

Charakterisierung von assoziierten Proteinen der Protein Kinase Raf-1

**Von dem Fachbereich für Biologie
der Universität Hannover**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer.nat.)**

**Genehmigte Dissertation vorgelegt von
Dipl. Biol. Marc Dangers**

Geboren am 15.12.1973 in Rotenburg (Wümme)

Erscheinungsjahr: 2003

**Angefertigt in der Abteilung für Nephrologie der Medizinischen Hochschule
Hannover**

Zusammenfassung

Die Protein Kinase Raf-1 als Teil der klassischen Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) Kaskade stellt eine zentrale Schnittstelle der mitogenen Signaltransduktion in der Zelle dar. Ihre einzigen anerkannten Substrate sind die Mitogen-Extracellular-Activated Kinasen (MEK) 1/2, jedoch sind vielfach Wirkungen von Raf-1 beschrieben, die unabhängig von der Phosphorylierung von MEK sind. Die Effektoren dieser Wirkung, sei es in Form von Substraten oder anderer Interaktionspartner, sind bisher unbekannt. Damit eine Wirkung durch Raf-1 auf einen Effektor möglich ist, muß eine wenn auch kurzzeitige Assoziation der Partner erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von (Glutathione-S-Transferase) (GST) Pulldowns mit rekombinantem Raf-1 („full length“ Protein und sinnvoll gewählte Fragmente) u.a. zwei bisher nicht in dieser Funktion beschriebene assoziierte Proteine von Raf-1 gefunden. Diese Proteine wurden mittels Massenspektrometrie als HSP70 (heat shock protein 70) und GRP78 (glucose related protein 78) identifiziert, zwei Vertretern der HSP70 Familie von Chaperonen. Die Assoziationen wurden anhand eines Immuno-Blots von GST-Pulldowns und Immunopräzipitations Assays in einer humanen Endothelzelllinie und murinen Fibroblasten validiert.

Eine direkte Einflußnahme dieser Assoziation auf die Kinase Aktivität von Raf-1 konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen nicht gezeigt werden. Assoziationsexperimente mit Mutanten von Raf-1 zeigten eine verringerte Bindung von HSP/GRP an die konstitutiv aktive, membrangebundene Mutante CAAX-Raf-1. Diese Befunde ließen eine stabilisierende Wirkung der HSP/GRP Assoziation vermuten. Im Zusammenspiel mit neuesten Befunden (Doong et al., 2003), die Raf-1 in einem vom Co-Chaperone CAIR-1 regulierten HSP70-HSP90-Komplex beschreiben, wurde in der vorliegenden Arbeit der erste direkte Beleg für eine Beteiligung von HSP70 an der Stabilisierung von Raf-1 gezeigt.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Beziehung zwischen Protein Kinase A (PKA) induzierter Inhibition von Raf-1 und der Bindung von Raf-1 mit 14-3-3 untersucht. Die Rolle von 14-3-3 in der Inhibition der Kinase Aktivität von Raf-1 durch PKA abhängige Phosphorylierung wird in der neueren Literatur kontrovers diskutiert. Es scheint sich ein Modell durchzusetzen, das 14-3-3 Bindung als Folge der PKA

abhängigen Phosphorylierung von Raf-1 sieht, die nachfolgend die Rekrutierung von Raf-1 zur Membran und damit verknüpfte Aktivierung verhindert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte anhand von Versuchen mit Mutanten von Raf-1 übereinstimmend mit der *in vivo* Literatur gezeigt werden, daß Serin S259 eine wichtige Rolle in 14-3-3 abhängigen Vorgängen einnimmt und der Einfluß von Serin 621 im Gegensatz dazu weniger stark zu bewerten ist. Abweichend von der *in vivo* Situation konnte erstmals gezeigt werden, daß die Zugabe von 14-3-3 vor der PKA induzierten Inhibition der Kinase Aktivität von Raf-1 schützt.

Abstract

The protein kinase Raf-1 is a key modulator of the classical mitogen activated protein kinase (MAPK) cascade. It is well known as a central interface for integration of mitogenic signal transduction, and its involvement in different cellular events such as transformation, differentiation and apoptosis has been discussed. Plenty of evidence suggest that influence of Raf-1 is not limited to indirect action via MEK, but either via alternative substrates or even through kinase-independent mechanisms. Both substrates and other effectors need to be associated with Raf-1 in order to interact. Based on this, we searched for novel associated proteins of Raf-1 using a glutathione-S-transferase (GST)-pull-down strategy.

In the course of this Ph.D. thesis, two novel associated proteins of Raf-1 were found and identified by mass spectroscopy as heat shock protein 70 (HSP70) and glucose regulated protein 78 (GRP78), two members of the HSP70-family of molecular chaperones. Association of HSP70 and GRP78 was validated using western blots of GST-pulldowns and immunoprecipitation assays of murine fibroblasts and humane endothelial cells.

A direct influence of association with HSP/GRP on Raf-1 kinase activity could not be shown in multiple experiments. Association experiments using mutants of Raf-1 showed a decreased binding of HSP/GRP to a membrane targeted mutant of Raf-1. This hinted towards a protective and/or stabilizing role of association of HSP/GRP. In concert with very recent findings, which describe a role of co-chaperone CAIR-1 in regulating a HSP90-HSP70 complex for a variety of kinases including Raf-1 (Doong et al., 2003), this work shows the first direct evidence, that HSP70 is part of a stabilising multi-protein complex regulating Raf-1 stability.

Furthermore, the relationship between protein kinase A (PKA) induced inhibition of Raf-1 and binding of 14-3-3 to Raf-1 was investigated. The role of 14-3-3 in the inhibition of kinase activity of Raf-1 through PKA mediated phosphorylation has been discussed in recent literature quite controversial. An emerging comprehensive model seems to be that 14-3-3 is binding to Raf-1 as a consequence of PKA phosphorylation of Raf-1. Consecutively, sequestration of Raf-1 to the plasma membrane and thus activation of Raf-1 is abolished.

Using Mutants of Raf-1, the importance of the S259 site concerning binding of 14-3-3 was stressed in the present work, whereas also in agreement with recent literature covering the *in vivo* situation, the role of S621 was de-emphasised. Opposed to literature, it could be shown for the first time that addition of 14-3-3 *in vitro* is rescuing Raf-1 from PKA mediated Inhibition of Raf-1 Kinase activity.

Schlagwörter

Raf-1, HSP70, 14-3-3

Keywords

Raf-1, HSP70, 14-3-3

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Schlagwörter	5
Inhaltsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Die Raf Familie der Protein Kinasen	10
1.1.1 Struktur und Einteilung	11
1.1.2 Regulation und Aktivierung	13
1.2 Funktion und biologische Rolle	15
1.3 Die 14-3-3 Familie molekularer Regulatoren	17
1.3.1 14-3-3 Isoformen und Struktur	17
1.3.2 14-3-3 und Raf-1	18
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Reagenzien/Materialien	22
2.1.1. Antikörper	23
2.1.2. Kits	24
2.1.3. Standardlösungen und – puffer	24
2.1.4. Biologisches Material	24
Bakterienstämme	24
Eukaryotische Zell-Linien	25
2.2. Methoden	25
2.2.1. Mikrobiologische Techniken	25
Kultivierung von Bakterien	25

Transformation von Bakterien	25
2.2.2. Eukaryotische Zellkultur	26
Kultivierung von Insektenzellen	26
Kultivierung und Transfektion von Endothelzellen/NIH 3T3	27
Kryokonservierung	27
2.2.3. Molekularbiologische Techniken	28
Plasmidpräparation	28
Konzentrationsbestimmung von DNA	28
Analytische Agarosegelelektrophorese	28
2.2.4. Biochemische Techniken	28
Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E.coli	30
GST-Pulldown Assays mit rekombinanten Fusionsproteinen	30
SDS Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	31
Isolation von Proteinen aus Polyacrylamidgelen	32
Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie	32
Western-Blot	32
Immunpräzipitation	33
<i>In vitro</i> Kinase-assay	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Identifikation von neuartigen assoziierten Proteinen von Raf-1	35
3.1.1 Etablierung eines GST-pulldown Systems mit rekombinatem Raf-1	35
3.1.2 Die zellulären Chaperone HSP70 und GRP78 assoziieren mit Raf-1 <i>in vitro</i>	37
3.1.2.1 Identifikation der assoziierten Proteine mittels MS	38
3.1.2.2 Bestätigung der Identität der assoziierten Proteine mittels Western-Blot	41
3.1.3 HSP70 und GRP78 assoziieren mit Raf-1 <i>in vivo</i>	42
3.1.4 Die Kinase Aktivität von Raf-1 wird nicht direkt von HSP70/GRP78 reguliert	43
3.1.5 Die Affinität von HSP70/GRP78 ist selektiv für verschiedene Raf-1 Mutanten	44

3.2	Einfluss von 14-3-3 auf die Regulation von Raf-1 durch PKA	45
3.2.1	Die PKA vermittelte Inhibition von Raf-1 wird durch 14-3-3 aufgehoben	45
3.2.2	Die Wirkung von 14-3-3 ist unterschiedlich in Raf-1 Mutanten	46
3.2.3	Einfluss von Mutationen von 14-3-3 auf die Reversion der Inhibition	47

4 Diskussion **49**

4.1	GST-Pulldown Experimente mit GST-Raf-1	49
4.2	HSP70 und GRP78	50
4.3	Über die physiologische Relevanz der Assoziation von GRP/HSP und Raf	52
4.4	Über die Rolle von 14-3-3 in der PKA vermittelten Inhibition von Raf-1	55

5. Literaturverzeichnis **58**

Abkürzungsverzeichnis	70
Danksagung	74
Eidesstattliche Erklärung	75
Lebenslauf	76
Wissenschaftliche Publikationen:	78
 Rückseite der Seite 1	 79

1 Einleitung

Die intrazelluläre Signaltransduktion über MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Signalwege wurde in bisher allen untersuchten eukaryotischen Organismen gefunden. Diese Signalkaskaden zeichnen sich durch eine Abfolge von drei Kinasen aus, wobei die namensgebende MAPK durch eine dual-spezifische MAPK Kinase phosphoryliert und aktiviert wird, die wiederum von einer MAPK Kinase Kinase phosphoryliert und aktiviert wird (Übersicht in (Kolch, 2000), (Weston et al., 2002), (Robinson and Cobb, 1997)). In Säugerzellen wurden bisher fünf verschiedene MAPK Signalwege charakterisiert, die in Abb. 1.1 dargestellt werden.

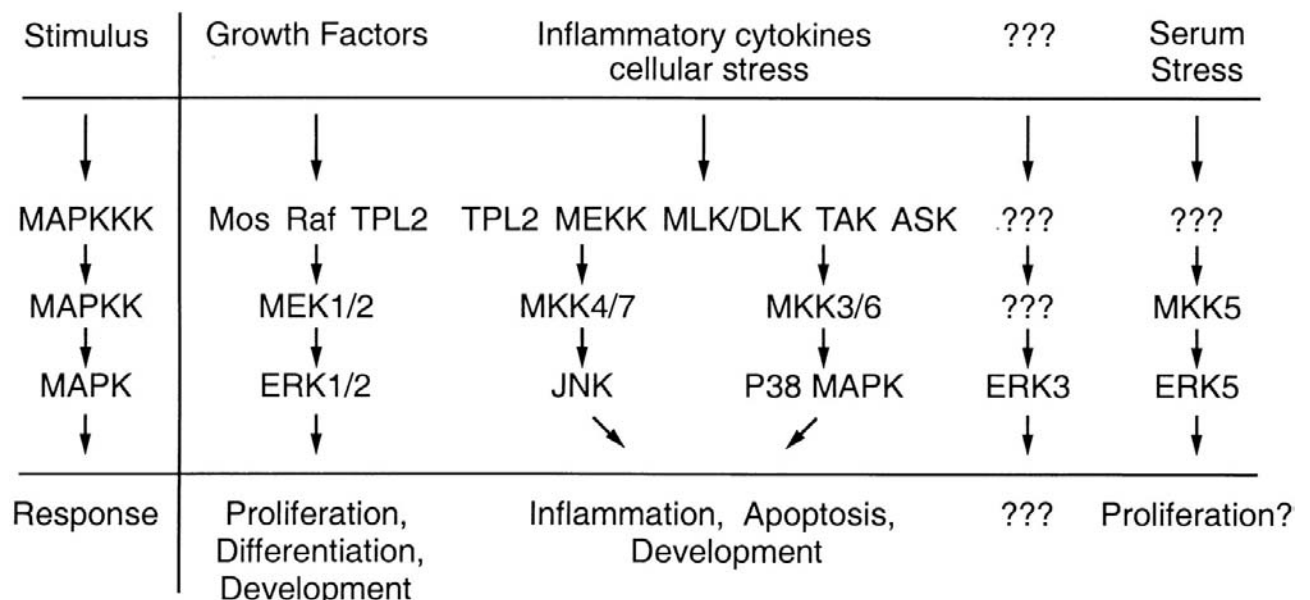


Abb.1.1 *Übersicht über mammalische MAPK Signalwege (verändert nach (Kolch, 2000))*

In der vorliegenden Arbeit wird die ERK1/2 (Extrazellulär regulierte Kinase) MAPK Kaskade betrachtet und vor allem die an ihrem Apex liegende Protein Kinase Raf-1 untersucht, welche eine ausschlaggebende Bedeutung in der Regulation dieses Signalweges hat. Der Raf-1/MEK/ERK Weg ist ein Ziel des kleinen G-Proteins Ras, welches in 30% aller humanen Krebsarten mutiert ist (Chong et al., 2003), Sowohl diese Involvierung von ras als auch der Umstand, das auch Untersuchungen von B-raf in einen Screen von 530 verschiedenen Krebszelllinien in hohem Masse mutiert gefunden wurde (Davies et al., 2002) sind ein Beleg für die starke Involvierung der

MAPK Kaskade in Entartungen der proliferativen Kontrolle der Zelle und die eher steigende Wichtigkeit des ersten vollständig beschriebenen Signaltransduktionswegs der eukaryotischen Zelle. Im folgende soll die kleine Familie der Raf-Kinasen vorgestellt und in Ihrer Funktion beschrieben werden.

1.1 Die Raf Familie der Protein Kinasen

Die Raf Familie umfaßt drei Gene, Raf-1, A-raf und B-raf, welche für Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen kodieren. Im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten Raf-1 werden A-raf und B-raf gewebespezifisch exprimiert. A-raf wird vor allem in den Geweben des Urogenitaltraktes exprimiert, B-raf in Gehirn und Hoden (Übersicht von (Storm et al., 1990)). Während wenig über A-raf und B-raf bekannt ist, sind Funktion und Regulation von Raf-1 relativ gut charakterisiert (schematisch zusammengefaßt in Abb. 1.1; Übersicht von (Daum et al., 1994), (Kolch, 2000), (Avruch et al., 2001))

1.1.1 Struktur und Einteilung

Die Struktur der Raf Kinasen ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

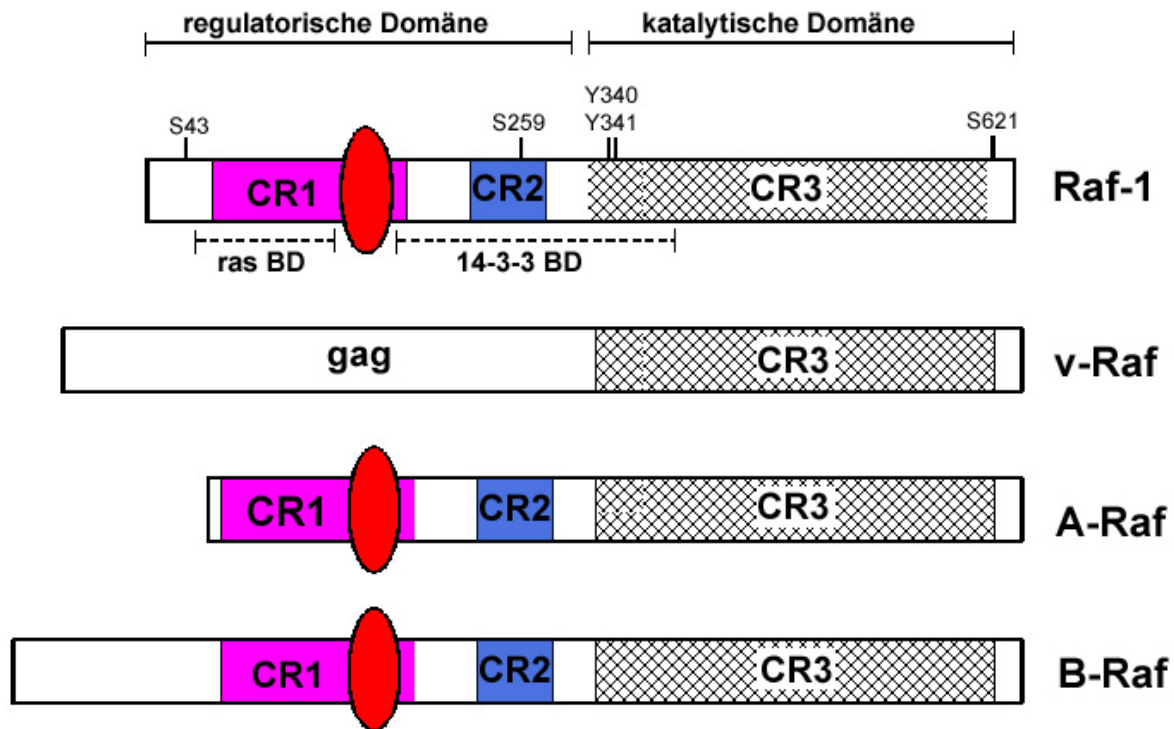


Abb. 1.2: *Struktur der Raf Kinasen. Die konservierten Regionen (CR) sind hervorgehoben. Das Zinkfinger Motiv in CR1 ist durch eine Ellipse dargestellt. Für Raf-1 ist eine Auswahl der bislang kartierten Phosphorylierungsstellen angeführt sowie die Bindungsdomänen für Ras (Ras BD) und 14-3-3 Proteine (14-3-3 BD).*

Die drei bekannten zellulären Raf Protoonkogene (Raf-1, A-raf und B-raf) besitzen eine regulatorische und eine katalytische Domäne mit Serin / Threonin spezifischer Kinase-Aktivität. Im v-raf Onkogen ist die regulatorische Domäne deletiert und durch Sequenzen des retroviralen gag Proteins ersetzt (Rapp et al., 1983) Dies führt zu einer Deregulation der Kinasedomäne und zur Zelltransformation. Deletion der regulatorischen Domäne führt bei allen drei Raf Isoenzyme zur Aktivierung der onkogenen Eigenschaften (Stanton, Jr. and Cooper, 1987), (Heidecker et al., 1990), (Daum et al., 1994). Aufgrund von Sequenzvergleichen lassen sich drei konservierte Regionen, CR1-3, abgrenzen. Strukturell unterscheiden sich die drei Raf Isoformen

besonders in der Länge und Sequenz der Region aminoterminal von CR1 (Daum et al., 1994).

CR1 enthält die Ras Bindungsstelle (RBD) (Aminosäuren 53-132 in Raf-1). *In vitro* können alle drei Raf Isoenzyme spezifisch an aktiviertes, d.h. GTP beladenes, Ras binden (Vojtek et al., 1993), (Moodie et al., 1994). Die wichtige Rolle der Ras Bindung für die Raf Aktivierung *in vivo* ist bisher für Raf-1 dokumentiert. Nach der Ras Bindung an Raf-1 kommt es zur Translokation an die Membran, hierfür ist die RBD notwendig und ausreichend (Luo et al.,). Überexpression von CR1 hemmt die normale Raf-1 Funktion, wahrscheinlich aufgrund der Konkurrenz um die Ras Bindung (Kolch et al., 1991), (Bruder et al., 1992). CR1 besitzt außerdem ein sogenanntes "Zinkfinger" Motiv. Obwohl besser bekannt als DNA Bindungsdomäne von Transkriptionsfaktoren, vermitteln ähnliche Motive auch Protein-Protein sowie Protein-Lipid Interaktionen. Ein verwandtes Zinkfingermotiv in der regulatorischen Region von PKC bindet Aktivatoren, wie Phorbolster und den physiologischen Aktivator Diacylglycerol. Die Bindung von Phorbolestern an den Raf Zinkfinger konnte allerdings ausgeschlossen werden (Kazanietz et al., 1994), (Ghosh et al., 1994). Wahrscheinlich wichtigste Aufgabe des Zinkfingeranteils der CR1 ist jedoch die Interaktion mit Ras, welches zur Aktivierung farnesyliert sein muß (Williams et al., 2000) und zwingend notwendig zur Aktivierung von Raf-1. Eine Mutante von Raf-1, in der der Zinkfingeranteil durch den homologen Abschnitt aus dem Diacylglycerol-aktivierbaren PKC γ ausgetauscht wurde, konnte durch EGF nur minimal aktiviert werden, während eine deutliche Aktivierbarkeit durch Phorbolmyristataacetat eingebracht wurde (Luo et al.,).

CR2 ist eine Serin/Threonin-reiche Domäne mit regulativer Funktion. Deletion (Ishikawa et al., 1988) oder Mutation (Heidecker et al., 1990) dieser Sequenz führt zur onkogenen Aktivierung von Raf-1. Neben der hauptsächlich *in vitro* Autophosphorylierungsstelle T268 (Morrison et al., 1993) enthält diese Region auch den Serin-Rest S259, welcher sowohl in der Aktivierung von Raf-1 (Dhillon et al., 2002b) als auch in der Bindung von 14-3-3 Proteinen eine wichtige Rolle spielt.

CR3 schließlich entspricht im wesentlichen der katalytischen Kinase Domäne und ist sowohl innerhalb der Raf-Familie als auch im Vergleich mit anderen Serin/Threonin

Proteinkinasen hoch konserviert (Hagemann and Rapp, 1999). Sie umfasst eine ATP-bindende Region, eine Aktivierungsregion und elf Subdomänen.

1.1.2 Regulation und Aktivierung

Die Aktivität der Raf-1 Kinase wird durch Behandlung von Zellen mit Tumorpromotoren aus der Klasse der Phorbolster, z.B. TPA, sowie durch eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimuliert. Dazu gehören Peptidfaktoren, wie PDGF, EGF, TGF β , NGF, Insulin, IGF-1, FGF, CSF-1, Stammzellfaktor/Kit-Ligand, die an Tyrosinkinase Rezeptoren binden, sowie Zytokine (Erythropoetin, GM-CSF) und Interleukine (IL-2, IL-3, IL-9), welche an Rezeptoren binden, die keine enzymatische Aktivität besitzen, aber mit Tyrosinkinasen assoziiert vorliegen. Weiters gehören dazu Liganden für Rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen (TMD), wie Thrombin, Lysophosphatidylsäure und Muskarin. Auch die Vernetzung von B- oder T-Zell Rezeptoren führt zur Raf-1 Aktivierung. Obwohl eine Assoziation von Raf-1 mit einigen Rezeptoren gezeigt wurde, erfolgt die Aktivierung von Raf-1 durch Oberflächenrezeptoren in der Regel nicht direkt, sondern über intrazelluläre Intermediate (Kolch, 2000), (Daum et al., 1994), (Kerkhoff and Rapp, 2001).

Die Stimulation vieler Rezeptoren induziert den Austausch von GDP gegen GTP von Ras Proteinen, wodurch Ras aktiviert wird. Aktiviertes Ras kann Raf-1 mit hoher Affinität und Stöchiometrie binden (Übersicht in (Avruch et al., 2001), (Kerkhoff and Rapp, 2001)). Dadurch wird Raf-1 aus dem Zytosol an die Zellmembran transloziert, wo es durch Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten aktiviert bzw. in seiner Aktivität reguliert wird (Übersicht in (Dhillon et al., 2002a)). Dabei könnten membranständige Kinasen, wie Src oder aktivierte PKC, beteiligt sein. Diese Vermutung stützt sich historisch auf folgende Beobachtungen. In mit v-src, aber nicht in v-ras, transformierten Zellen ist Raf-1 konstitutiv aktiviert und hyperphosphoryliert (Reed et al., 1991). Andererseits führt die Expression von Src zusammen mit Raf-1 im Baculovirus/Sf-9 Zell Expressionssystem nur zu einer partiellen Aktivierung von Raf-1. Maximale Raf-1 Aktivierung kann aber durch die Koexpression von Raf-1, Ras und Src erreicht werden (Stokoe and McCormick, 1997), (Williams et al., 1992)

Die bislang identifizierten Phosphorylierungsstellen befinden sich sowohl in der regulatorischen als auch in der katalytischen Domäne. In ruhenden Zellen liegt Raf-1 bereits als Phosphoprotein vor, das an den Serinresten 43, 259 und 621 phosphoryliert ist (Morrison et al., 1993). Die Phosphorylierung dieser drei Reste wird der cAMP abhängigen Protein Kinase A (PKA) zugeschrieben (Dhillon et al., 2002b), (Mischak et al., 1996), (Wu et al., 1993) die Regulierung von Raf-1 durch PKA wird weiter unten diskutiert. Die Behandlung von Zellen mit Mitogenen verstärkt vorhandene Phosphorylierungen und induziert auch Phosphorylierung an neuen Stellen, wie z.B an Serin 338 und Tyrosin 341. Diese beiden Phosphorylierungen in der Aktivierungsschleife von Raf-1 ergeben zusammen genommen eine starke Aktivierung von Raf-1 (Mason et al., 1999), (Diaz et al., 1997). Die Raf-1 Aktivierung am Tyrosinrest 341 erfolgt durch Tyrosinkinasen aus der Src Familie (Fabian et al., 1993). Auch Kinasen aus der JAK Familie (Stancato et al., 1997) und abl (Weissinger et al., 1997) phosphorylieren Raf-1 an Tyrosinresten, jedoch ist nicht geklärt, ob auch hier Y-341 oder andere Tyrosinreste betroffen sind. Die Phosphorylierung von S-338 erfolgt durch die p21cdc42/rac1-activated serin/threonin Kinase (PAK) als Effektor von PI3K (King et al., 1998).

Abgesehen von Src sind weitere Tyrosinkinasen als potentielle intermediäre Raf-1 Aktivatoren identifiziert worden. Dazu gehören die Src-verwandten Tyrosinkinasen Fyn (Cleghon and Morrison, 1994) und Lck (Thompson et al., 1991), welche in T-Zellen exprimiert wird, sowie die Serin/Threonin-Kinase PKC (Sozeri et al., 1992), (Kolch et al., 1993a), (Carroll and May, 1994). Es wurde gezeigt, daß PKC alpha *in vitro* und *in vivo* Raf-1 durch Phosphorylierung an Serin499 und Serin259 aktiviert. Mutation eines jeden der beiden Serin Reste blockiert Stimulierung der Raf-1 Kinase durch PKCalpha. Beide Mutanten sind allerdings immer noch durch die Kombination von Ras und Lck stimulierbar (Kolch et al., 1993a). Auch PKC epsilon wurde als Raf-1 assoziiert gefunden, jedoch wurde keine direkte Einflußnahme auf die Aktivität von Raf-1 gefunden, sondern eine indirekte Wirkung von PKC epsilon durch erhöhte Produktion des Wachstumsfaktors TGF beta konnte als Grund für die erhöhte Raf-1 Aktivität identifiziert werden.

Derzeit können eine Vielzahl von Proteinen aufgeführt werden, die mit Raf-1 interagieren bzw. assoziiert vorliegen (komplette Übersicht in (Kolch, 2000)). In Abb. 1.3 werden die oben aufgeführten Signaltransduktionswege schematisch dargestellt. Besonders hervorzuheben ist hier die Aktivierung durch i) Tyrosinkinasen der src-

Familie; ii) Ras Proteine; iii) PKC, und iv) 14-3-3 Proteine, sowie v) Inhibierung durch PKA oder RKIP. Diese Befunde illustrieren sowohl die Komplexität der Regulation von Raf-1 als auch die Bedeutung von Raf-1 als integrierende Schaltstelle für eine Vielzahl von Signalen.

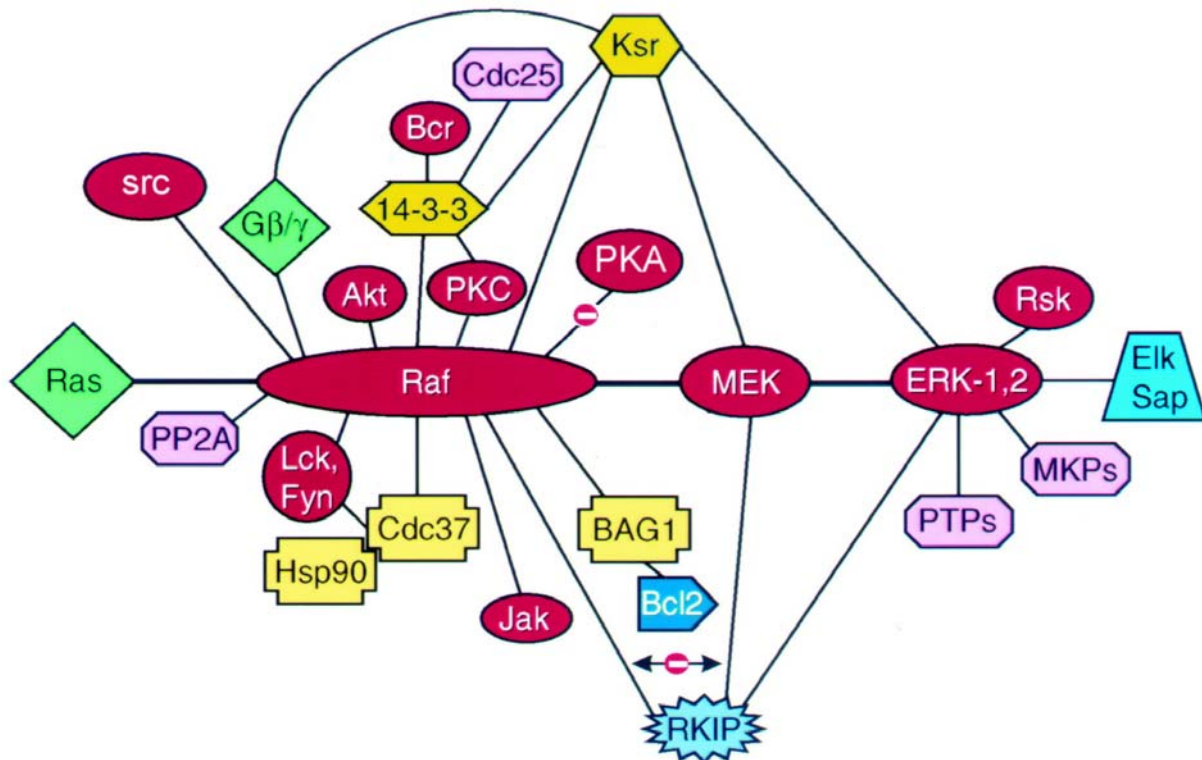


Abb. 1.3: Schematische Übersicht der Komponenten der Regulation von Raf-1

PKC, Protein Kinase C; JAK, Janus Kinase; Rsk, Ribosomale S6 Kinase; MKP, MAPK Phosphatasen; PTP, Protein Tyrosine Phosphatasen; Gb/g, Gbeta/gamma; PP2A, Protein Phosphatase 2A; KSR, Kinase Suppressor von Raf

1.2 Funktion und biologische Rolle

Erkenntnisse in Bezug auf die biologische Funktion von Raf-1 basieren vielfach auf Arbeiten mit dem onkogenen Homolog v-raf.

v-raf kann etablierte Fibroblasten transformieren sowie Mastzellen und unreife B-Zellvorläufer immortalisieren, welche aber Wachstumsfaktor-abhängig bleiben. Die Kombination von v-raf mit v-myc potenziert nicht nur die transformierende Wirkung in Fibroblasten, sondern erweitert das Spektrum hämatopoetischer Zellen, welche

immortalisiert werden können besonders in die Richtung myeloider Zellen. Diese Zellen sind in der Regel auch unabhängig von Wachstumsfaktoren (Blasi et al., 1985), (Rapp et al., 1985), (Kolch et al., 1990). Knock out Mäuse, die kein Raf-1 exprimieren, sterben bereits im embryonalen Stadium, es zeigen sich schwerwiegende Defizienzen bei der Organentwicklung (Mikula et al., 2001), (Wojnowski et al., 1998).

Inhibitionsexperimente mit spezifischen Antikörpern gegen Raf-1 zeigten, daß Raf-1 Funktion notwendig ist für die Viabilität und Proliferation von hämatopoetischen Zellen und Fibroblasten. Eine Reduktion der Raf-1 Expression durch spezifische "antisense" Oligonukleotide oder durch Expression von Raf "antisense" RNA führt zu einer dosisabhängigen Beeinträchtigung der mitogenen Wirkung von Serum, TPA, IL-3, IL-9, GM-CSF und Stammzell-Faktor (Brennscheidt et al., 1994). Die Zerstörung der katalytischen Aktivität von Raf-1 durch eine gezielte Punktmutation in der ATP Bindungsstelle resultiert in einem Raf Protein, das einen "dominant negativen" Phänotyp besitzt. Es kann kein Signal übertragen, kompetitiert aber mit dem normalen Raf-1 um die Interaktion mit Aktivatoren (z.B. Ras) und Substraten (z.B. Mek). Expression von solchen dominant negativen Raf Mutanten revertiert die Transformation von Zellen durch v-ras und v-raf Onkogene (Morrison et al., 1993) verhindert die Induktion der Transkription von Serum-responsiven (SRE) Promotoren durch Ras oder Tyrosinkinase Onkogene (Qureshi et al., 1991) und blockiert die Transkription des IL-2 Genes in aktivierten T-Zellen (Owaki et al., 1993). Um die systematische Analyse der Raf abhängigen Zelltransformation zu erleichtern, wurde eine NIH Zelllinie selektioniert, welche trotz der Expression eines funktionellen v-raf Proteins zum normalen, nicht transformierten Phänotyp revertiert ist. Diese Zelllinie (CHP25) ist resistent gegenüber Transformation durch Onkogene, die an der Zellmembran oder in Zytoplasma lokalisiert sind (v-sis, v-Ha-ras, v-Ki-ras, v-src, v-fms, v-mos, v-raf), und auch gegen die nukleären Onkogene v-myc und v-jun. CHP25 Zellen können allerdings effizient durch v-fos transformiert werden, was die Induktion der Expression des c-fos Gens als eine wichtige mitogene Effektorfunktion des Raf -> Mek -> MAPK -> TCF Signalweges ausweist (Kolch et al., 1993b).

Diese Beobachtungen zeigen, daß die Raf-1 Kinase bzw. ihr onkogenes Homolog eine essentielle Komponente in dem Signalnetzwerk ist, welches die Proliferation und Transformation von Zellen steuert. Im Einklang mit ihrer zytoplasmatischen

Lokalisation stellt die Raf-1 Kinase eine Schaltstelle in der Signalübertragung zwischen der Zellmembran und dem Zellkern dar.

1.3 Die 14-3-3 Familie molekularer Regulatoren

Die Aktivität von Raf-1 wird weiterhin durch 14-3-3 Proteine reguliert. 14-3-3 Proteine sind eine Familie ubiquitär exprimierter Proteine, welche ursprünglich als Regulatoren der Biosynthese von Neurotransmittern beschrieben wurden (Ichimura *et al.*, 1988). Eine enzymatische Funktion von 14-3-3 Proteinen ist bisher nicht überzeugend belegt, jedoch ist eine Assoziation von 14-3-3 Proteinen mit einer Vielzahl von Protein Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und anderen beschrieben (Übersicht in (Aitken *et al.*, 2002), (Masters *et al.*, 2002), (Tzivion *et al.*, 2001)). Wegen dieser Promiskuität in der Wahl der Bindungspartner wurden 14-3-3 Isoformen zuerst als Adaptorproteine beschrieben, jedoch erscheint im Licht neuerer Erkenntnisse eine weiter gefaßte Definition der Rolle von 14-3-3 Proteinen ratsam.

1.3.1 14-3-3 Isoformen und Struktur

Die 14-3-3 Familie umfasst mindestens sieben Isoformen: β , ε , η , γ , τ (auch θ genannt), ζ und σ . Die beiden als α und δ bezeichneten Isoformen stellten sich als phosphorylierte Formen vom 14-3-3 β und ζ heraus (Aitken *et al.*, 1995). Die Isoformen sind hoch konserviert in verschiedenen Säugerspezies, sie unterscheiden sich nur in einer sehr geringen Zahl von meist konservativen Sequenzaustauschen. Auch die Bindungspräferenzen der verschiedenen 14-3-3 Isoformen sind sehr ähnlich. Homologe von 14-3-3 sind in einer großen Zahl von eukaryotischen Organismen gefunden worden (Wang and Shakes, 1996), (Rosenquist *et al.*, 2001).

Strukturanalysen der Isoformen τ und ζ zeigen einen helikalen Aufbau, der aus neun anti-parallelen α -Helices aufgebaut ist (s. Abb. 1.3). 14-3-3 Proteine finden sich *in vivo* und *in vitro* zu Homo und Hetero-Dimeren zusammen, die einen negativ geladenen Kanal ausbilden (Liu *et al.*, 1995), (Xiao *et al.*, 1995). Eine Dimerisierung scheint eine unabdingbare Voraussetzung für die Aktivität von 14-3-3 zu sein (Tzivion *et al.*, 1998)

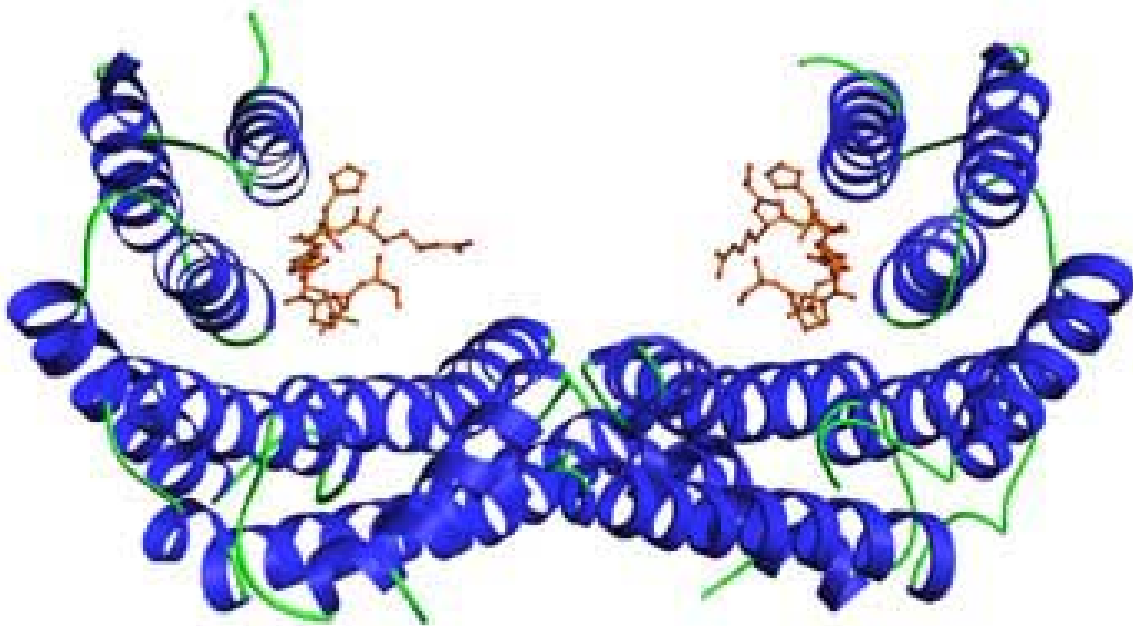


Abb. 1.3 *Kristall Strukturen der ϵ und τ Isoformen von 14-3-3. Alpha-Helices der 14-3-3 Moleküle sind in blau gezeichnet, zwei gebundene Peptide mit phosphorylierten Serinresten, die eine 14-3-3 Bindungsstelle bilden sind in rot dargestellt (nach Lin, D et al., 2000).*

Die Proteine der 14-3-3 Familie interagieren wie oben beschrieben mit einer Vielzahl an Proteinen, darunter ist auch Raf-1. In diesem Fall und auch in der Interaktion mit anderen Kinasen binden 14-3-3 Proteine sehr selektiv an Sequenzen, die ein phosphoryliertes Serin enthalten (Übersicht in (Aitken et al., 2002)). Sowohl die Bindungsstellen für die Interaktion mit Raf-1 (Muslin et al., 1996) als auch die für die Dimerisierung (Tzivion et al., 1998) sind identifiziert worden. Dies macht die Generierung von Mutanten möglich, die Dimerisations-negativ oder gestört in ihrer Bindung zu Raf-1 sind.

1.3.2 14-3-3 und Raf-1

Die Bindung von 14-3-3 an Raf-1 wurde in der Vergangenheit divers diskutiert. Grundsätzlich wurden sowohl pSerin 259 und pSerin 621 als 14-3-3 Bindungsstellen beschrieben (Michaud et al., 1995). Diese beiden Serin Reste sind als konstitutiv phosphoryliert in ruhenden Zellen beschrieben (Dhillon et al., 2002b). Die

Phosphorylierung erfolgt zumindest größtenteils durch die cAMP abhängigen Protein Kinase (PKA) (s.u.). Die Bindung von 14-3-3 an S259 schützt vor Dephosphorylierung durch PP2A (Dent et al., 1995), auf diese Weise kann eine Loslösung von 14-3-3 eine Dephosphorylierung ermöglichen (Abraham et al., 2000), (Jaumot and Hancock, 2001). Hierdurch wird die Repression der Kinase Domäne von Raf-1 durch die Regulatorische Domäne aufgehoben und nachfolgend die Bindung von ras ermöglicht. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen unterstützt, die belegen, dass Dephosphorylierung von Raf-1 den Anteil an Membran akkumuliertem Raf-1 erhöht (Kubicek et al., 2002).

PKA wurde als ein negativer Regulator von Raf-1 beschrieben. Aktivierung von PKA unterbindet die Stimulation von Raf-1 durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und PKC ((Burgering et al., 1993), (Cook and McCormick, 1993), (Wu et al., 1993), Übersicht in (Houslay and Kolch, 2000)). Die von PKA phosphorylierten Reste umfassen Serin 43, Serin 259 und Serin 621 (Hafner et al., 1994). Eine Beteiligung von S43 an der Inhibition von Raf-1 durch PKA wird divers diskutiert. Die Abschwächung der Aktivierung von T-Zellen und die Antwort auf EGF-Stimulation durch PKA wird von einigen Gruppen auf eine Phosphorylierung von S43 zurückgeführt (Wu et al., 1993), (Ramstad et al., 2000). Es gibt jedoch auch Berichte, die einer Unabhängigkeit von Forskolin Behandlung (cAMP-Level steigerndes Agens) und des Phosphorylierungsstatus von S43 (Sidovar et al., 2000) unterstellen. Die Wichtigkeit von Serin 259 ist unumstritten (Dhillon et al., 2002b), (Abraham et al., 2000), wenn die Dephosphorylierung von S259 gehemmt wird, ist die Aktivierbarkeit von Raf-1 stark verringert, während S259A Mutanten von diesem Phänomen nicht betroffen sind (Abraham et al., 2000),. Die Involvierung von S621 ist schwieriger zu beurteilen, da dieser Serin-Rest im physiologischen Kontext auto-phosphoryliert wird, die Mutation von Serin 621 zu Alanin zu einer Kinase-inaktiven Form von Raf-1 (Thorson *et al.*, 1998), (Morrison et al., 1993), (Mischak et al., 1996). Die Tendenz geht in jüngster Zeit dahin, daß die physiologische Bedeutung von 621 als Wirkort der PKA induzierten Hemmung von weniger stark gewichtet (Dhillon et al., 2002b) bzw. bezweifelt wird (Dumaz and Marais, 2003).

Neben der direkten Phosphorylierung von Raf-1 durch PKA wird bereits seit längerem eine Einflußnahme von PKA über das kleine G-Protein Rap-1 auf B-Raf mit nachfolgender Aktivierung der MAPK Kaskade diskutiert. Außerdem sind auch noch

andere, über alternative oder bisher unbekannte Signaltransduktionswege laufende Einflußnahmen des cAMP-Levels auf die ERK Aktivierung denkbar, diese Seitenwege sind in dieser Arbeit nicht berücksichtigt oder überprüft worden.

Die Rolle von PKA in der Regulation von Raf-1 und das Zusammenspiel mit 14-3-3 werden in Kapitel 4.4 weiter diskutiert.

1.4 Zielsetzung

Die Protein Kinase Raf-1 als Teil der klassischen Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) Kaskade stellt eine zentrale Schnittstelle der mitogenen Signaltransduktion in der Zelle dar. Ihre einzigen anerkannten Substrate sind die Mitogen-Extracellular-Activated Kinasen (MEK) 1/2, jedoch sind vielfach Wirkungen von Raf-1 beschrieben, die unabhängig von MEK Phosphorylierung sind. Die Identität der Effektoren dieser Wirkung, sei es in Form von Substraten oder anderer Interaktionspartner, ist nicht klar. Damit eine Wirkung durch Raf-1 auf einen Effektor möglich ist, muß eine, wenn auch kurzzeitige, Assoziation der Partner erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von (Glutathione-S-Transferase) (GST) Pulldowns mit rekombinantem Raf-1 assoziierte Proteine gesucht und ihre physiologische Rolle in der Regulation von Raf-1 charakterisiert.

Eine bereits sehr gut charakterisierte Klasse von assoziierten Proteinen von Raf-1 bilden die Proteine der 14-3-3 Familie. 14-3-3 Isoformen binden phosphorylierte Serin-Reste als Hetero- und Homo-Dimere. Die Bindungsstellen von 14-3-3 und die Phosphorylierungs-Stellen von PKA überschneiden sich zu einem großen Teil. In der Literatur wird eine Rolle von 14-3-3 in der PKA induzierte Inhibition schon seit längerem diskutiert, jedoch ist keiner der zu Grunde liegenden Mechanismen geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit soll dieser Fragestellung weiter nachgegangen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien/Materialien

Reagenzien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham:

GSSH-Sepharose, Protein-G-Sepharose, PVDF- und Nitrocellulose-Membranen, [γ -³²P]-ATP (6000 Ci/mmol), fast flow-Sepharose

Biorad:

30% Acrylamid/bis-acrylamid (29:1)

Calbiochem:

H-89 PKA Inhibitor, Raf-1 Kinase Inhibitor, Potatoe Acid Peroxidase

ICN:

Yeastolat

Invitrogen/Gibco BRL:

Dulbeccos Medium w/o Phenol Red (1000mg/l Glucose), Glutamin (200mM), Trypsin/EDTA, Penicillin/Streptomyzine, LB Broth Base, LB Agar, Fungizone, 4-20% Tris pre-cast Polyacrylamidgele, Pluronic

New England Biolabs (NEB):

Restriktionsendonucleasen

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Zellkulturflaschen, Kryoröhrchen, Chamber-slides

Seromed Biochrom (Berlin):

Fötale Kälber Serum (FCS), Grace's Insect Medium

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen

2.1.1. Antikörper

Cell Signalling:

Phospho-MEK

Phospho-ERK

Dianova GmbH, Hamburg:

Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper gegen Maus, Ziege und Kaninchen.

Roche:

HA-spezifischer Antikörper

Santa Cruz:

GRP78

Bag-1

14-3-3 zeta

GST

Sigma:

FLAG-spezifischer Antikörper

Stressgene:

HSP70

Transduction Laboratories:

MEK

Upstate Biotechnologies:

Phospho-(S338) Raf-1

Der polyklonale Antikörper gegen Raf-1 wurde von Harald Mischak (mosaiques diagnostics, Hannover) zur Verfügung gestellt. Ein Aliquot des KSR-1 Antikörpers wurde von Walter Kölch (Beatson Institute, Glasgow) zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Kits

Amersham (Braunschweig):	ECL-Detection-Kit
Qiagen (Hilden):	High Speed Plasmid Mini- und Midi-Kit
Pierce:	BCA Proteinmessungs-kit

2.1.3. Standardlösungen und – puffer

PBS: 140mM NaCl₂
 30mM KCl
 6,5mM Na₂HPO₄
 1,5mM KH₂PO₄

TBS: 20mM Tris-HCl pH7,5
50mM NaCl₂

TAE: 10mM Tris-HCl pH 8,0
 20mM Essigsäure
 20mM EDTA pH 8,0

2.1.4. Biologisches Material

Bakterienstämme

E.coli DH5 α

Eukaryotische Zell-Linien

EVC304	Humane Endothelzelllinie
NIH 3T3	Maus Fibroblasten Zelllinie
Sf-9	Insektenzellen

2.2. Methoden

Alle Standard-Methoden, die hier nicht im Einzelnen beschrieben sind, wurden nach Protokollen aus Sambrook et al. (Molecular Cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt.

2.2.1. Mikrobiologische Techniken

Kultivierung von Bakterien

E. coli wurde in LB-Medium mit Antibiotika, je nach Resistenz (je 50µg/ml) über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

LB-Medium: 1% Bacto Trypton (w/v)
 1% Hefeextrakt (w/v)
 0,5% NaCl₂ (w/v)

Zur Aufzucht von Kolonien wurden LB-Agarplatten (1,5% w/v) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von Bakterien

Transformationskompetente DH5 α -Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, die Plasmid-DNA (0,1-1µg) hinzupipettiert und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 1min bei 42°C inkubiert und sofort danach für 2min auf Eis abgekühlt. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Agar Platten mit dem erforderlichen Antibiotikum ausgestrichen und inkubiert wie oben beschrieben. Von den gewachsenen Kolonien wurden Übernachtkulturen in 3ml LB und entsprechendem Antibiotikum angefertigt und nach Plasmidpräparation einem analytischen Restriktionsverdau zur Überprüfung der Transformation durchgeführt.

2.2.2. Eukaryotische Zellkultur

Kultivierung von Insektenzellen

Sf-9 Zellen wurden in Grace's Insect Medium mit Supplementen in Spinnerflasche im Inkubator bei 27°C angezogen und zweimal wöchentlich zu einer Dichte von $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt.

Die Infektion mit Bakuloviren erfolgte durch Zugabe der durch Titerbestimmung (s.u.) als optimal geschätzten Viruskonzentration zu Sf-9 Zellen von einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml. Die Zellen wurden in BioAssay Schalen (Nunc, 22,5x22,5 cm) ausgesät und für 3 Tage inkubiert, nach 48h erfolgte die Zugabe von 1µg/ml steril filtrierte Leupeptin. Nach optischer Kontrolle des Infektionserfolges (stark gerundete, vergrößerte Zellen) wurden die Zellen abzentrifugiert und aufgeschlossen. Die Titerbestimmung wurde wie folgt durchgeführt: 1ml des virushaltigen Überstandes wird in einer auf $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellten Spinnerflasche bis zum vollständigen Absterben der Zellen kultiviert. Der Überstand wird durch Zentrifugation bei 4300 rpm geklärt. Der Virustiter wird abgeschätzt durch eine serielle Verdünnung des virushaltigen Überstands (0-300µl/je $0,75 \times 10^6$ Zellen in einem 6-well). Die Expression (Qualität und Quantität) der rekombinanten Proteine wurde im Western-Blot überprüft.

Grace's Medium mit Supplementen:

500ml Grace's Insect Medium

50 ml Fetales Kälberserum

10 ml L-Glutamin

6,6 ml Yeastolat 25%

10 ml Lactalbumin-Hydrolysat (166,5g/L)

5 ml Penicillin/Streptomycin

2,5 ml Fungizone

5 ml Pluronic

Kultivierung und Transfektion von Endothelzellen/NIH 3T3

Bei der Zell-Linie ECV304 handelt es sich um umbilicale humane Endothelzellen, die Zell-Linie NIH 3T3 ist eine murine embryonale Fibroblasten Linie. Diese Zellen wurden in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot, mit 10% FCS und 2mM Glutamin (Medium komplett) bei 37°C und 5%CO₂ gehalten und alle 3 Tage 1:4 gespalten.

Für Transfektionen wurden die Zellen so ausgesät, daß sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70% aufwiesen.

Expressionvektoren wurden mit DMEM ohne FCS und Superfect (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers gemischt und für 20-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit serumhaltigen („komplett“) Medium versehen und auf die Zellen gegeben. Nach 3-5h Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurde der Transfektionsansatz gegen normales komplett Medium ausgetauscht. Je nach Erfordernis wurden die Zellen für 24-48h im Inkubator gehalten und dann weiter verarbeitet.

Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung wurden eukaryotische Zellen nach dem Passagieren bzw. nach dem Abzentrifugieren in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen, in speziellen Einfriergefäßen („Kryotubes“, NUNC) möglichst langsam (ca 1°C/min) abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium: 90 Vol% FCS
 10 Vol% DMSO

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut, mit einem großen Überschuss Medium gewaschen und in geeignete Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.3. Molekularbiologische Techniken

Plasmidpräparation

DNA-Präparationen wurden mit Kits der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit einem Eppendorf Biophotometer durch Absorption bei 260nm im Spektralphotometer gegen ddH₂O bestimmt.

Dabei galt folgender Umrechnungsfaktor:

DNA: $c = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 0,8-1,5%igen TAE/Agarosegelen, welche 1µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Als Größenstandard wurde die 1kB-Leiter von Stratagene verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 1V/cm². Die Gele wurden im UV-Durchlicht betrachtet (256nm) und mit einer Digital Kamera (Olympus E-100RS mit UV-Filter) fotografiert.

10x Probenpuffer	40% (w/v)	Glycerin
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	in 1xTAE	

2.2.4. Biochemische Techniken

Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus Sf-9 Zellen

Raf-isoformen und MEK wurden mit Hilfe des Baculovirus-System in Sf-9 Zellen als GST-Fusionsproteine überexprimiert. Die Zellen wurden 2-3 Tage (je nach Protein)

nach erfolgter Infektion mit Bakuloviren abzentrifugiert und in eiskaltem Lyse-Puffer aufgeschlossen.

Lyse-Puffer (Sf-9 Zellen)	TBS
	1% n-Octylglykosid
	10mM β -Glycerophosphat
	1mM NaF
	1mM EDTA
	1mM EGTA
	1-2mM DTT
	10 μ g/ml Leupeptin
	1mM Phenylmethylsulonyl Fluorid (PMSF)

Die Suspension wurde für 5-10min unter leichtem Schütteln bei 4°C gehalten und soniziert (3x bei 50% Leistung für 5 Sekunden). Nachfolgend wurden die unlöslichen Bestandteile durch eine 30min Zentrifugation bei 16.000rpm und 4°C abgetrennt und der Überstand mit einer entsprechenden Menge (300-500 μ l) GSSH-Sepharose beads, bei 4°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Die GSSH-beads wurden nachfolgend 2x mit einem Überschuss an Lyse-Puffer und 2x mit dem Thrombinprotease-Puffer (TBS/ 0,1mM EDTA, 0,5mM DTT) gewaschen und anschließen mit Thrombin (2800U/mg 1U pro 10 μ g Fusionsprotein) bei 4°C für 2h inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF und Leupeptin gestoppt und die beads mehrfach in einem kleinem Volumen Thrombinprotease-Puffer (+Proteinase-Inhibitoren) gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt, mit 50% Glycerin versehen und bei -20°C gelagert. Zur Mengenbestimmung wurde ein Comassie-Gel mit einem BSA-Standard angefertigt (siehe unten). Die Aktivität von Raf-Isoformen und die Phosphorilierbarkeit von MEK wurden in einem *in vitro* Kinase-assay bestimmt (s.u.).

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E.coli

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden frisch transformierte DH5 α -Bakterien über Nacht in LB-Medium bei 37°C angezogen, morgens 1:10 mit dem gleichen Medium verdünnt und nach 1,5 h mit 0,5-1mM IPTG induziert. Dauer der Induktion und Temperatur wurde je nach Erfordernis variiert.

Die Zellen wurden bei 6000rpm für 20min bei 4°C abzentrifugiert, in Lyse-Puffer resuspendiert (der bakterielle Lyse-Puffer unterscheidet sich zu dem Lyse-Puffer für die Sf-9 Zellen nur durch den Austausch von Ocyglykosid gegen Triton X100) und soniziert (3x bei 50% Leistung für 5 Sekunden).

Unlösliche Bestandteile wurden wie oben beschrieben durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt und der Überstand mit einer entsprechenden Menge an GSSH-Sepharose beads bei 4°C unter Schütteln über Nacht inkubiert.

Die Beads wurden 2x mit einem großen Überschuss an Lyse-Puffer gewaschen und nachfolgend durch 2 weitere Waschschrte in dem gewünschten Reaktionspuffer (z.B. Kinase-Puffer oder als Lagerungspuffer TBS + 1%Triton X-100) äquibriert.

Zur Mengenbestimmung wurde ein Coomassie-Gel mit einem BSA-Standard angefertigt (s.u.).

GST-Pulldown Assays mit rekombinanten Fusionsproteinen

Zur Identifizierung von neuartigen Assoziationspartnern wurden GST-Fusionsproteine von Raf-1, B-Raf und Fragmente von Raf-1 in SF-9 Zellen und e. coli exprimiert und gereinigt (s.o.). Die an GSSH-Sepharose immobilisierten Proteine wurde mit Zellysaten von humanen Endothelzellen über Nacht bei 4°C unter Agitation in Lysepuffer inkubiert. Die 50 μ l eingesetzten Beads wurden dann auf Chromatographie-Säulchen (Biorad) aufgebracht und mit 3x 3ml Lysepuffer und 2x 3ml Waschpuffer (Lysepuffer ohne Triton X-100) gewaschen. Nachfolgend wurden mit GST-Raf-1 bindenden Proteine mittels SDS-PAGE fraktioniert und durch Färbung des Gels mit Coomassie sichtbar gemacht (s.u.). Als Kontrollen diente immobilisiertes bakteriell exprimiertes GST, immobilisiertes GST-PKCgamma und die Inkubation mit Lysepuffer ohne Zusatz von Zellysaten.

SDS Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine zu trennen oder immunologisch zu detektieren (Western-Blot), wurden die Proteinlösungen (Lysate, Kinasereaktionsansätze, Proteinpräparationen) auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Verwendet wurde hierzu die MightySmall-Aparaturen von Höfer. Die Acrylamidkonzentration wurde je nach erwarteter Größe der zu analysierenden Proteine zwischen 7 und 15% variiert. Die Gele wurden nach allgemein gültigen Protokollen hergestellt. Im Bedarfsfall wurden 4-20%-ige „precast“ Gradienten-Gele der Firma Invitrogen verwendet.

Die Durchführung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 40mA pro Gel und maximal 250V. Die zu analysierende Probe wurde zuvor mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und aufgekocht (5min, 95°C)

Laemmli-Probenpuffer (5x): 250mM Tris-HCl pH 6,8
 50% Glycerin
 2,5% SDS
 5mM EDTA
 50mM DTT

SDS-Laufpuffer (10x) 720g Glycin
 150g Tris
 50g SDS
 mit H₂O auf 5l auffüllen

Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel wurden die Gele in die Färbelösung überführt und für 30-60min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Coomassie-Lösung: 30% Essigsäure
 10% Methanol
 0,04% Coomassie-Brilliant Blue

Anschließend wurde das überschüssige nicht proteingebundene Coomassie durch mehrmaliges Waschen in derselben Lösung ohne Coomassie-Blau entfernt.

Isolation von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Durch Coomassie Brilliant Blue Färbung visualisierte Proteinbanden wurden mit einem Skalpel ausgeschnitten, zerkleinert und in ein silanisiertes Eppendorfgefäß überführt. Die Gelstücke wurden 1h in 100mM Ammoniumbicarbonat mit dreimaligem Wechsel der Waschflüssigkeit inkubiert. Nachfolgend wurde mit 50% Acetonitrile in 100mM Ammoniumbicarbonat für 1h gewaschen und abschließend 10min in reinem Acetonitril. Die getrockneten Gelstücke wurden dann für 15min mit 50-200 ng Trypsin in 10µl einer 25mM Ammoniumbicarbonat-Lösung verdaut. Nach Zugabe von 2β-40µl einer 25mM Ammoniumbicarbonat-Lösung wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen, und die Proteine durch dreifachen Auszug mit 50µl von 60% Acetonitrile in 0,1% Ameisensäure extrahiert und in der Vakuumzentrifuge auf 10µl eingeeengt.

Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Die Identifikation wurden in der Sir Henry Wellcome Functional Genomics Facility, Glasgow, Schottland mit einem Voyager DEpro MALDI-TOF bzw. einem Q-Star Pulsar Profound der Fa. Proteometrics LLC unter Standardbedingungen durchgeführt.

Western-Blot

Auf einer SDS-PAGE analysierte Proteine wurden zur immunologischen Detektion mit spezifischen Antikörpern auf PVDF- oder Nitrocellulose-Membranen in einer Höfer-Nassblot-Aperatur in Transferpuffer für 1h und 80V bei konstanter Spannung transferiert.

Transfer-Puffer: 250 mM Tris
 1,92 M Glycine

Die Membranen wurden nachfolgend für 30-60min (bei Raumtemperatur) oder über Nacht (bei 4°C) in Blockierungslösung geschwenkt. Die Inkubation mit primärem

Antikörper erfolgte mit einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers (1:250-1:5000) in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C unter Rollen. Im Anschluß wurde die Antikörperlösung entfernt und der Blot mindestens 3x für 5-10min mit TBS inkl. 0,1% Tween (TBST) gewaschen. Danach wurde der Blot im Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in Blockierungslösung (1:20.000) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde erneut 3-5x für 5-10min mit TBST gewaschen und der gebundene Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits auf einem Röntgenfilm dargestellt (Expositionszeiten je nach Antikörper und Proteinmenge zwischen 2sec und 5min). Alternativ wurden die Signale mittels des Biorad Versadoc Dokumentationssystems nach Anweisungen des Herstellers aufgezeichnet.

Blockierungslösung:	5% (w/v)	fettfreies Milchpulver
	0,1 %	Tween 20
	1 x TBS	

Immunpräzipitation

Um ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysat mittels eines spezifischen Antikörpers zu präzipitieren, wurden Zellen einer 80-90% konfluente 10cm Zellkulturschalen kultiviert und bei Bedarf stimuliert, mit PBS gewaschen und in eiskaltem RIPA-Puffer (low-salt) auf Eis lysiert. Die Lysate wurden für 10min bei 13.000 rpm und 4°C geklärt und nachfolgend mit einem Gemisch aus G-Sepharose beads (30µl) und dem spezifischen Antikörper (1-5µg) für 2-4h (optional auch über Nacht) bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Präzipitat wurde nachfolgend 2x mit Lyse-Puffer gewaschen und je nach weiterer Vorgehensweise durch erneute Waschschrte umgepuffert.

RIPA 50mM Tris-HCl pH 7,5
 150mM NaCl₂ (für RIPA high salt wurden 500mM verwendet)
 10mM MgCl₂
 1% Triton
 0,1% SDS
 0,5% DOC
 1mM EDTA
 1mM NaVO₄
 1mg/ml Leupeptin
 1mM β-Glycerophosphat
 1mM NaF
 1mM PMSF

***In vitro* Kinase-assay**

Aufgereinigtes rekombinantes Raf-1 wurden in einem Reaktionsansatz von 20-40µl in Kinase-Puffer bei 37°C für 20-40min inkubiert. Die Aktivität von Raf gegenüber MEK wurde entweder durch einen phospho-MEK spezifischen Antikörper gemessen oder die Reaktion in Gegenwart von 5µCi [γ -³²P]-ATP durchgeführt.

Kinase-Puffer: 10mM Tris
 100mM NaCl
 2mM CaCl₂
 10 mM MgCl₂
 0,5mM EDTA und EGTA
 1mM DTT
 0,5mM ATP
 0,1% Triton X-100
 MEK ca. 100 ng
 Raf-1 ca. 10-30 ng

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer (siehe unten) gestoppt, für 5min bei 95°C gekocht und über eine SDS-PAGE getrennt. Die Proben wurden entweder durch nachfolgenden Western-Blot mit spezifischen phospho-MEK spezifischen Antikörper oder durch nachfolgende Autoradiographie analysiert.

113. Ergebnisse

3.1 Identifikation von neuartigen assoziierten Proteinen von Raf-1

3.1.1 Etablierung eines GST-pulldown Systems mit rekombinantem Raf-1

Bei der Suche nach neuen Regulatoren von Raf-1 sind sowohl neue Substrate als auch Interaktionspartner, die unabhängig von der Kinase Aktivität von Raf-1 Einfluß nehmen, zu berücksichtigen. Beide Möglichkeiten erfordern eine räumliche Nähe bzw. eine Assoziation des unbekanntes Effektors mit Raf-1. In der vorliegenden Arbeit wurde auf GST-pulldown Assays zurückgegriffen, um diese Proteine zu isolieren. Mit Hilfe dieser Technik konnte bereits Vimentin als Raf-1 assoziiertes Protein identifiziert werden (Janosch et al., 2000). Als Köder oder „Bait“ für den Pulldown Assay wurde zuerst „full-length“ GST-Raf-1 verwendet, welches in SF-9 Zellen durch baculovirale Infektion gewonnen wurde. Rekombinante Proteine aus SF-9 Zellen haben gegenüber bakteriell exprimierten Proteinen den Vorteil, das sie in ihrer Faltung und auch in den post-translationalen Modifikationen (z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung, Methylierung) den in Säugerzellen vorkommenden Proteinen sehr viel ähnlicher sind.

Bei der Expression von GST-Raf-1 ergab sich, wie in Abb. 3.1a in einer Coomassie Färbung einer GST-Raf-1 Isolation zu sehen ist, nicht nur eine Hauptbande des rekombinanten Proteins (s. Pfeil Abb. 3a, ca. 100kDa). Die grosse Anzahl an zusätzlichen Banden verhindert, dass im Pulldown Assay zusätzlich hinzugekommene Proteinbanden identifiziert werden können. In Immunoblots gegen GST und Raf-1 zeigte sich, das die Mehrzahl an zusätzlichen Banden sowohl mit dem Raf-1 Antikörper als auch mit dem GST Antikörper reagierten (Daten nicht gezeigt).

Daraus wurde der Schluß gezogen, dass die rekombinanten Proteine entweder schon in den Sf-9 Zellen oder im Laufe der Isolation abgebaut werden. Im Rahmen der baculoviralen Infektion wurden verschiedene Zugabe-Schemata von Leupeptin oder des alternativen Proteinase-Inhibitors E-61 getestet. Die Qualität der GST-Raf-1 Isolation konnte hierdurch jedoch nicht gesteigert werden. Ebenso wurde versucht,

durch Variationen der Isolationsprozedur die Qualität der GST-Raf-1 Präparation zu verbessern. Es wurden neben unterschiedlichen Waschschritten mit RIPA und Lysepuffer mit verschiedenen Detergenzien (Triton, n-Octylglucosid) Versuche mit hydrophober Interaktions-Chromatographie durchgeführt, alle versuchten Veränderungen blieben jedoch erfolglos.

Aus diesen Gründen wurde auf zwei Raf-1 Fragmente zurückgegriffen, die entweder die S259 Region oder die S621 Region von jeweils ca. 5kDa umfassen und bakteriell exprimiert wurden. Die Bereiche um S259 und S621 sind sowohl als Bindungsstellen für Adaptorproteine wie 14-3-3 beschrieben (Muslin et al., 1996) als auch als Phosphorylierungsstellen bekannt (Dhillon et al., 2002b) (Michaud et al., 1995) und aus diesem Grund für eine weitergehende Untersuchung sehr interessant. Wie in Abb. 3.1b zu erkennen, sind die Isolationen der GST-Fusionsproteine selbst bei Überladung des Gels fast vollständig frei von Verunreinigungen oder Abbauprodukten.

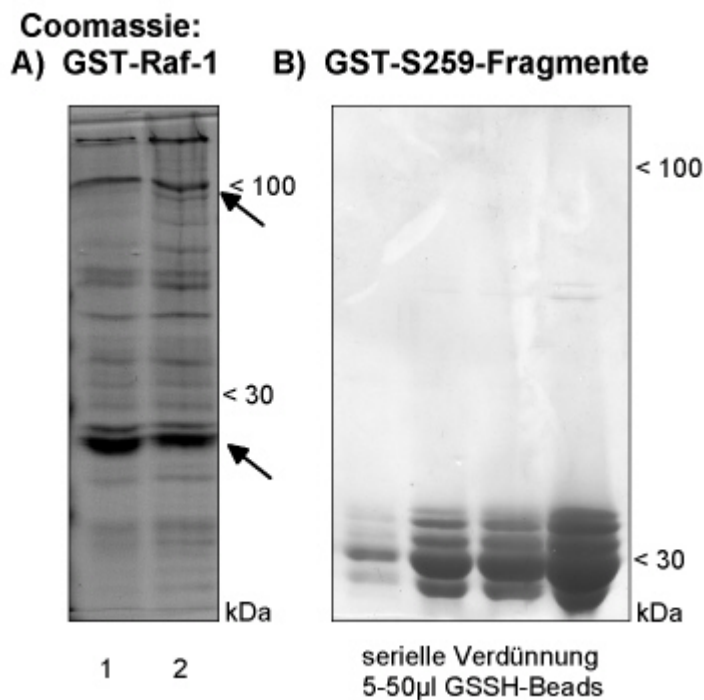


Abb. 3.1 Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Isolation von GST-Fusionsproteinen A) Isolation von full-length GST-Raf-1 (ca.100kDa) aus SF-9 Zellen, Bahn 1: 3x gewaschen mit Lysepuffer, Bahn 2: 3x gewaschen mit RIPA-Puffer B) Isolation des S259-Fragments

3.1.2 Die zellulären Chaperone HSP70 und GRP78 assoziieren mit Raf-1 *in vitro*

Im GST-Pulldown Assay wurden Proteinkonzentrationen von bis zu 10mg/ml Gesamtprotein im Zellysat eingesetzt. In diesen Konzentrationen ließen sich durch konventionelle Coomassie Brilliant blue Färbung mehrere zusätzliche Banden im Vergleich zur Kontrolle ohne Zellysat erkennen (s. Abb. 3.2b). Eine größere Anzahl von Proteinen, die nur mit dem GST Anteil des Fusionsproteins assoziierten, ließ sich mit Hilfe der GST Negativkontrolle (s. Abb. 3.2a) erkennen. Banden, die in dieser Bahn oder in der S259 Pufferkontrolle erschienen, wurden nicht als Raf assoziierte Banden berücksichtigt.

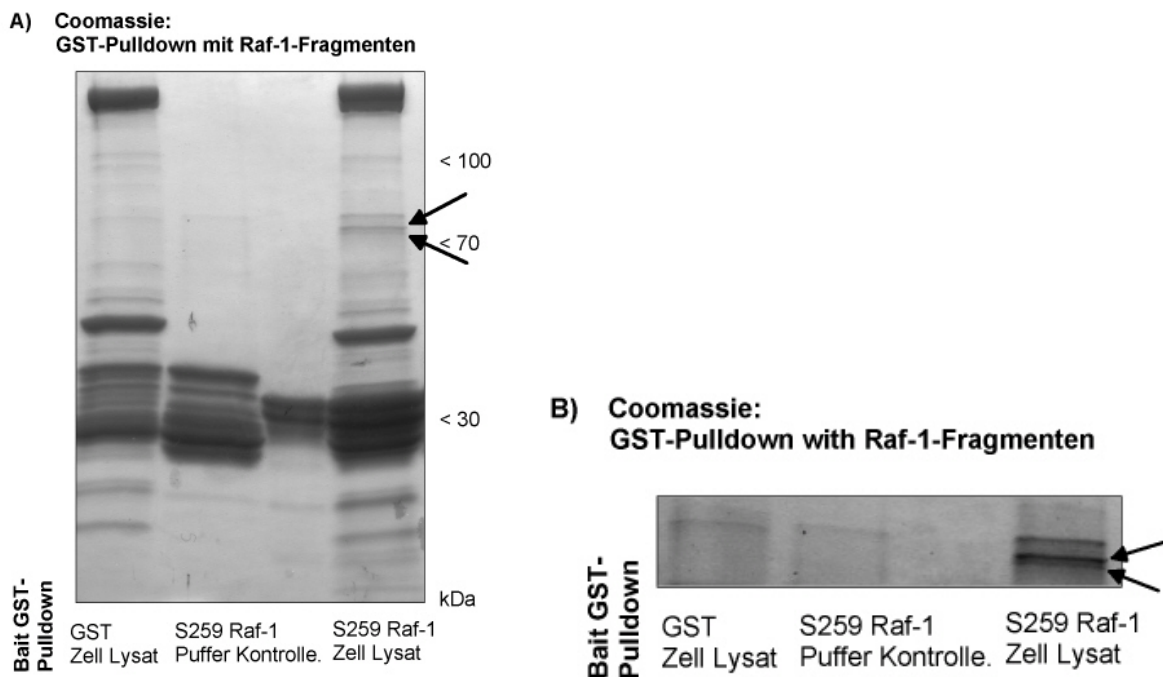


Abb. 3.2 Coomassie gefärbte SDS-PAGE von GST-Pulldown Assays, Pfeile bezeichnen ausgeschnittene Banden A: Vollbild B: Ausschnittsvergrößerung

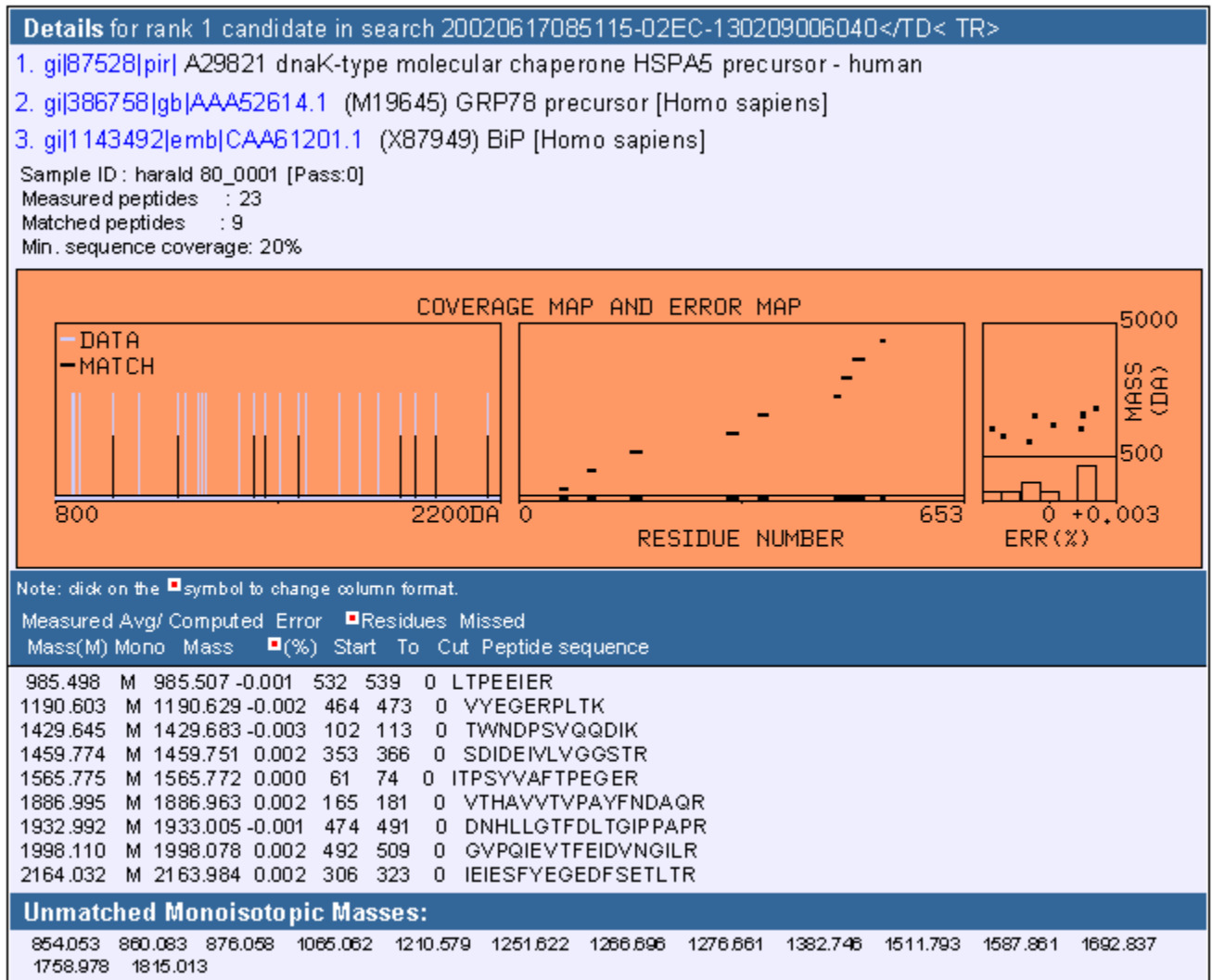
3.1.2.1 Identifikation der assoziierten Proteine mittels MS

Die in Abb. 3.2 markierten Banden und weitere putative assoziierte Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und das tryptische Muster über Massenspektroskopie (Maldi-TOF und MS-MS) identifiziert. Der Vergleich der tryptischen Fragmente in Verbindung mit den bereits bekannten Gesamtmassen der gesuchten Proteine und eine Einengung der gesuchten Spezies auf humane- oder zumindest Säugersequenzen erbrachte eine eindeutige Zuordnungsmöglichkeit. In Tabellen 3.1 und 3.2 sind die Details der Suche in der NCBI Nr Datenbank für die beiden ca. 70 und 80kDa großen putativen Proteine aufgeführt. Aus beiden Datenbanksuchen gehen jeweils die Proteine aus der HSP70-Familie der zellulären Chaperone und GRP78 als Raf-1 assoziierte Proteine hervor.

Tabelle 3.1 Datenbankauszug für tryptischen Verdau eluiertes Protein ca. 70kDa

Details for rank 1 candidate in search 20020617084845-02EC-130209006040</TD>< TR>												
1. gij5729877 ref NP_006588.1 (NM_006597) heat shock 70kD protein 8; heat shock 70kD protein 8 (HSP73); heat shock cognate protein, 71-kDa; heat shock 70kd protein 10 (HSC71) [Homo sapiens]												
2. gij20558796 ref XP_165584.1 (XM_165584) heat shock 70kD protein 8 [Homo sapiens]												
3. gij123648 sp P11142 HS7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein												
4. gij87625 pir A27077 dnaK-type molecular chaperone - human												
5. gij32467 emb CAA68445.1 (Y00371) 71 Kd heat shock cognate protein [Homo sapiens]												
6. gij13273304 gb AAK17898.1 AF352832_1 (AF352832) constitutive heat shock protein 70 [Homo sapiens]												
7. gij14424627 gb AAH09338.1 AAH09338 (BC009338) heat shock 70kD protein 8 [Homo sapiens]												
8. gij16740593 gb AAH16179.1 AAH16179 (BC016179) heat shock 70kD protein 8 [Homo sapiens]												
9. gij16741727 gb AAH16660.1 AAH16660 (BC016660) heat shock 70kD protein 8 [Homo sapiens]												
10. gij18043726 gb AAH19816.1 AAH19816 (BC019816) heat shock 70kD protein 8 [Homo sapiens]												
Sample ID : harald 75_0001 [Pass:0]												
Measured peptides : 40												
Matched peptides : 11												
Min. sequence coverage: 24%												
<p>The figure consists of three subplots. The left subplot, titled 'COVERAGE MAP AND ERROR MAP', shows 'DATA' (blue bars) and 'MATCH' (black bars) across a mass range from 800 to 3000 Da. The middle subplot shows 'RESIDUE NUMBER' from 0 to 646. The right subplot shows 'MASS (DA)' from 0 to 5000 and 'ERR (%)' from 0 to 0.005.</p>												
Note: click on the <input type="checkbox"/> symbol to change column format.												
Measured Avg/ Computed Error <input type="checkbox"/> Residues Missed												
Mass(M)	Mono	Mass	<input type="checkbox"/> (%)	Start	To	Cut	Peptide sequence					
1196.627	M	1196.655	-0.002	459	469	0	FELTGIPPAPR					
1198.639	M	1198.666	-0.002	160	171	0	DAGTIAGLNVLK					
1227.604	M	1227.620	-0.001	26	36	0	VEIANDQGK					
1252.567	M	1252.608	-0.003	302	311	0	FEELNADLFR					
1302.592	M	1302.591	0.000	540	550	0	NSLESYAFNMK					
1480.741	M	1480.799	-0.004	329	342	0	SQIHDIVLVGGSTR					
1486.660	M	1486.693	-0.002	37	49	0	TTPSYVAFTDK					
1652.789	M	1652.824	-0.002	89	102	0	HWPFMNVNDAGRPK					
1690.683	M	1690.718	-0.002	221	236	0	STAGDTHLGGEDFDK					
1981.032	M	1980.990	0.002	138	155	0	TVTNAVVTVPAYFNDK					
2773.363	M	2773.318	0.002	424	447	0	QTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGK					
Unmatched Monoisotopic Masses:												
860.048	988.489	1031.519	1044.498	1049.408	1071.131	1081.505	1109.501	1136.495	1148.532	1179.586	1210.646	
1266.695	1289.631	1336.641	1360.703	1382.747	1409.651	1425.591	1591.911	1744.765	1758.905	1786.945	1802.968	
2055.949	2185.170	2229.184	2756.339	2996.194								

Tabelle 3.2 Datenbankauszug für tryptischen Verdau reliiertes Protein ca. 80kDa



Neben den beiden hier im Detail dargestellten Kandidaten wurden noch weitere putative assoziierte Proteine gefunden, die ebenfalls mittels MS identifiziert wurden. Tabelle 3.3 zeigt alle identifizierten Proteine, eine grobe Einordnung und Kommentare zur Validierung der putativen Assoziation.

Tabelle 3.3 *Liste der im GST-Pulldown gewonnenen und im MS identifizierten Proteine*

Name des Proteins	Beschreibung	Masse [kDa]	Bemerkung
Ku protein	ATP-dependant DNA helicase II	64,5-86	nicht näher untersucht, Nukleäres Protein, Artefakt wahrscheinlich
Actin	Zytoskellet	42	Artefakt, im Western-Blot auch Assoziation mit GST, PKC gamma und anderen
Guanine nucleotide-binding protein beta	Untereinheit heterotrimers GTP-bindendes Protein	36,4	In Literatur bereits beschrieben, Assoziation durch Western-Blot bestätigt

3.1.2.2 Bestätigung der Identität der assoziierten Proteine mittels Western-Blot

Um die Identifikation der beiden Kandidaten HSP70 und GRP78 durch Massenspektrometrie zu validieren, wurden kommerziell erhältliche Antikörper (HSP70: Stressgene monoklonaler AK aus Maus, GRP78: Santa Cruz polyklonaler AK aus Ziege) beschafft und Assoziations Assays nach Auftrennung in der SDS-PAGE und nachfolgendem Western-Blot mit diesen Antikörpern getestet. Hierbei wurden in den Assoziationen nicht nur das S259 Fragment sondern auch das S621 Fragment und full-length Raf-1 als Köder eingesetzt, da in Versuchen mit Coomassie Färbung aufgrund oben beschriebener Probleme die zusätzlichen Banden nicht zu erkennen waren. Weiterhin wurde überprüft, inwieweit die Assoziation spezifisch mit Raf-1 passierte. Als Negativkontrolle wurde nicht nur GST, sondern auch rekombinant in SF-9 Zellen produziertes GST-PKCgamma eingesetzt. PKCgamma wurde gewählt, um eine nicht mit Raf-isoformen verwandte Kinase, die ebenfalls in SF-9 Zellen exprimiert wurde, einzusetzen.

Die Identität von HSP/GRP und auch die Assoziation mit Raf-1 im GST-Pulldown System wurden durch die Western-Blots bestätigt (s. Abb. 3.3). Bemerkenswert ist in beiden Fällen die Präferenz der Bindung für das S259 Fragment von Raf, die Assoziation von GRP/HSP sowohl mit S621 als auch full-length Raf-1 wurden nur in deutlich geringerem Maßstab nachgewiesen. Als weitere Negativkontrolle neben der fehlenden Assoziation von HSP/GRP mit einem einzelnen rekombinanten GST wurde auch die Assoziation von HSP/GRP mit GST-PKCgamma, einer rekombinanten, ähnlich großen Kinase wie Raf-1, untersucht. Weiterhin wurde eine Assoziation von b-Raf mit GRP/HSP sowohl durch Western-Blots als auch durch MS Identifikation von ausgeschnittenen und tryptisch verdauten Banden gefunden (Daten nicht gezeigt).

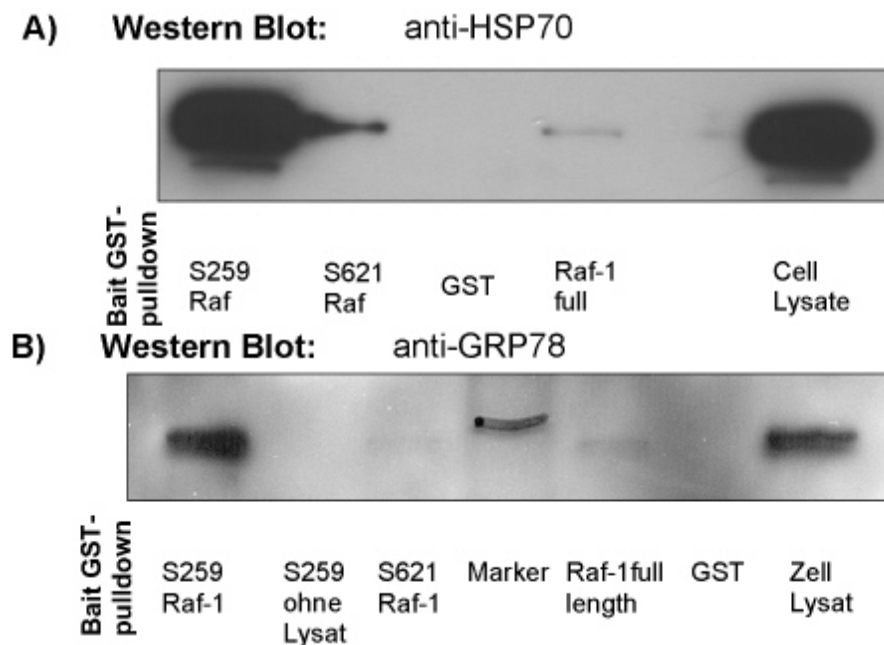


Abb. 3.3 *Western-Blots von GST-Pulldown Assays mit verschiedenen Ködern*
A: Nachweis von HSP70 B: Nachweis von GRP78

3.1.3 HSP70 und GRP78 assoziieren mit Raf-1 *in vivo*

Eine weitere Validierung der Assoziation von HSP/GRP mit Raf-1 wurde mittels Co-Imunopräzipitations Assays (Co-IP) durchgeführt. Hierbei wurden in einer anderen Zelllinie (NIH 3T3 Fibroblasten gegenüber der humanen Endothelzelllinie ECV304) die Assoziation identifizierten Proteinen (z.B. HSP70, GRP78, Gbeta/gamma) mit Raf-1 nochmals überprüft. Die Versuche zur Co-IP wurden in untransfizierten Systemen

gemacht. Nach IP von Raf aus dem Zellysate wurde die Anwesenheit von HSP/GRP mittels der spezifischen Antikörper getestet. Dies schließt die Möglichkeit, dass die Ergebnisse aus den GST-Pulldown Assays Artefakte sind, weitgehend aus. Wie in Abb. 3.4 zu sehen ist, konnten die Assoziation beider Chaperone mit Raf-1 auch in der IP bestätigt werden.

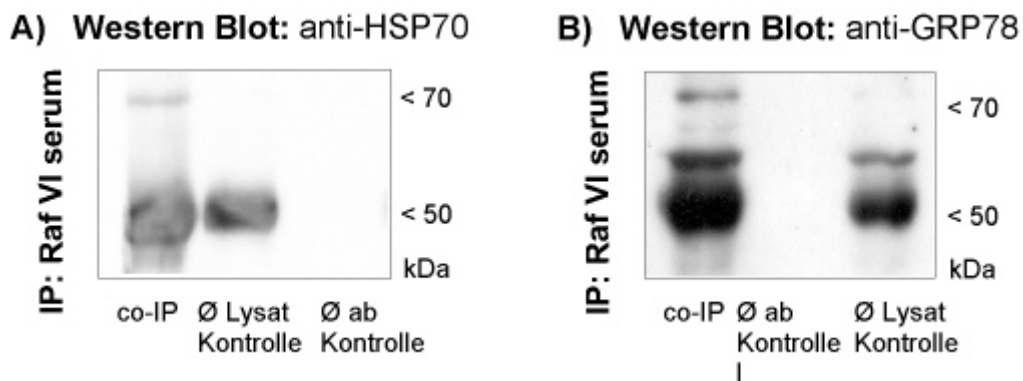


Abb. 3.4 *Western-Blots von Co-IPs mit dem Antiserum gegen Raf-1*
A: Nachweis von HSP70 B: Nachweis von GRP78

3.1.4 Die Kinase Aktivität von Raf-1 wird nicht direkt von HSP70/GRP78 reguliert

Nachdem die Assoziation von HSP/GRP und Raf-1 als gesichert betrachtet werden kann, wurden Schritte unternommen, um eine physiologische Relevanz dieser Assoziation zu belegen. Als erste Möglichkeit wurde eine direkte Beeinflussung der Kinase Aktivität überprüft. Nachdem GST-freies Raf und bakteriell exprimiertes HSP70 und GRP78 über Nacht bei 4°C inkubiert wurden, wurde ein Kinase Assay mit MEK- als Substrat durchgeführt. Wie in Abb. 3.5 erkennbar ist, konnte kein direkter Einfluß von HSP/GRP Assoziation auf die Kinase Aktivität von Raf-1 belegt werden. Die tatsächliche Assoziation von Raf-1 und GRP78 oder HSP70 *in vitro* wurde überprüft und tatsächlich gefunden (s. Abb. 3.4).

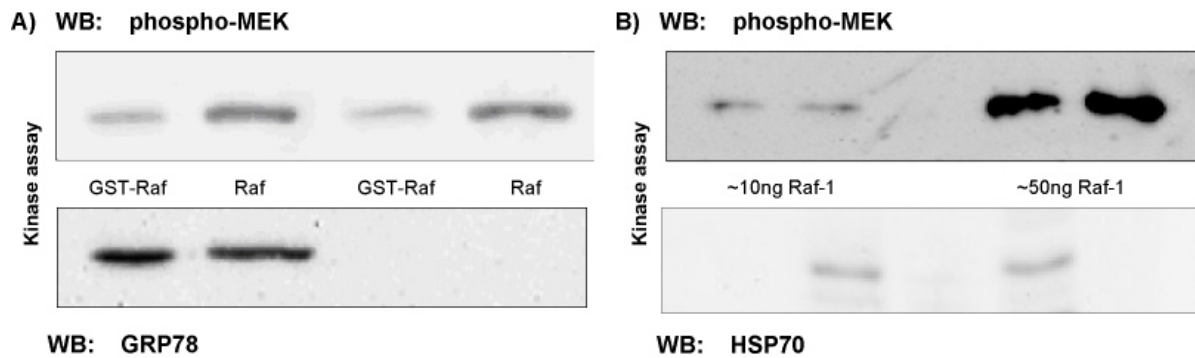


Abb. 3.5 *Western-Blots gegen phospho-MEK als Maß der Aktivität von Raf-1. Kinase Assays wurden nach Assoziation von Raf-1 mit HSP/GRP durchgeführt. A: Vergleich GST-Raf-1/GST-freies Raf-1 B: Vergleich von verschiedenen Mengen GST-freien Raf-1*

3.1.5 Die Affinität von HSP70/GRP78 ist selektiv für verschiedene Raf-1 Mutanten

Nachdem keine direkte Beeinflussung der Kinase Aktivität von Raf-1 durch HSP/GRP gesehen werden konnte, wurde nach indirekten Hinweisen gesucht. Ein Hinweis könnte die Präferenz der Assoziation von HSP/GRP mit Raf-1 in verschiedenen Aktivitätszuständen sein. In NIH 3T3 Fibroblasten wurden verschieden flag-getaggte Mutanten von Raf-1 transfiziert und eine Co-IP gegen das Flag-Epitop durchgeführt und nachfolgend im Western Blot GRP/HSP nachgewiesen. Wie in Abb. 3.6 erkennbar ist, wurde insbesondere bei der CAAX Mutante, die eine Erkennungssequenz für die Membran enthält, und somit präaktiviert ist, eine verminderte Affinität zu HSP/GRP gefunden. Im Gegensatz dazu wurde für die Raf-1 YY340/341FF Mutante, die in ihrer Aktivierbarkeit eingeschränkt ist (Nollen and Morimoto, 2002), ebenfalls eine verminderte Affinität zu HSP70 belegt.

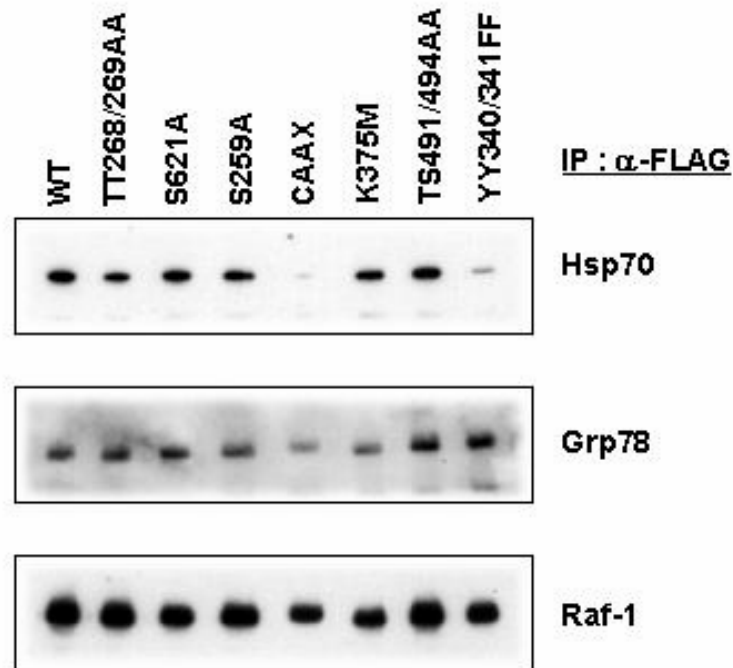


Abb. 3.6 *Western-Blots gegen HSP/GRP nach Co-IP gegen das Flag-Epitop aus mit verschiedenen Mutanten von Raf-1 transfizierten Zellen. Erklärung der Mutanten im Text. Normalisiert wurde mit der Menge an immunpräzipitiertem Raf-1.*

3.2 Einfluss von 14-3-3 auf die Regulation von Raf-1 durch PKA

3.2.1 Die PKA vermittelte Inhibition von Raf-1 wird durch 14-3-3 aufgehoben

Die Regulation der Kinase Aktivität von Raf-1 über die Phosphorylierung durch PKA ist mehrfach belegt worden ((Burgering et al., 1993), (Cook and McCormick, 1993), (Wu et al., 1993), Übersicht in (Houslay and Kolch, 2000)). In Abb. 3.7a ist in einem *in vitro* Kinase Assay mit MEK- als Substrat die Inhibition der Raf-1 Kinase-Aktivität durch PKA dargestellt. In diesen Experimenten wurden identische Mengen an Raf-1 und MEK eingesetzt, dieses wurde durch Western Blots überprüft (Daten nicht immer gezeigt, sonst: vgl. Abb. 3.7b unteres Feld).

Da sowohl Phosphorylierungsstellen von PKA als auch putative Bindungsstellen für das Adaptorprotein 14-3-3 an identischen Serin-Resten vermutet bzw. belegt wurden,

wurde eine Einflußnahme von 14-3-3 auf die PKA abhängige Inhibition von Raf-1 überprüft. Bei Zugabe von 14-3-3 zeigt sich nicht nur eine generelle Verstärkung der Kinase Aktivität von Raf-1 sondern, auch eine Reversion der PKA abhängigen Inhibition.

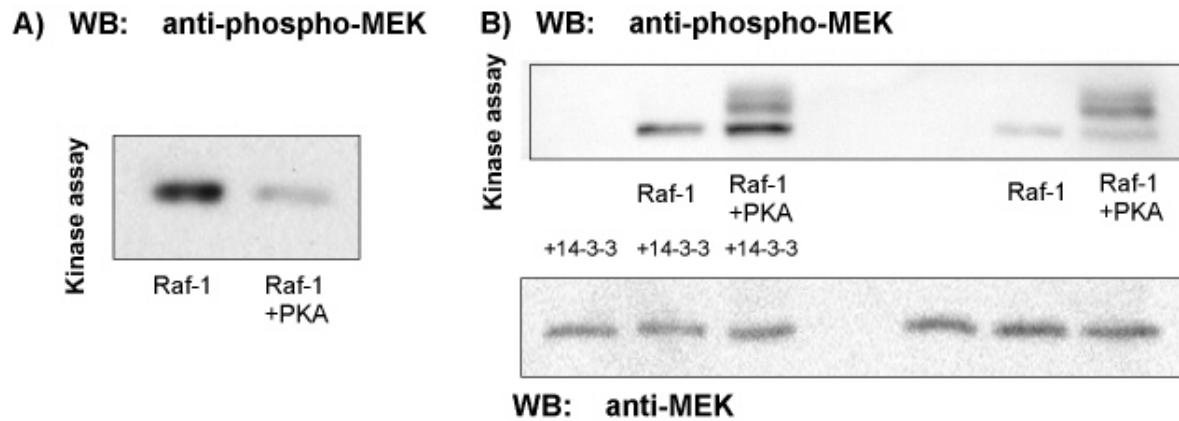


Abb. 3.7 *Western-Blots gegen phospho-MEK als Maß der Aktivität von Raf-1. A: Kinase Assays wurden vor und nach Inkubation von Raf-1 mit PKA durchgeführt. B: Der Einfluß von 14-3-3 nach Inkubation von Raf-1 mit PKA wurde überprüft.*

3.2.2 Die Wirkung von 14-3-3 ist unterschiedlich in Raf-1 Mutanten

In einem *in vitro* Ansatz wurde überprüft, in wie weit in SF-9 Zellen exprimierte Mutanten von Raf-1 durch eine Phosphorylierung durch PKA in ihrer Aktivität reguliert werden können. Die hier verwendeten Mutanten S259A und S621A sind durch den Austausch der entsprechenden Serin-Reste nicht phosphorylierbar, jedoch sind alle weiteren Phosphorylierungsstellen zugänglich. Die GNX-Mutante umfasst nur die Kinase Domäne von Raf-1, daher ist die Anzahl an Phosphorylierungsstellen hier im Vergleich zu den Mutanten und dem Wildtyp begrenzt.

Wie in Abb. 3.8 zu erkennen ist, ist bei Wildtyp, S259A- und GNX-Mutante eine deutliche Inhibition der Raf-1 Kinase Aktivität gegenüber MEK durch PKA zu sehen. Die Reversion dieser PKA abhängigen Wirkung durch 14-3-3 ist beim Wildtyp und weniger stark ausgeprägt bei der S259A Mutante auch zu beobachten. Die GNX-Mutante hingegen zeigt einen geringeren Einfluß von 14-3-3.

Die S621A Mutante von Raf-1 ist im Gegensatz zum Wildtyp nicht von PKA zu beeinflussen. Ausschließlich die gemeinsame Gegenwart von 14-3-3 und PKA inhibiert die Kinase Aktivität von Raf-1.

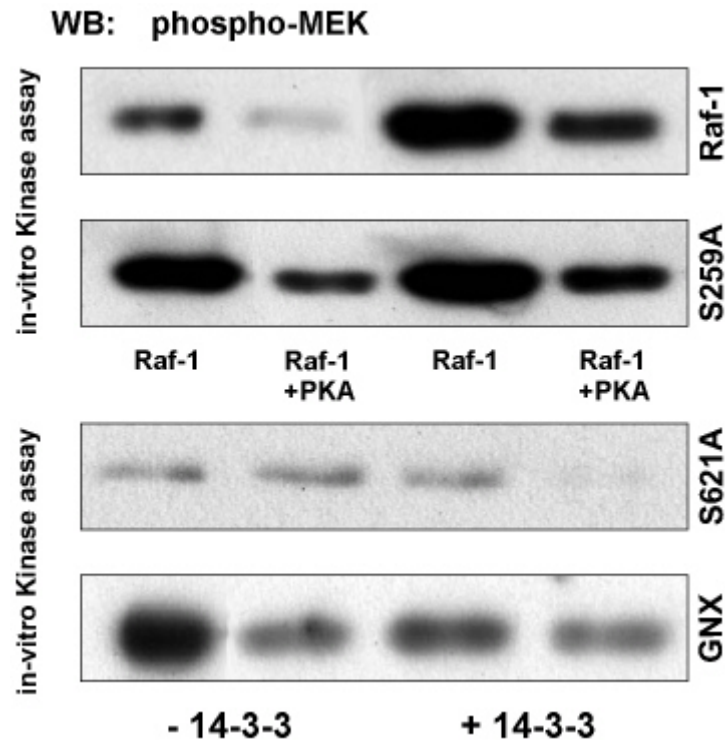


Abb. 3.8 *Western-Blots gegen phospho-MEK als Maß der Aktivität von Raf-1. Kinase Assays wurden nach Phosphorylierung von verschiedenen Raf-1 Mutanten mit PKA durchgeführt.*

3.2.3 Einfluss von Mutationen von 14-3-3 auf die Reversion der Inhibition

Das in der Literatur verbreitete Modell, nach dem 14-3-3 über die Bindung an phosphorylierten Serin-Reste von Raf-1 und nachfolgende Dimerisierung eine inaktive Konformation stabilisiert und 14-3-3 auch bei der Aktivierung von Raf-1 eine Rolle spielt, wurde in der Einleitung bereits vorgestellt. Die in den vorangegangenen Kapitel vorgestellte Einflußnahme von 14-3-3 auf die Kinase Aktivität von Raf-1 könnte dieses Modell stützen. Um zu überprüfen, in wie weit eine direkte Interaktion von Raf-1 und 14-3-3 für die Reversion der PKA abhängigen Inhibition von Raf-1 notwendig ist, wurde das Verhalten einer der V176D Mutante von 14-3-3 (V176D) untersucht. Diese Mutante ist in Ihrer Interaktion mit Raf-1 gestört (Wang et al.,

1998). Weiterhin wurde mit einer dimerisationsnegativen Mutante von 14-3-3 (dn14-3-3) überprüft, ob eine Dimerisierung von 14-3-3 notwendig in der Reversion der PKA abhängigen Inhibition von Raf-1 ist.

4 Diskussion

4.1 GST-Pulldown Experimente mit GST-Raf-1

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, neue assoziierte Faktoren der Protein Kinase Raf-1 zu finden. Da Versuche mit dem yeast two hybrid system in der Arbeitsgruppe bereits an einer sehr hohen Zahl von falsch positiven scheiterten (per. Kommunikation H. Mischak), wurde hier eine GST Pulldown Strategie verfolgt. Initiale Experimente, die full-length GST-Raf-1 als Köder für assoziierte Proteine einsetzten, scheiterten wegen der zu unreinen Isolation des rekombinanten Proteins aus SF-9 Zellen (s. Abb. 3.1a). Eine Verbesserung der Qualität der GST-Raf-1 Präparation mit biochemischen Methoden (vgl. 3.1.1) in einem akzeptablen Zeitrahmen blieb erfolglos, deswegen wurden alternative Köder gesucht. Hier kamen GST-konjugierte Fragmente von Raf-1, die die Regionen um Serin 259 und Serin 621 umspannen, zum Einsatz. Diese Fragmente wurden in der Gruppe von W. Kölch in Glasgow generiert und freundlicherweise für dieses Projekt zur Verfügung gestellt. Die zentralen Serin-Reste dieser Fragmente wurden in der Literatur als Phosphorylierungsstellen für PKA und als notwendig für die Bindung von 14-3-3 gefunden ((Dumaz and Marais, 2003), (Mischak et al., 1996), vgl. s.u.). Im Zusammenhang mit der Regulierbarkeit von Raf-1 durch 14-3-3 und PKA sind diese Regionen also schon bekannt. Die Vermutung liegt nahe, dass weitere regulatorische Proteine um diese Stellen konkurrieren bzw. phosphorylierungsabhängig gebunden werden. Jeder Hinweis auf eine Phosphorylierungsabhängigkeit der Bindung schlägt meiner Einschätzung nach in diesem Zusammenhang eine physiologische Rolle des assoziierten Proteins vor.

Wie in Abb. 3.2 deutlich zu sehen ist, ist eine starke Präferenz der Bindung von HSP/GRP für das S259 Fragment von Raf-1 zu sehen, wobei auch das S621 Fragment als auch full-length Raf-1 gebunden wird. Die Wahl der Fragmente als sinnvolle Ausweichmöglichkeit ist hiermit belegt, ein weiterer Beleg für die Validität des Einsatzes der verkürzten Raf Fragmente ist die gefundene Assoziation mit der beta/gamma Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins (Daten nicht gezeigt), welche bereits mehrfach als mit Raf-1 assoziiert beschrieben wurde (Slupsky et al., 1999), (Pumiglia et al., 1995).

Neben dieser Positivkontrolle sind die Western-Blots der GST-pulldowns und die Immunopräzipitationsassays ein ausreichender Beleg dafür, dass eine Assoziation von Raf-1 und HSP/GRP tatsächlich besteht. Wie in Kapitel 3.1.2 durch Verwendung von spezifischen HSP70 und GRP78 Antikörpern im Immunoblot gezeigt, konnte die Identität von HSP/GRP übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie belegt werden. Weitergehend wurden durch Co-Immunopräzipitationsexperimente in einem anderen Zellsystem, der embryonalen Maus Fibroblastenzelllinie NIH 3T3, und mit einer anderen Methode die Assoziation von HSP/GRP und Raf-1 weiter unterstützt. Neben Verwendung von Raf-1 spezifischen Antikörpern zur Co-Immunopräzipitation von HSP/GRP wurde auch der reziproke Ansatz ausgeführt, in dem Raf-1 in Immunopräzipitaten von HSP70 und GRP78 nachgewiesen wurde.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Beteiligung von S621 in der Regulation von Raf-1 durch 14-3-3 und PKA noch ungeklärt (vgl. Kapitel 1.3). Hinweise auf eine Teilnahme von S621 wurden an der isolierten Kinase-Domäne gewonnen (Mischak et al., 1996), in späteren Experimenten wurde der Region um S621 eine im Vergleich zu S259 (Dhillon et al., 2002b) und S233 (Dumaz and Marais, 2003) deutlich untergeordnete Rolle zugesprochen. Auch dieses deckt sich mit den in den GST-pulldown Experimenten gewonnenen Daten bezüglich der Bindungspräferenz von HSP/GRP. Die im Vergleich zum isolierten S259 Bereich weniger ausgeprägte Assoziation des full-length Proteins mit HSP/GRP wurde nicht näher untersucht. Eine erhöhte Affinität der isolierten Bindungsstelle im Gegensatz zum physiologisch gefalteten bzw. u.U. durch den GST-Anhang sogar unkorrekt gefalteten Protein ist hingegen leicht vorstellbar.

4.2 HSP70 und GRP78

Die beiden als mit Raf-1 assoziiert gefundenen Chaperone der HSP70 Familie HSP70 und GRP78 werden in der Literatur in verschiedenen subzellulären Apartments lokalisiert beschrieben (Übersicht in (Nollen and Morimoto, 2002)). Obwohl durch das Vorkommen von GRP78 im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) im Gegensatz zur zytosolischen Position von HSP70 sind diese Chaperone an vergleichbaren Abläufen beteiligt und werden in der Literatur oftmals

als analog beschrieben (Meunier et al., 2002). Zu Beginn dieser Arbeit wurde in der Literatur keine Interaktion zwischen HSP/GRP und Raf-1 beschrieben.

Beide Proteine sind über ihre ATPase Domäne (vgl. Abb. 4.1) in der Lage, ATP und ADP zu binden. Die Bindung des Substrats passiert am C-terminalen Ende von HSP70, die konformationelle Veränderung des Substrats wurde bisher als gebunden an eine Hydrolyse von ATP gesehen (Freeman et al., 1995). Neuere Untersuchungen sprechen von einer Unabhängigkeit des ATP Zyklus und der Wirkung von HSP70 als Chaperon (Nollen et al., 2001). Neben der aktiven Rolle von HSP70 bei der Maturation und Restitution von Proteinen ist HSP70 auch an der Stabilisierung von Proteinen beteiligt (Gething and Sambrook, 1992), (McClellan and Frydman, 2001).

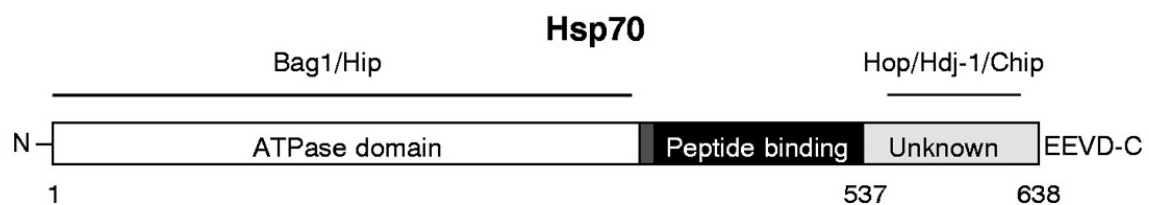


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Struktur von HSP70 (nach (Nollen and Morimoto, 2002)). Bindungsdomänen für interagierende Co-Chaperone sind durch Benennung der entsprechenden Proteine angezeigt.

Für HSP70 sind eine Anzahl von Co-Chaperone beschrieben, u.a. HSP40/Hdj1, HSC70 Interacting Protein (Hip), HSP70-HSP90 organising Protein (Hop), Chip-1, Cair-1 und Bag-1. HSP40/Hdj wurde initial als Protein mit aktivierendem Einfluß auf die restitutive Aktivität von HSP70 gefunden (Nollen et al., 2001). In neueren Berichten wird HSP40 im Zusammenspiel mit Hop als integraler Anteil für den Aufbau von HSP70-HSP90 Komplexen beschrieben (Hernandez et al., 2002) (vgl. Kapitel 4.3).

Für Bag-1, ein als aktivitätsmindernd beschriebenes Co-Chaperone von HSP70 (Takayama et al., 1997) und ein anti-apoptotisch wirkendes Protein, ist im Hinblick auf seine Einflußnahme auf die Aktivität der MAPK-Kaskade beschrieben und speziell Raf-1 beschrieben worden (Stokoe and McCormick, 1997). Hier wurde davon ausgegangen, daß eine Konkurrenz zwischen Raf-1 und HSP70 um Bag-1 besteht,

bei der Bag-1 aktivierend auf Raf-1 einwirkt, wenn es nicht durch in Stresssituationen erhöhte Mengen von HSP70 gebunden wird. Nachfolgend wurde jedoch gezeigt, das Bag-1 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 HSP70 bindet, wobei Bag-1 in physiologischen Verhältnissen nur zu einem Prozent der Menge an HSP70 vorliegt. Dieses Missverhältnis, das auch das Verhältnis zu Raf-1 betrifft, macht eine grundsätzliche physiologische Bedeutung außerhalb von Überexpressionssystemen der gefundenen Einflüsse von Bag-1 unwahrscheinlich. In Experimenten mit einem minimalen *in vitro* Chaperon System wurde dies belegt. Eine direkte Beeinflussung von HSP70 durch Bag-1 ergab sich in physiologischen Situationen (Kanelakis et al., 1999) nicht. Eine Bindung von HSP70 an Raf-1 über Bag-1 in den GST-Pulldown Experimenten und Co-Immunopräzipitationen wurde überprüft. In allen überprüften Assoziationen lag die Menge an gebundenen Bag-1 unterhalb der Nachweisgrenze.

GRP78 wird hauptsächlich als am endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert beschrieben und ist wichtig für Translokation von Polypeptiden über die Membran des ER (Brodsky et al., 1995), für die Reifung (Kuznetsov *et al.*, 1997) und den Rücktransport falsch gefalteter Proteine (Plemper et al., 1997). Bisher sind keine Belege für das physiologische Erscheinen von GRP78 außerhalb des ER publiziert worden. Auf der anderen Seite ist jedoch auch eine Lokalisation von Raf-1 an der ER-Membran beschrieben, wobei die Aktivierbarkeit von Raf-1 auch an der ER-Membran erhalten blieb. Nichtsdestotrotz ist HSP70 unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Aufschluß der Kompartimente wie in GST-pulldown oder Immunopräzipitationen, sicherlich ein sehr viel wahrscheinlicherer Assoziationspartner für Raf-1. Wie bereits weiter oben erwähnt, ist die Ähnlichkeit der beiden Chaperone sowohl im Aufbau (Green *et al.*, 1995), als auch in Aktivität sehr groß.

Die physiologische Relevanz der Assoziation von GRP/HSP und Raf-1 wird nachfolgend besprochen.

4.3 Über die physiologische Relevanz der Assoziation von GRP/HSP und Raf

Die physiologische Rolle der Assoziation von HSP70 und GRP78 mit Raf-1 wurde mit einer Reihe von Experimenten untersucht. Der Versuch, einen direkten Einfluß der Assoziationen auf die Kinaseaktivität von Raf-1 *in vitro* zu belegen war nicht erfolgreich (vgl. Kapitel 3.1.4). Eine Beeinflussung der Aktivität von Apoptosis Signal-

Regulating Kinase 1 (ASK1), einer MAPKK Kinase analog zu Raf-1, durch ein Protein der HSP70 Familie wurde erst kürzlich beschrieben (Park et al., 2002). Hier konnte ein direkter Einfluß von dem eng mit HSP70/GRP78 verwandten HSP72 auf ASK1 nachgewiesen werden und ein direkter mechanistischer Ablauf des Einwirkens von HSP72 auf apoptotische Vorgänge geklärt werden.

Hinweise auf die Rolle der Raf-1 HSP/GRP Assoziation können aus den Untersuchungen der Assoziation von HSP/GRP mit überexprimierten Mutanten von Raf-1, die u.a. verschiedenen Aktivierungsstadien nachbilden (vgl. Kapitel 3.1.5), gezogen werden. Die verminderte Präferenz von GRP78 und HSP70 für die konstitutiv aktive, in der Membran verankerte CAAX-Mutante (Stokoe et al., 1994) ist der bedeutsamste Unterschied, der gezeigt werden konnte. Darauf aufbauend kann man spekulieren, dass eine Assoziation von HSP/GRP nicht in einem aktiven Stadium des Lebenszyklus von Raf-1 passieren wird. Dies ist wiederum im Einklang mit den oben erwähnten Literaturstellen, die eine Reduktion der Aktivität von ASK1 durch HSP72 beschreiben. In diesem Stadium des Projektes ließ sich vermuten, dass eine indirekte, Wirkung auf Raf-1 ausgeübt würde. Die wahrscheinlichste Auswirkung unter Berücksichtigung der Hauptaufgaben zellulärer Chaperone liegt in einer Stabilisierung der Konformation des Proteins, in diesem Fall war es verlockend, auf die Stabilisierung einer eher inaktiven bzw. zytosolischen Form von Raf-1 zu spekulieren. Neueste Berichte aus der Literatur zeigen, dass die in dieser Arbeit dargestellte Assoziation von HSP70 und Raf-1 tatsächlich physiologische Konsequenzen hat und die hier gezeigten Ergebnisse dem neuesten Stand der Forschung entsprechen.

Physiologisch liegt Raf-1 in einem Multiprotein-Komplex mit den Chaperonen HSP90 (Schulte et al., 1995) und cdc37 (Stepanova et al., 1996) vor. Versuche mit Geldanamycin, einem spezifischen HSP90 Antagonisten, zeigten, dass eine Bindung von Raf-1 an HSP90 eine *Kondition sine qua non* für die Stabilität von Raf-1 und seine Aktivität als Signaltransduktor ist (Schulte et al., 1995). Überexpression von cdc37, das in seiner Bindungsfähigkeit zu HSP90 gestört ist, konnte ebenfalls die Funktionalität von Raf-1 unterbinden (Grammatikakis et al., 1999). Zum Beginn der Studie waren keine Berichte bekannt, die HSP70 als Teil dieses chaperonalen Komplexes identifizierten.

Neben dem oben erwähnten Bag-1, ist eine ganze Familie von sechs Chaperonen in verschiedenen Organismen von Hefen bis zum Menschen gefunden worden (Übersicht in (Takayama and Reed, 2001)), die als verbindendes Merkmal alle eine C-terminale Bag-Domäne als Ort der Interaktion mit der ATP-bindenden Domäne von HSP70 besitzen. Cair-1/Bag-3 ist ein weiteres Mitglied dieser Familie und reguliert HSP vermittelte Protektion von Kinasen (Doong et al., 2000). Dies passiert über einen Chaperon Komplex, der vor proteasomaler Degradation schützt. *In vivo* kann die Degradation durch Zugabe von HSP90 spezifischem Inhibitor Geldanamycin induziert werden, wobei eine Überexpression von Cair-1 einen protektiven Effekt auf Klienten Proteine wie Akt (Doong et al., 2003) hat. Dieser Effekt wurde auch belegt für Raf-1 Protektion durch full-length Cair-1, während eine Mutante, die eine Deletion in der Bag-Domäne aufwies, nicht in der Lage war, einen Geldanamycin induzierten Abbau von Raf-1 zu verhindern. Wie bereits oben erwähnt, ist diese Domäne für die Interaktion mit HSP70 notwendig, was ein indirekter Beleg für die Beteiligung von HSP70 an dem Raf-1 stabilisierenden chaperonalen Komplex ist (Doong et al., 2003). Diese Vermutung wird unterstützt von GST-pulldowns und Immunopräzipitationsassays, in denen Cair-1 nur HSP70 und nicht HSP90 gebunden hat.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Assoziation von HSP70 mit Raf-1 belegt die Involvierung von HSP70 an der unverzichtbaren Ausbildung eines Multiproteinkomplexes, der die komplexe Regulation von Raf-1 überhaupt erst möglich macht. Die gefundenen Zusammenhänge sind in Abb. 4.3 schematisch dargestellt.

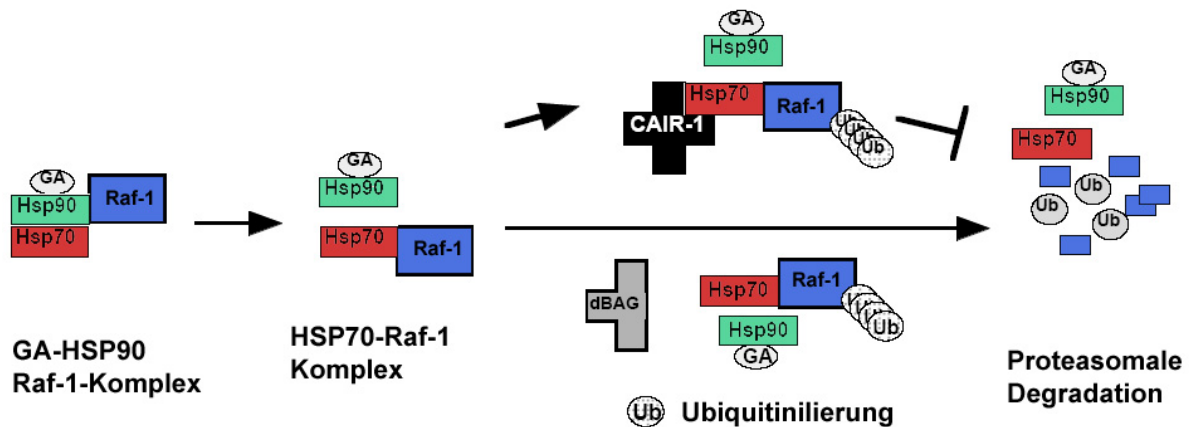


Abb. 4.3 Schematische Darstellung der physiologischen Rolle von HSP70 in der Stabilisierung von Raf-1

4.4 Über die Rolle von 14-3-3 in der PKA vermittelten Inhibition von Raf-1

Die Einflußnahme von 14-3-3 auf die PKA medierte Inhibition der Raf-1 Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich *in vitro* untersucht. Wie in Abb. 3.6 zu erkennen, kann die in der Literatur mehrfach belegte ((Burgering et al., 1993), (Cook and McCormick, 1993), (Wu et al., 1993), Übersicht in (Houslay and Kolch, 2000)) Inhibition von Raf-1 durch PKA auch *in vitro* gezeigt werden. Eine bisher in der Literatur *in vitro* nicht beschriebene Wirkung von 14-3-3 auf Raf-1 ist in Abb. 3.7b zu sehen. Nicht nur die basale Kinase Aktivität von Raf-1 wird durch Zugabe von 14-3-3 erhöht, sondern es ist auch ein protektiver Einfluß von 14-3-3 auf die PKA vermittelte Inhibition von Raf-1 zu erkennen.

In vivo Daten belegen, dass nur 30% des physiologisch in ruhenden Zellen vorliegenden Raf-1 an Serin 259 phosphoryliert vorliegen (Dumaz and Marais, 2003), und somit auch an 14-3-3 gebunden sind. Laut den in der Literatur vorherrschenden Meinungen wird die PKA abhängige Inhibition durch 14-3-3 vermittelt (Rommel et al., 1999), (Tzivion et al., 1998), (Light et al., 2002), (Dhillon et al., 2002b), (Dumaz and Marais, 2003). Hierbei wird davon ausgegangen, daß konformationelle Änderungen durch die Bindung von 14-3-3 an phosphorylierten Serin-Reste induziert werden, die letztlich eine weitergehende Aktivierung von Raf-1 verhindern. Die hier *in vitro* gewonnenen Daten stehen im Widerspruch zu neueren *in vivo* Daten, die nicht von

einer aktivierenden oder protektiven Rolle von 14-3-3 ausgehen (Dumaz and Marais, 2003), (Light et al., 2002), (Dhillon et al., 2002b).

Wie in der Einleitung erwähnt, sind bisher drei Phosphorylierungsstellen von Raf-1 in der Literatur akzeptiert, dies sind die Serin-Reste Serin 43, 259 und 621 (vgl. Kapitel 1.4). Eine Rolle von Serin 43, welches in der Ras BD (Bindende Domäne) liegt, wird darin gesehen, dass die Bindung von ras zu Raf-1 gestört wird (Wu et al., 1993) (Ramstad et al., 2000). In Versuchen mit S43A Mutanten von Raf-1 wurden diese Befunde nicht belegt, bzw. die forskolinabhängige Inhibition von Raf-1 wurde nicht beeinträchtigt (Sidovar et al., 2000). In dem in dieser Arbeit benutzten *in vivo* Versuchsaufbau sollte die Phosphorylierung von Serin43 daher keine Rolle spielen, aus oben beschriebenen Gründen kann ras vermittelte Raf-1 Rekrutierung ebenfalls keinen Anteil an der Raf-1 Inhibition haben.

Die beiden weiteren PKA abhängigen Phosphorylierungsstellen Serin 259 und Serin 621 wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von SF-9 exprimierten, rekombinanten Mutanten von Raf-1 *in vitro* untersucht (vgl. Kapitel 3.4). Der grundsätzliche Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Situationen ist auch in Abb. 3.7 erkennbar. Der protektive Einfluss von 14-3-3 im Wildtyp ist wiederum dargestellt, und wird deutlich geringer bei Verwendung der S259A Mutante. Dies ist jedoch nicht zwangsläufig allein auf das Wegfallen der 14-3-3 Bindungsstelle zurückzuführen, sondern auf eine leichte Erhöhung der basalen Aktivität von S259A Mutanten (Michaud et al., 1995), (Dhillon et al., 2002a) die die Unterschiede zwischen den Ansätzen weniger deutlich erkennbar macht.

Die Ergebnisse sowohl der S621A Mutante, die in der Literatur bereits als Kinase inaktiv beschrieben wurde (Mischak et al., 1996), (Morrison et al., 1993) bzw. der isolierten Kinase Domäne GNX, die eine Deletion der regulativen Domäne von aa 23 bis aa 301 enthält, sind nicht sehr aussagekräftig. Das basale Level der Raf-1 Kinase Aktivität der S621A Mutante ist so gering, dass Aussagen zur Regulation nicht getroffen werden können. Interessant ist, dass die GNX Ansätze keine Erhöhung der Raf-1 Kinase Aktivität durch 14-3-3 Zugabe zeigen. Mit einer anderen Deletionsmutante von Raf-1, die nur noch aa 326-648 umfasst, wurde *in vitro* eine minimale Erhöhung der Kinase Aktivität durch Zugabe von 14-3-3 gezeigt (Thorson et al., 1998). Dies bestätigt, dass ein Einfluss von 14-3-3 im Bereich der

regulatorischen Domäne passiert und schlägt übereinstimmend mit der Literatur eine weniger wichtigere Rolle für die S621 Phosphorylierung vor (vgl. (Dhillon et al., 2002b), (Dumaz and Marais, 2003)).

Im Vergleich zu oben dargestellten *in vitro* Belegen wird sowohl im Modell von Marais et al. als auch im Modell von Kölch et al. davon ausgegangen, dass 14-3-3 die Relokalisation von Raf-1 an die Membran behindert (Dumaz and Marais, 2003), (Dhillon et al., 2002b). Von Marais et al. wird nicht die Veränderung der Kinase Aktivität von Raf-1 in den Vordergrund gestellt, sondern die Rekrutierbarkeit von Raf-1 zur Membran und nachfolgende Aktivierbarkeit. Dies wird gestützt von Belegen, die zeigen, dass S259A Mutanten eine veränderte zelluläre Lokalisation zeigen und verminderte S338 Phosphorylierung aufweisen, für die eine Membranständigkeit notwendig ist (Dhillon et al., 2002b).

Ebenso wird von einer Konkurrenz von ras und 14-3-3 um die Bindung an Serin259 berichtet. In den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen sind keine membranösen Anteile und kein rekombinantes ras vorhanden. Eine direkte Konkurrenz von 14-3-3 und ras um Bindungsstellen kann also auch nicht gegeben sein. Auch ist eine Rekrutierung von Raf-1 an die Plasma-Membran in unserem Modell nicht notwendig bzw. nicht möglich

Die *in vitro* gewonnenen Daten müssen demnach in einem anderen Kontext betrachtet werden, ein direkter Vergleich mit den oben erwähnten *in vivo* Daten ist nur beschränkt sinnvoll oder möglich. Der Einfluss von PKA auf die Aktivität von Raf-1 kann unter den gewählten Bedingungen sehr wahrscheinlich nur auf eine direkte Phosphorylierung von Raf-1 zurückgeführt werden. Direkte *in vitro* Versuche sind von beiden Gruppen bisher nicht durchgeführt worden (pers. Kommunikation W. Kölch und R. Marais).

Neueste Befunde (Dumaz and Marais, 2003) beschreiben den Serin Rest S233 als PKA Phosphorylierungsstelle und 14-3-3 Bindungsstelle. Nach dem allgemeinen Modell für 14-3-3 Bindungen von Yaffe (Yaffe, 2002), nachdem es eine „Gatekeeper-site“ gibt, die eine starke Bindung zu 14-3-3 aufbaut und danach der ungebundene Teil eines 14-3-3 Dimers wegen seiner hohen lokalen Konzentration die zweite, mit weniger Affinität zu 14-3-3 ausgestattete Region bindet. Sowohl die historisch

vorgeschlagene Bindung mit S621 als auch die Bindung zu S233 wären konkordant mit diesem theoretische Modell, jedoch weisen sowohl die hier gezeigten *in vitro* Daten als auch andere Anzeichen (s. o.) auf eine weniger wichtige Rolle von S621.

Neben den oben beschriebenen Erkenntnissen ist es schwierig, aus den hier vorliegenden *in vitro* Daten eine weitergehende Aussage über die Rolle von 14-3-3 zu treffen. Es wurden weiterhin eine Reihe von inkonklusiven Experimenten durchgeführt, die die zeitliche Abfolge der Interaktion zwischen Raf-1 und 14-3-3 und die Abhängigkeit der PKA vermittelten Inhibition von Raf-1 von der Bindungsfähigkeit von 14-3-3 an Raf-1 und der Dimerisierung von 14-3-3 beleuchten sollten. Diese Experimente und auch Versuche *in vivo* konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr fortgeführt werden. Letztendlich erscheint eine weitergehende Untersuchung der *in vivo* Situation wahrscheinlich als aussichtsreichste Möglichkeit, die sehr schwer fassbare Physiologie der 14-3-3 Interaktion mit Raf-1 unter dem inhibierenden Einfluss von PKA weiter zu charakterisieren.

5. Literaturverzeichnis

Abraham,D., Podar,K., Pacher,M., Kubicek,M., Welzel,N., Hemmings,B.A., Dilworth,S.M., Mischak,H., Kolch,W., and Baccarini,M. (2000) Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J.Biol.Chem.* 275, 22300-22304.

Aitken,A., Baxter,H., Dubois,T., Clokie,S., Mackie,S., Mitchell,K., Peden,A., and Zemlickova,E. (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem.Soc.Trans.* 30, 351-360.

Aitken,A., Howell,S., Jones,D., Madrazo,J., and Patel,Y. (1995) 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J.Biol.Chem.* 270, 5706-5709.

Avruch,J., Khokhlatchev,A., Kyriakis,J.M., Luo,Z., Tzivion,G., Vavvas,D., and 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.

Blasi,E., Mathieson,B.J., Varesio,L., Cleveland,J.L., Borchert,P.A., and Rapp,U.R. (1985) Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus. *Nature* 318, 667-670.

Brennscheidt,U., Riedel,D., Kolch,W., Bonifer,R., Brach,M.A., Ahlers,A., Mertelsmann,R.H., and Herrmann,F. (1994) Raf-1 is a necessary component of the mitogenic response of the human megakaryoblastic leukemia cell line MO7 to human stem cell factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, and interleukin 9. *Cell Growth Differ.* 5, 367-372.

Brodsky,J.L., Goeckeler,J., and Schekman,R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9643-9646.

Bruder,J.T., Heidecker,G., and Rapp,U.R. (1992) Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev.* 6, 545-556.

Burgering,B.M., Pronk,G.J., van Weeren,P.C., Chardin,P., and Bos,J.L. (1993) cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 12, 4211-4220.

Carroll,M.P. and May,W.S. (1994) Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J.Biol.Chem.* 269, 1249-1256.

Chong,H., Vikis,H.G., and Guan,K.L. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 15, 463-469.

Cleghon,V. and Morrison,D.K. (1994) Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *J.Biol.Chem.* 269, 17749-17755.

Cook,S.J. and McCormick,F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262, 1069-1072.

Daum,G., Eisenmann-Tappe,I., Fries,H.W., Troppmair,J., and Rapp,U.R. (1994) The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem.Sci.* 19, 474-480.

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

Dent,P., Jelinek,T., Morrison,D.K., Weber,M.J., and Sturgill,T.W. (1995) Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases. *Science* 268, 1902-1906.

Dhillon,A.S., Meikle,S., Yazici,Z., Eulitz,M., and Kolch,W. (2002a) Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* 21, 64-71.

Dhillon,A.S., Pollock,C., Steen,H., Shaw,P.E., Mischak,H., and Kolch,W. (2002b) Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol.Cell Biol.* 22, 3237-3246.

Diaz,B., Barnard,D., Filson,A., MacDonald,S., King,A., and Marshall,M. (1997) Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling.

Doong,H., Price,J., Kim,Y.S., Gasbarre,C., Probst,J., Liotta,L.A., Blanchette,J., Rizzo,K., and Kohn,E. (2000) CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C-gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene* 19, 4385-4395.

Doong,H., Rizzo,K., Fang,S., Kulpa,V., Weissman,A.M., and Kohn,E.C. (2003) CAIR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated Hsp90 client proteins. *J.Biol.Chem.* 278, 28490-28500.

Dumaz,N. and Marais,R. (2003) Protein kinase a blocks raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking raf-1 interaction with ras. *J.Biol.Chem.* 278, 29819-29823.

Fabian,J.R., Daar,I.O., and Morrison,D.K. (1993) Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol.Cell Biol.* 13, 7170-7179.

Freeman,B.C., Myers,M.P., Schumacher,R., and Morimoto,R.I. (1995) Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* 14, 2281-2292.

Gething,M.J. and Sambrook,J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.

Ghosh,S., Xie,W.Q., Quest,A.F., Mabrouk,G.M., Strum,J.C., and Bell,R.M. (1994) The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *J.Biol.Chem.* 269, 10000-10007.

Grammatikakis,N., Lin,J.H., Grammatikakis,A., Tsiichlis,P.N., and Cochran,B.H. (1999) p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol.Cell Biol.* 19, 1661-1672.

Green,J.M., Gu,L., Ifkovits,C., Kaumaya,P.T., Conrad,S., and Pierce,S.K. (1995) Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for members of the mammalian 70-kDa heat shock protein family. *Hybridoma* 14, 347-354.

Hafner,S., Adler,H.S., Mischak,H., Janosch,P., Heidecker,G., Wolfman,A., Pippig,S., Lohse,M., Ueffing,M., and Kolch,W. (1994) Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol.Cell Biol.* 14, 6696-6703.

Hagemann,C. and Rapp,U.R. (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp.Cell Res.* 253, 34-46.

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.

Hernandez,M.P., Sullivan,W.P., and Toft,D.O. (2002) The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J.Biol.Chem.* 277, 38294-38304.

Houslay,M.D. and Kolch,W. (2000) Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol.Pharmacol.* 58, 659-668.

Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Takahashi,N., Araki,K., Kuwano,R., and Takahashi,Y. (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 7084-7088.

Ishikawa,F., Sakai,R., Ochiai,M., Takaku,F., Sugimura,T., and Nagao,M. (1988) Identification of a transforming activity suppressing sequence in the c-raf oncogene. *Oncogene* 3, 653-658.

Janosch,P., Kieser,A., Eulitz,M., Lovric,J., Sauer,G., Reichert,M., Gounari,F., Buscher,D., Baccarini,M., Mischak,H., and Kolch,W. (2000) The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments. *FASEB J.* 14, 2008-2021.

Jaumot,M. and Hancock,J.F. (2001) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20, 3949-3958.

Kanelakis,K.C., Morishima,Y., Dittmar,K.D., Galigniana,M.D., Takayama,S., Reed,J.C., and Pratt,W.B. (1999) Differential effects of the hsp70-binding protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. *J.Biol.Chem.* 274, 34134-34140.

Kazanietz,M.G., Bustelo,X.R., Barbacid,M., Kolch,W., Mischak,H., Wong,G., Pettit,G.R., Bruns,J.D., and Blumberg,P.M. (1994) Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products. *J.Biol.Chem.* 269, 11590-11594.

Kerkhoff,E. and Rapp,U.R. (2001) The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. *Adv.Enzyme Regul.* 41, 261-267.

King,A.J., Sun,H., Diaz,B., Barnard,D., Miao,W., Bagrodia,S., and Marshall,M.S. (1998) The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.

Kolch,W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem.J.* 351 Pt 2, 289-305.

Kolch,W., Heidecker,G., Kochs,G., Hummel,R., Vahidi,H., Mischak,H., Finkenzeller,G., Marme,D., and Rapp,U.R. (1993a) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.

Kolch,W., Heidecker,G., Lloyd,P., and Rapp,U.R. (1991) Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* 349, 426-428.

Kolch,W., Heidecker,G., Troppmair,J., Yanagihara,K., Bassin,R.H., and Rapp,U.R. (1993b) Raf revertant cells resist transformation by non-nuclear oncogenes and are deficient in the induction of early response genes by TPA and serum. *Oncogene* 8, 361-370.

Kolch,W., Weissinger,E., Mischak,H., Troppmair,J., Showalter,S.D., Lloyd,P., Heidecker,G., and Rapp,U.R. (1990) Probing structure and function of the raf protein kinase domain with monoclonal antibodies. *Oncogene* 5, 713-720.

Kubicek,M., Pacher,M., Abraham,D., Podar,K., Eulitz,M., and Baccarini,M. (2002) Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J.Biol.Chem.* 277, 7913-7919.

Kuznetsov,G., Chen,L.B., and Nigam,S.K. (1997) Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 272, 3057-3063.

Light,Y., Paterson,H., and Marais,R. (2002) 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol.Cell Biol.* 22, 4984-4996.

Liu,D., Bienkowska,J., Petosa,C., Collier,R.J., Fu,H., and Liddington,R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376, 191-194.

Luo,Z., Diaz,B., Marshall,M.S., and Avruch,J. An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for ras-dependent Raf activation in situ.

Mason,C.S., Springer,C.J., Cooper,R.G., Superti-Furga,G., Marshall,C.J., and Marais,R. (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 18, 2137-2148.

Masters,S.C., Subramanian,R.R., Truong,A., Yang,H., Fujii,K., Zhang,H., and Fu,H. (2002) Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem.Soc.Trans.* 30, 360-365.

McClellan,A.J. and Frydman,J. (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat.Cell Biol.* 3, E51-E53.

Meunier,L., Usherwood,Y.K., Chung,K.T., and Hendershot,L.M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol.Biol.Cell* 13, 4456-4469.

Michaud,N.R., Fabian,J.R., Mathes,K.D., and 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- and Ras- independent manner. *Mol.Cell Biol.* 15, 3390-3397.

Mikula,M., Schreiber,M., Husak,Z., Kucerova,L., Ruth,J., Wieser,R., Zatloukal,K., Beug,H., Wagner,E.F., and Baccharini,M. (2001) Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf- 1 gene. *EMBO J.* 20, 1952-1962.

Mischak,H., Seitz,T., Janosch,P., Eulitz,M., Steen,H., Schellerer,M., Philipp,A., and Kolch,W. (1996) Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol.Cell Biol.* 16, 5409-5418.

Moodie,S.A., Paris,M.J., Kolch,W., and Wolfman,A. (1994) Association of MEK1 with p21ras.GMPPNP is dependent on B-Raf. *Mol.Cell Biol.* 14, 7153-7162.

Morrison,D.K., Heidecker,G., Rapp,U.R., and Copeland,T.D. (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J.Biol.Chem.* 268, 17309-17316.

Muslin,A.J., Tanner,J.W., Allen,P.M., and Shaw,A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889-897.

Nollen,E.A., Kabakov,A.E., Brunsting,J.F., Kanon,B., Hohfeld,J., and Kampinga,H.H. (2001) Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J.Biol.Chem.* 276, 4677-4682.

Nollen,E.A. and Morimoto,R.I. (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J.Cell Sci.* 115, 2809-2816.

Owaki,H., Varma,R., Gillis,B., Bruder,J.T., Rapp,U.R., Davis,L.S., and Geppert,T.D. (1993) Raf-1 is required for T cell IL2 production. *EMBO J.* 12, 4367-4373.

Park,H.S., Cho,S.G., Kim,C.K., Hwang,H.S., Noh,K.T., Kim,M.S., Huh,S.H., Kim,M.J., Ryoo,K., Kim,E.K., Kang,W.J., Lee,J.S., Seo,J.S., Ko,Y.G., Kim,S., and Choi,E.J. (2002) Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol.Cell Biol.* 22, 7721-7730.

Plempner,R.K., Bohmler,S., Bordallo,J., Sommer,T., and Wolf,D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.

Pumiglia,K.M., LeVine,H., Haske,T., Habib,T., Jove,R., and Decker,S.J. (1995) A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf- 1 protein kinase. *J.Biol.Chem.* 270, 14251-14254.

Qureshi,S.A., Rim,M., Bruder,J., Kolch,W., Rapp,U., Sukhatme,V.P., and Foster,D.A. (1991) An inhibitory mutant of c-Raf-1 blocks v-Src-induced activation of the Egr-1 promoter. *J.Biol.Chem.* 266, 20594-20597.

Ramstad,C., Sundvold,V., Johansen,H.K., and 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., Cleveland,J.L., Fredrickson,T.N., Holmes,K.L., Morse,H.C., III, Jansen,H.W., Patschinsky,T., and Bister,K. (1985) Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a raf(mil)/myc recombinant murine retrovirus. *J.Virol.* 55, 23-33.

Rapp,U.R., Goldsborough,M.D., Mark,G.E., Bonner,T.I., Groffen,J., Reynolds,F.H., Jr., and Stephenson,J.R. (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 4218-4222.

Reed,J.C., Yum,S., Cuddy,M.P., Turner,B.C., and Rapp,U.R. (1991) Differential regulation of the p72-74 RAF-1 kinase in 3T3 fibroblasts expressing ras or src oncogenes. *Cell Growth Differ.* 2, 235-243.

Robinson,M.J. and Cobb,M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 180-186.

Rommel,C., Clarke,B.A., Zimmermann,S., Nunez,L., Rossman,R., Reid,K., Moelling,K., Yancopoulos,G.D., and Glass,D.J. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286, 1738-1741.

Rosenquist,M., Alsterfjord,M., Larsson,C., and Sommarin,M. (2001) Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiol* 127, 142-149.

Schulte,T.W., Blagosklonny,M.V., Ingui,C., and Neckers,L. (1995) Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J.Biol.Chem.* 270, 24585-24588.

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.

Slupsky,J.R., Quitterer,U., Weber,C.K., Gierschik,P., Lohse,M.J., and Rapp,U.R. (1999) Binding of Gbetagamma subunits to cRaf1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling. *Curr.Biol.* 9, 971-974.

Sozeri,O., Vollmer,K., Liyanage,M., Frith,D., Kour,G., Mark,G.E., III, and Stabel,S. (1992) Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7, 2259-2262.

Stancato,L.F., Sakatsume,M., David,M., Dent,P., Dong,F., Petricoin,E.F., Krolewski,J.J., Silvennoinen,O., Saharinen,P., Pierce,J., Marshall,C.J., Sturgill,T., Finbloom,D.S., and Lerner,A.C. (1997) Beta interferon and oncostatin M activate Raf-1 and mitogen-activated protein kinase through a JAK1-dependent pathway. *Mol.Cell Biol.* 17, 3833-3840.

Stanton,V.P., Jr. and Cooper,G.M. (1987) Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Mol.Cell Biol.* 7, 1171-1179.

Stepanova,L., Leng,X., Parker,S.B., and Harper,J.W. (1996) Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.* 10, 1491-1502.

Stokoe,D., Macdonald,S.G., Cadwallader,K., Symons,M., and Hancock,J.F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264, 1463-1467.

Stokoe,D. and McCormick,F. (1997) Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J.* 16, 2384-2396.

Storm,S.M., Cleveland,J.L., and Rapp,U.R. (1990) Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 5, 345-351.

Takayama,S., Bimston,D.N., Matsuzawa,S., Freeman,B.C., Aime-Sempe,C., Xie,Z., Morimoto,R.I., and Reed,J.C. (1997) BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.* 16, 4887-4896.

Takayama,S. and Reed,J.C. (2001) Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat.Cell Biol.* 3, E237-E241.

Thompson,P.A., Ledbetter,J.A., Rapp,U.R., and Bolen,J.B. (1991) The Raf-1 serine-threonine kinase is a substrate for the p56lck protein tyrosine kinase in human T-cells. *Cell Growth Differ.* 2, 609-617.

Thorson,J.A., Yu,L.W., Hsu,A.L., Shih,N.Y., Graves,P.R., Tanner,J.W., Allen,P.M., Piwnica-Worms,H., and Shaw,A.S. (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol.Cell Biol.* 18, 5229-5238.

Tzivion,G., Luo,Z., and Avruch,J. (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 394, 88-92.

Tzivion,G., Shen,Y.H., and Zhu,J. (2001) 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 20, 6331-6338.

Vojtek,A.B., Hollenberg,S.M., and Cooper,J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205-214.

Wang,H., Zhang,L., Liddington,R., and Fu,H. (1998) Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3zeta disrupt its interaction with Raf-1 kinase. *J.Biol.Chem.* 273, 16297-16304.

Wang,W. and Shakes,D.C. (1996) Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J.Mol.Evol.* 43, 384-398.

Weissinger,E.M., Eissner,G., Grammer,C., Fackler,S., Haefner,B., Yoon,L.S., Lu,K.S., Bazarov,A., Sedivy,J.M., Mischak,H., and Kolch,W. (1997) Inhibition of the Raf-1 kinase by cyclic AMP agonists causes apoptosis of v-abl-transformed cells. *Mol.Cell Biol.* 17, 3229-3241.

Weston,C.R., Lambright,D.G., and Davis,R.J. (2002) Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science* 296, 2345-2347.

Williams,J.G., Drugan,J.K., Yi,G.S., Clark,G.J., Der,C.J., and Campbell,S.L. (2000) Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions. *J.Biol.Chem.* 275, 22172-22179.

Williams,N.G., Roberts,T.M., and Li,P. (1992) Both p21ras and 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.

Wojnowski,L., Stancato,L.F., Zimmer,A.M., Hahn,H., Beck,T.W., Lerner,A.C., Rapp,U.R., and Zimmer,A. (1998) Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech.Dev.* 76, 141-149.

Wu,J., Dent,P., Jelinek,T., Wolfman,A., Weber,M.J., and Sturgill,T.W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262, 1065-1069.

Xiao,B., Smerdon,S.J., Jones,D.H., Dodson,G.G., Soneji,Y., Aitken,A., and Gamblin,S.J. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 376, 188-191.

Yaffe,M.B. (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 513, 53-57.

Abkürzungsverzeichnis

Aa	Amminosäuren
ASK-1	Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BD	Bindungsdomäne
cAMP	zyklisches Adenosin-5`-diphosphat
cDNA	komplementäre DNA
Co-IP	Co-Immunopräzipitations Assay
CR	Konservierte Regionen
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamine Tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-glykol Tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ER	endoplasmatischen Reticulum
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	Fötales Kälberserum
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
GRP78	glucose related protein 78
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
HSP70	heat shock protein 70
HSP90	heat shock protein 70
IP	Immunopräzipitations Assay
JNK	Jun-N-terminal-Kinase
Lb	Luria-Bertoni-Medium
MAPK	mitogen-activated-protein kinase
MEK	mitogen-extracellular-activated kinase
MS	Massenspektrometrie
PAK	p21cdc42/rac1-activated serin/thronin Kinase
PBS	phosphate buffered saline

PDGF	Platelet derived growth factor
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulonylfluorid
PVDF	Polyvinulidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylphosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tbs	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TMD	Transmembran-Domänen
TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
WB	Western Blot

Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Hermann Haller, der es mir ermöglicht hat, die Doktorarbeit in der Abteilung Nephrologie anzufertigen.

Herr Harald Mischak hat mich durch seine enthusiastische und antreibende Art in ausgezeichnetem Maß motiviert und war in fachlichen Fragen nie um eine sinnvolle Anregung verlegen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mischak (Dominique Brandt, Axel Görke, Marion Heuer, Meike Hillmann, Jana König) danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und Miteinander. Besonderer Dank gebührt Meike Hillmann für ihre kompetente Hilfe bei allen Experimenten mit 14-3-3 und ihrem Engagement in der Organisation der Arbeitsgruppe und Dominique Brandt für weiterbringende Diskussionen und Alles.

Inna Dumler danke ich für die immens kurzfristige Übernahme meiner Betreuung im letzten Teil meiner Promotion und die nicht selbstverständliche wissenschaftliche Integration in die Arbeitsgruppe. Ihre Standpunkte in Wissenschaft und Leben gefallen mir gut.

Den Mitglieder der Arbeitsgruppe Dumler (Julia Kiian, Iris Kilian, Nelli Shushakova, Natalia Tkatchouk, Sergey Tkatchouk) danke ich für das warme Willkommen und die Unterstützung in allen fachlichen Fragen.

Ebenfalls möchte ich allen Wissenschaftlern, die ich im Verlauf meiner Doktorarbeit wegen Plasmiden oder Reagenzien angeschrieben habe, für ihre Hilfsbereitschaft danken. Sylvie Blond möchte ich für die Bereitstellung von GST-GRP78, Linda Hendershot für die Übersendung von GRP78 Konstrukten danken und besonders Amardeep Dhillon für die Hilfe bei den Experimenten mit Raf-1 Mutanten und 14-3-3. Meinen herausragenden Dank verdient Walter Kölch, der mir oft und uneigennützig mit unglaublich detailreichem Fachwissen und bewundernswerter Klarsicht bei der Planung von Experimenten geholfen hat und auch praktische Hilfe in Form von Reagenzien bereitgestellt hat.

Ein dickes Dankeschön an meine Familie, die konstant und interessiert dem Verlauf meiner Promotion verfolgt hat und gern noch mehr geholfen hätte, als sie bereits getan hat. Dank an Frauke für alles.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet

Hannover, den 10.11.2003

(Marc Dangers)

Lebenslauf

Name: Marc Dangers

Dienstadresse: Medizinische Hochschule Hannover
Abt. Nephrologie
Carl-Neuberg-Str.1, 30625 Hannover

email: dangers.marc@mh-hannover.de

Telephon: (0511)-532-2719

Fax: (0511)-532-2713

Privatadresse: Vordere Schöneworth 13
30179 Hannover

Telefon: 0511-3534506

Schulabschluß: Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Springe
im Sommer 1993

Beruflicher Werdegang:

1.8.1993 - 31.10.1994 Zivildienst beim Rettungsdienst des DRK, Abschluß als
Rettungshelfer/Sanitäter

1.10.1994 - 31.4.1999 Studium der Biologie an der Universität Hannover

1.5.1997 - 31.7.1997 Forschungsaufenthalt als ERASMUS-Student im Institut
für Populationsgenetik der Universität Oulu, Finnland,
Prof. Savolainen

- 1.5.1999 - 1.2.2000 Diplomarbeit im Institut für Phytopathologie der Universität Hannover, Prof. Maiss, Thema: „Molekulare Charakterisierung des beet cryptic virus aus Beta vulgaris“
Abschluß: Dipl. rer. nat. mit „Sehr gut“ bestanden
- 5.4.2000 Geburt meiner Tochter Janna
- 1.8.2000 - 31.1.2002 Promotion am Fraunhofer Institut für Toxikologie, Hannover, Abteilung Molekulare Toxikologie
- 1.2.2002 - 31.11.2003 Fortsetzung der Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abt. Nephrologie, Prof. Haller
Thema: „Charakterisierung von assoziierten Proteinen der Protein Kinase Raf-1“
- 1.12.2003 - Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Medizinische Hochschule Hannover,
Abteilung Nephrologie, AG Prof. Dumler

Wissenschaftliche Publikationen:

Shushakova, N., Eden, G., Dangers, M., Zwirner, J., Menne, J., Luft, F.C., Haller, H., Dumler, I.

The urokinase/urokinase receptor system mediates the reverse Arthus reaction in lung

Manuskript eingereicht.

Weissing, E.M., Oettrich, K., Evans, C., Genieser, H.G., Schwede, F., Dangers, M., Dammann, E., Kolb, H.J., Mischak, H., Ganser, A., Kolch, W.

Activation of protein kinase A (PKA) by 8-Cl-cAMP as a novel approach for antileukaemic therapy.

Br J Cancer. 2004 Jul 5;91(1):186-92.

Borlak, J., Dangers, M., Thum, T.

Aroclor 1254 modulates gene expression of nuclear transcription factors: implications for albumin gene transcription and protein synthesis in rat hepatocyte cultures. Toxicol Appl Pharmacol. 2002 Jun 1;181(2):79-88.

Poster:

Dangers, M., Dhillon, A., Haller, H., Dumler, I., Kölsch, W., Mischak, H.

Identification of two novel Proteins interacting with Protein Kinase Raf-1

FEBS Meeting on Signal Transduction, Juli 2003

Referent: Harald Mischak
Koreferentin: Inna Dumler
Tag der Promotion: 11.03.2004

(Rückseite Seite 1)