürfen, für ihre große Einsatzbereitschaft.

Den verschiedenen Beschäftigten der Zentralen Einrichtungen des Max-Planck-Instituts danke ich für ihre freundliche Unterstützung.

Den Eheleuten H. & H.W. Heidmann danke ich für die großzügige Bereitstellung der Dachkammer während der Zeit des Niederschreibens dieser Dissertationsschrift.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mich in dessen Verlauf sowie in der Zeit meiner Promotion in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Anneke Heidmann sowie meinen Kindern Carolin und Julian für ihre Nachsicht, daß das Familienleben häufig zugunsten der wissenschaftlichen Arbeit in den Hintergrund treten mußte.

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertation eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorgelegte Dissertation ist in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht worden.

Düsseldorf, im Juli 2002

(Th. Quack)