

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Ulf R. Rapp

KARTIERUNG KREBSRELEVANTER SIGNALWEGE: A-RAF KINASE UND
PYRUVATKINASE M2 VERBINDEN ZELLWACHSTUM UND
ZELLDIFFERENZIERUNG MIT DEM ENERGIESTOFFWECHSEL

Inaugural - Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Ulrich Frey

aus Stuttgart

Würzburg, Dezember 2001

Referent: Professor Dr. med. Ulf R. Rapp

Korreferent: Professor Dr. med. Michael Sendtner

Dekan: Professor Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2002

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS**INHALTSVERZEICHNIS** **I****ABBILDUNGSVERZEICHNIS** **V****GLOSSAR** **VII****EINLEITUNG** **1**

1.1	Signalübertragung zwischen Zellen	1
1.2	Die klassische Signaltransduktionskaskade	2
1.3	Ultrasensitivität der Signaltransduktionskaskade	5
1.4	Raf Protein Serin/Threonin Kinasen	6
1.4.1	Charakterisierung der Raf – Isoenzyme	7
1.4.2	c-Raf-1 Regulation	7
1.4.3	Eigenschaften der Raf-Isoenzyme	8
1.5	Beeinflussung des Zellmetabolismus durch Onkogene	11
1.5.1	Der Warburg Effekt	12
1.5.2	Energiegewinnung von Tumorzellen	13
1.6	Das Hefe Two-Hybrid System	13
1.7	Gegenstand der Arbeit	15

MATERIAL UND METHODEN **17**

2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	18
2.1.3	Medien	18
2.1.3.1	Bakterienmedien	18
2.1.3.2	Hefemedien	18
2.1.4	Bakterienstämme	19
2.1.5	Oligonukleotide	20
2.1.5.1	A-Raf und c-Raf-1 „kinase-tot“	20

2.1.5.2	A-Raf Mutationen im c-terminus _____	20
2.1.5.3	PKM2-Klonierungsmutationen _____	20
2.1.5.4	PKM2-Sequenzierprimer _____	20
2.1.5.5	PK-Phosphorylierungsstellen-Primer _____	21
2.1.5.6	PK M2- ADP – Bindungsstellen – Mutanten -Primer _____	21
2.1.5.7	PCR-Primer _____	21
2.1.6	Antikörper _____	21
2.1.6.1	Primäre Antikörper _____	21
2.1.6.1.1	12CA5 (Anti-HA-Ak) _____	21
2.1.6.1.2	DF4 (Anti-Tu-M2-PK-Ak) _____	22
2.1.6.2	Sekundäre Antikörper _____	22
2.1.7	Molekulargewichtsstandard _____	22
2.1.7.1	Proteinmarker SDS-7B: (Sigma) _____	22
2.1.8	Plasmide _____	22
2.1.8.1	pPC97 und pPC 86 _____	23
2.1.8.2	pUC19 _____	24
2.1.8.3	pBluescript _____	24
2.1.8.4	pGEX 2-T _____	25
2.1.8.5	pCDNA3 _____	25
2.1.8.6	pPC 86HA3 _____	26
2.2	Methoden _____	26
2.2.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> _____	26
2.2.1.1	Herstellung ultrakompetenter Bakterien _____	26
2.2.1.2	Transformation mit kompetenten <i>E. colis</i> _____	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden – DNA _____	27
2.2.2.1	Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus <i>E. coli</i> _____	27
	a) Präparativer Maßstab (Maxiprep) _____	27
	b) Analytischer Maßstab (Miniprep) _____	29
2.2.2.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA _____	29
2.2.2.3	Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel _____	30
2.2.2.4	Restriktionsverdau von DNA _____	30
2.2.2.5	Herstellung von „blunt-end“ DNA-Fragmenten _____	31
2.2.2.6	Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit CIAP _____	32
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten _____	32
2.2.2.8	Herstellung von PKM2 Deletionsmutanten _____	33
2.2.2.9	Polymerase Chain Reaction (PCR) _____	35
2.2.2.10	DNA-Aufreinigung durch Phenolisierung _____	37

2.2.2.11	Reinigung von PCR-Produkten _____	38
2.2.2.12	Radioaktives Markieren von DNA-Sonden („Labeln“) _____	38
2.2.2.13	Reinigung radioaktiver DNA-Sonden (Gelchromatographie) _____	39
2.2.2.14	DNA-Sequenzierung _____	39
2.2.2.15	Mutagenese einzelner Basen _____	41
2.2.3	Molekularbiologische Methoden - Proteine _____	43
2.2.3.1	Isolierung von Proteinextrakten aus der Hefe (pPC Vektor) _____	43
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) _____	43
2.2.3.3	Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau _____	44
2.2.3.4	Western-Blot Analyse _____	45
2.2.3.4.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran _____	45
2.2.3.4.2	Färbung der Membran mit PonceauS _____	46
2.2.3.4.3	Immundetektion von Proteinen _____	46
2.2.3.5	GST-Gen-Fusions-System _____	47
2.2.3.5.1	Amplifikation und Reinigung des GST-Fusionsproteins _____	48
2.2.3.5.2	Detektion der GST-Fusionsproteine durch Silberfärbung _____	49
2.2.3.6	Baculovirus-Expressionssystem _____	49
2.2.3.6.1	Gewinnung von Zelllysaten aus Sf9 Zellen _____	50
2.2.3.6.2	Co-Immunopräzipitations-Experimente _____	50
2.2.3.6.3	Kinase-Assays _____	51
2.2.4	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	52
2.2.4.1	Hefe-Transformationen _____	52
2.2.4.2	β -Galaktosidase-Assay (lacZ Assay) _____	54
2.2.4.3	Hefe-Kolonie-Hybridisierung ("Yeast-Colony-Hybridization") _____	56
2.2.4.4	Replica-Plating mit Hefe-Kolonien _____	58
2.2.4.5	Plasmid-Extraktion aus der Hefe _____	59
ERGEBNISSE _____		60
3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Expressionssystem _____	60
3.1.1	Konstruktion von <i>S. cerevisiae</i> -Expressions-plasmiden _____	60
3.1.1.1	Herstellung eines A-Raf K336M – pPC97 – Konstruktes _____	60
3.1.1.2	Herstellung eines c-Raf-1 K375W – pPC97 – Konstruktes _____	61
3.1.1.3	Klonierung von pPC97 c-Raf K375R _____	62
3.1.2	Two-Hybrid Test mit Raf-Mutanten _____	63
3.2	Two-Hybrid-Screen mit A-Raf als Köder-Protein _____	65
3.2.1	Hefe-Transformierung und β -Gal-Assay _____	65

3.2.2	Herstellung der DNA-Sonden _____	65
3.3	Two-Hybrid-Screen mit c-Raf als Köder-Protein _____	68
3.4	Sensitivität der direkten Two-Hybrid-Tests _____	69
3.5	Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit _____	70
3.6	Pyruvatkinase Typ M2 _____	71
3.6.1	Sequenzanalysen der gefischten PKM2 _____	72
3.6.2	Entfernung der untranslatierten Region der PKM2 _____	72
3.6.3	Kartierung der A-Raf Bindedomänen _____	73
3.6.4	Kartierung der PKM2 Bindedomänen _____	75
3.6.5	PKM2 Protein-Expression in pGex-2T System _____	76
3.6.6	Herstellung eines PKM2-pGEX-Konstruktes _____	76
3.6.7	Aufreinigung und Nachweis von GST-PKM2 _____	78
3.6.8	Messung der enzymatischen Aktivität der PKM2 _____	79
3.6.9	Co-Immunopräzipitation von Raf und PKM2 _____	79
3.6.10	Kinase Assay mit A-Raf und PKM2 _____	81
3.6.11	Mutation putativer Phosphorylierungsstellen der PKM2 _____	82
3.6.12	Grundlage von PKM2 / A-Raf Zell Transformation _____	83
3.6.12.1	Klonierung von PKM2 und PKM2 K366M in pcDNA3 _____	84

DISKUSSION **85**

4.1	Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit _____	85
4.2	Pyruvatkinase M2 _____	87
4.2.1	Auswirkungen auf die Zelltransformation _____	90
4.2.2	Beeinflussung der Energiegewinnung _____	92
4.2.3	Mögliche Therapieansätze _____	93

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aktivierung von Ras	2
Abbildung 2: Signaltransduktionskaskade	4
Abbildung 3: Unterschiedliche Kinetik verschiedener Enzyme	5
Abbildung 4: Raf Isoformen	8
Abbildung 5: Modell der Raf Aktivierung	9
Abbildung 6: Raf-Aktivität in PC12 Zellen	10
Abbildung 7: Prinzip des Two-Hybrid Systems	14
Abbildung 8: Struktur der Gal4-Fusionsvektoren pPC97 und pPC86	23
Abbildung 9: pUC19	24
Abbildung 10: Bluescript KS	24
Abbildung 11: pGEX-2T	25
Abbildung 12: pcDNA 3	25
Abbildung 13: Restriktionskarte der MCS von pPC86 und von PKM2	34
Abbildung 14: Prinzip einer PCR-Reaktion	36
Abbildung 15: Sequenzanalyse	40
Abbildung 16: Mutagenese einzelner Basenpaare	42
Abbildung 17: Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran	45
Abbildung 18: Immundetektion von Proteinen	46
Abbildung 19: Prinzip der Comimmunopräzipitation	50
Abbildung 20: Aktivierung von Reportergenen im Two-Hybrid Screen	55
Abbildung 21: Dot Blot	57
Abbildung 22: Prinzip des Replica-Platings	58
Abbildung 23: Ausschnitt aus dem A-Raf/pUC19 Konstrukt	60
Abbildung 24: A-Raf K336M/pPC 97 Plasmid	61
Abbildung 25: Restriktionskarte des <i>c-Raf</i> K375W im pUC19 Vektor	61
Abbildung 26: c-Raf K375W/pPC 97 Plasmid	62
Abbildung 27: c-Raf K375R	63
Abbildung 28: Originalfoto eines Nitrocellulosefilters	63
Abbildung 29: Restriktionsanalyse der isolierten DNA-Sonden	65
Abbildung 30: Herstellung von Gensonden	69
Abbildung 31: Gefischte PH4 α -Klone mit dem Two-Hybrid Screen	70
Abbildung 32: Vergleich des gefischten PK M2-Klons	72

Abbildung 33: Spezifität der PK Δ Sal Bindung an A-Raf	74
Abbildung 34: PK M2 (full length) in pGEX 2T	77
Abbildung 35: Silberfärbung	77
Abbildung 36: Western Blot der PK M2	78
Abbildung 37: Test von A-Raf im Zellysat mit GST-PK	79
Abbildung 38: Coimmunopräzipitation von gag A-Raf mit PK M2	80
Abbildung 39: <i>in vitro</i> Kinase Assay von A-Raf mit PK M2	81
Abbildung 40: putative Phosphorylierungsstellen der PK M2	82
Abbildung 41: Prolylhydroxylase katalysiert die Kollagensynthese	86
Abbildung 42: Endschritt der Glykolyse	87
Abbildung 43: Schema der Glycolyse	88
Abbildung 44: Aminosäurevergleich im Bereich der Kontaktstellen	89
Abbildung 45: Transformation von NIH 3T3 Zellen	91
Abbildung 46: Modell der A-Raf / PK M2 Regelkreise in Tumorzellen	93

GLOSSAR

A	Adenosin	NTP	Nukleotidtriphosphat
α	anti	OD...	optische Dichte bei ... nm
Abb.	Abbildung	ORF	Open Reading Frame
AK	Antikörper	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Ala	Alanin	PCR	Polymerase Chain Reaktion
AMP	Adenosinmonophosphat	PK	Pyruvatkinase
Amp	Ampicillin	R	Arginin
Amp ^r	Ampicillinresistenz	RNA	Ribonukleinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Rnase	Ribonuklease
AS	Aminosäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
ATP	Adenosintriphosphat	RT	Raumtemperatur
β -Gal	β -Galaktosidase	<i>s.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
bp	Basenpaare	s	Sekunde
BSA	Bovines Serum Albumin	s.	siehe
C	Cytosin	SDS	Natriumdodecylsulfat
°C	Grad Celsius	ss	einzelsträngig
cDNA	komplementäre DNA	T	Thymin
CIP	Calf Intestine Phosphatase	TAE	Tris-Acetat-EDTA
Da	Dalton	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	TLCK	Tosyllysinchlormethylketon
DEPC	Diethylpyrocarbonat	T _m	Schmelztemperatur
deion.	deionisiert	TPCK	Tosylphenylalanin- chlormethylketon
dest.	destilliert	Tris	Tetramethyl Rhodamine
DMSO	Dimethylsulfoxid	Tu	Isocyanat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	u	Tumor
dNTP's	Desoxyribonukleosid- triphosphat	ÜN	Unit
ds	doppelsträngig	V	über Nacht
DTT	Dithiothreitol	Vol.	Volt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	W	Volumen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	WT	Watt
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	X-Gal	WT
EtBr	Ethidiumbromid		5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D- Galaktosid
EtOH	Ethanol		
g	Gramm		
G	Guanosin		
h	Stunde		
HA	Hämagglutinin		
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazinethansulfonsäure		
J	Joule		
K	Lysin		
kan ^r	Kanamycinresistenz		
kb	Kilobase		
kbp	Kilobasenpaare		
kDa	Kilodalton		
l	Liter		
LiCl	Lithiumchlorid		
M	Molar		
min	Minute		
MCS	multiple cloning site		
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure		
mRNA	messenger RNA		
MW	Molekulargewicht		
Myc	Myelocytomatose		
N	Normal		

Kapitel 1

EINLEITUNG

1.1 Signalübertragung zwischen Zellen

Ein komplexer, aus zahlreichen unterschiedlichen Organen bestehender Organismus benötigt ein vielschichtiges Kommunikationssystem, damit komplizierte Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel koordiniert ablaufen können. Der menschliche Körper verfügt über verschiedene Möglichkeiten der Signalübermittlung, sei es durch direkten Zellkontakt, sog. gap junctions, oder durch Übermittlung von Signalmolekülen über größere Entfernung hinweg. Zur interzellulären Kommunikation tragen beispielsweise Ionen, Hormone, Wachstums- und Differenzierungsproteine bei¹. So kennt man beim Menschen entsprechend der Entfernung des Zielgewebes endokrin, parakrin und autokrin wirkende Mechanismen. Endokrine Signalmoleküle erreichen die Zielzellen über den Blutweg während die parakrine Wirkung sich auf die unmittelbare Umgebung der Zellen bezieht. Bei der autokrinen Signalübertragung reagieren Zellen auf Substanzen, die sie selbst sezernieren¹. Um seine Wirkung entfalten zu können muss ein Signalmolekül von einem spezifischen Rezeptorprotein gebunden werden, das sich entweder auf der Oberfläche einer Zielzelle, im Zellkern oder im Zytosol befindet. Dabei diffundieren lipidlösliche Moleküle wie zum Beispiel Steroidhormone durch die Zellmembran wohingegen hydrophile Stoffe, die die Plasmamembran nicht permeieren können, an membranständige Rezeptoren gebunden werden. Durch diese spezifische Bindung wird eine Konformationsänderung dieses Komplexes ausgelöst, welche eine Reihe von Reaktionen oder Zellaktivitäten induzieren kann. Es existieren mehrere Arten von membranständigen Rezeptoren. Im folgenden werden hier kurz die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) dargestellt werden sollen.

Als Liganden binden diese Rezeptoren lösliche sowie membrangebundene Peptid- oder Polypeptidhormone wie Insulin oder den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Durch die Bindung wird die Tyrosin-spezifische Proteinkinase-Aktivität des Rezeptors stimuliert und damit eine Kaskade von Signalen ausgelöst, die schließlich zur Änderung der physiologischen Aktivität der Zelle oder des Genexpressionsmusters führt. Dabei werden sowohl Zellproliferation und -differenzierung als auch Zellüberleben und Änderung des Zellstoffwechsels gesteuert. Ligandenvermittelte Aktivierung führt zu einer Rezeptor-

Dimerisierung, wodurch die Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste auf der cytosolischen Domäne katalysiert wird^{2,4}.

Phosphotyrosine sind u.a. Erkennungs- und Bindungsstellen für intrazelluläre Signalmoleküle, die SH2 Domänen (Src-homology domain 2) enthalten⁵⁻⁸. Dabei wird die Ligandenspezifität durch die Aminosäuresequenz in der Umgebung des Phosphotyrosins bestimmt. Signalmoleküle wie GRB2 besitzen zudem noch zwei SH3 Domänen, die an prolinreiche Abschnitte in Proteinen binden können (z.B. Sos)^{6,8}. Somit stellen SH2- und SH3-Domänen-beinhaltende Proteine Adaptoren dar, die aktivierte Wachstumsfaktorenrezeptoren mit intrazellulären Signaltransduktionswegen verbinden.

1.2 Die klassische Signaltransduktionskaskade

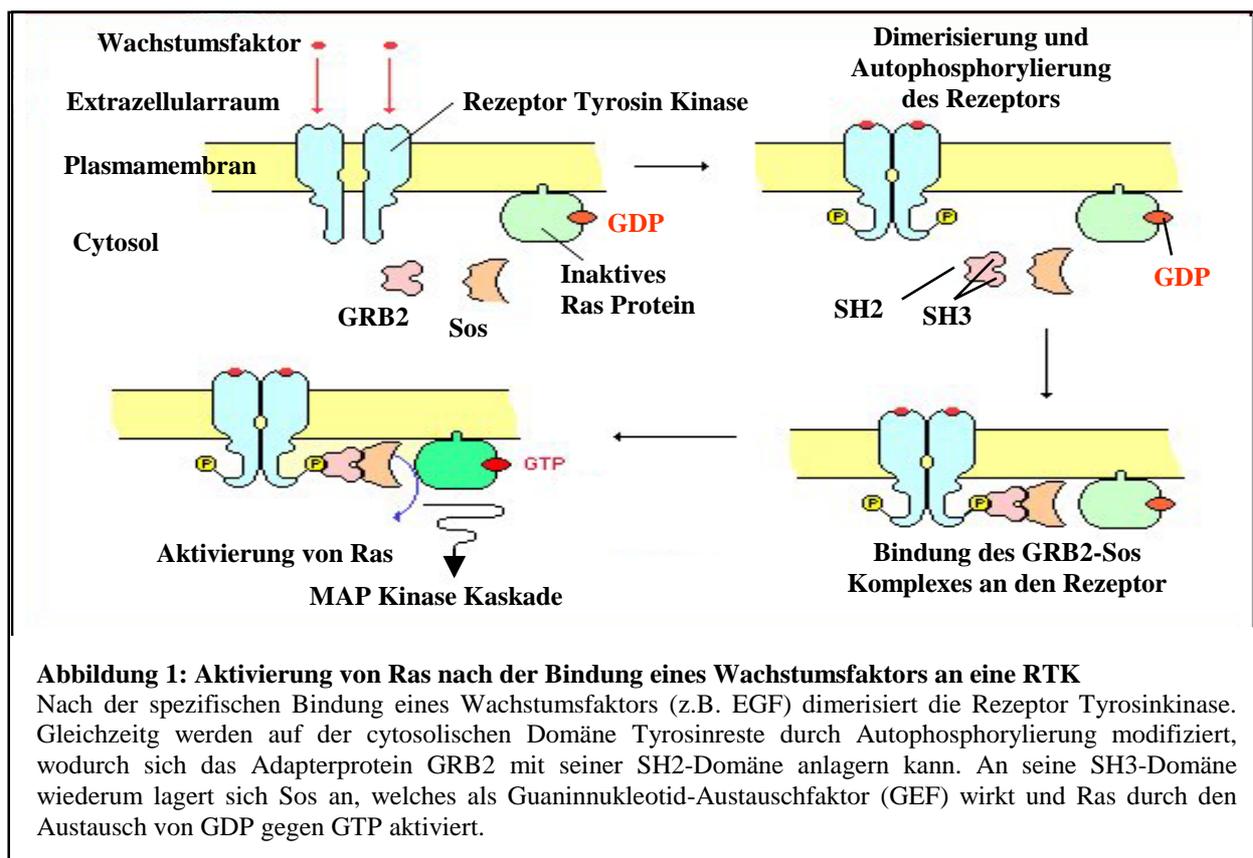


Abbildung 1: Aktivierung von Ras nach der Bindung eines Wachstumsfaktors an eine RTK

Nach der spezifischen Bindung eines Wachstumsfaktors (z.B. EGF) dimerisiert die Rezeptor Tyrosinkinase. Gleichzeitig werden auf der cytosolischen Domäne Tyrosinreste durch Autophosphorylierung modifiziert, wodurch sich das Adapterprotein GRB2 mit seiner SH2-Domäne anlagern kann. An seine SH3-Domäne wiederum lagert sich Sos an, welches als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) wirkt und Ras durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert.

Die Bindung von Sos an Ras aktiviert die klassische Signaltransduktionskaskade durch Sos-katalysierten Guaninnukleotidaustausch⁸⁻¹¹ (Abb. 1). Ras gehört zur GTPase-Superfamilie intrazellulärer Regelkreise. Dabei stellen sie molekulare „Schalter“ dar, da sie zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und aktiven GTP-gebundenen Form wechseln¹². Aktiviertes Ras

ist normalerweise in der Lage, durch intrinsische GTPase Aktivität GTP zu hydrolysieren¹³, das Fehlen dieser Fähigkeit führt zu einer dauerhaften Aktivierung von Ras und konnte in bestimmten menschlichen Tumoren nachgewiesen werden¹⁴.

Bei der Signalübertragung spielen Ras-Proteine eine zentrale Rolle. Sie übertragen Signale auf Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinasen wie Raf, die Zellwachstum und Zelldifferenzierung steuern. Bei der Aktivierung von Raf rekrutiert Ras das Enzym an die Plasmamembran¹⁵⁻²⁵. Dort wird die Aktivierung durch bisher unbekannte, membran-assoziierte Moleküle initiiert, da die Wechselwirkung mit Ras alleine nicht ausreichend für eine vollständige Raf-Aktivierung ist²⁶⁻²⁸. Nach seiner Aktivierung phosphoryliert Raf die doppelspezifische Kinase MEK (MAP Kinase/ERK aktivierende Kinase) an zwei Serinresten innerhalb der katalytischen Domäne²⁹⁻³⁴, welche selbst wiederum über Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung die Signale an die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 weiterleitet³⁵⁻³⁷. Für die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 sind im Gegensatz zu Raf und MEK eine Vielzahl von Substraten beschrieben worden. Hierzu zählen Transkriptionsfaktoren (c-Fos, c-Jun, c-Myc, Ets) sowie Serin/Threonin Kinasen (Rsk, MAPKAP Kinase 2, 3pK) Phospholipase 2 und einige andere mehr^{26,36,38-40}. Diese können als nukleäre Shuttle-Kinasen ihre Wirkung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern entfalten (Abb. 2).

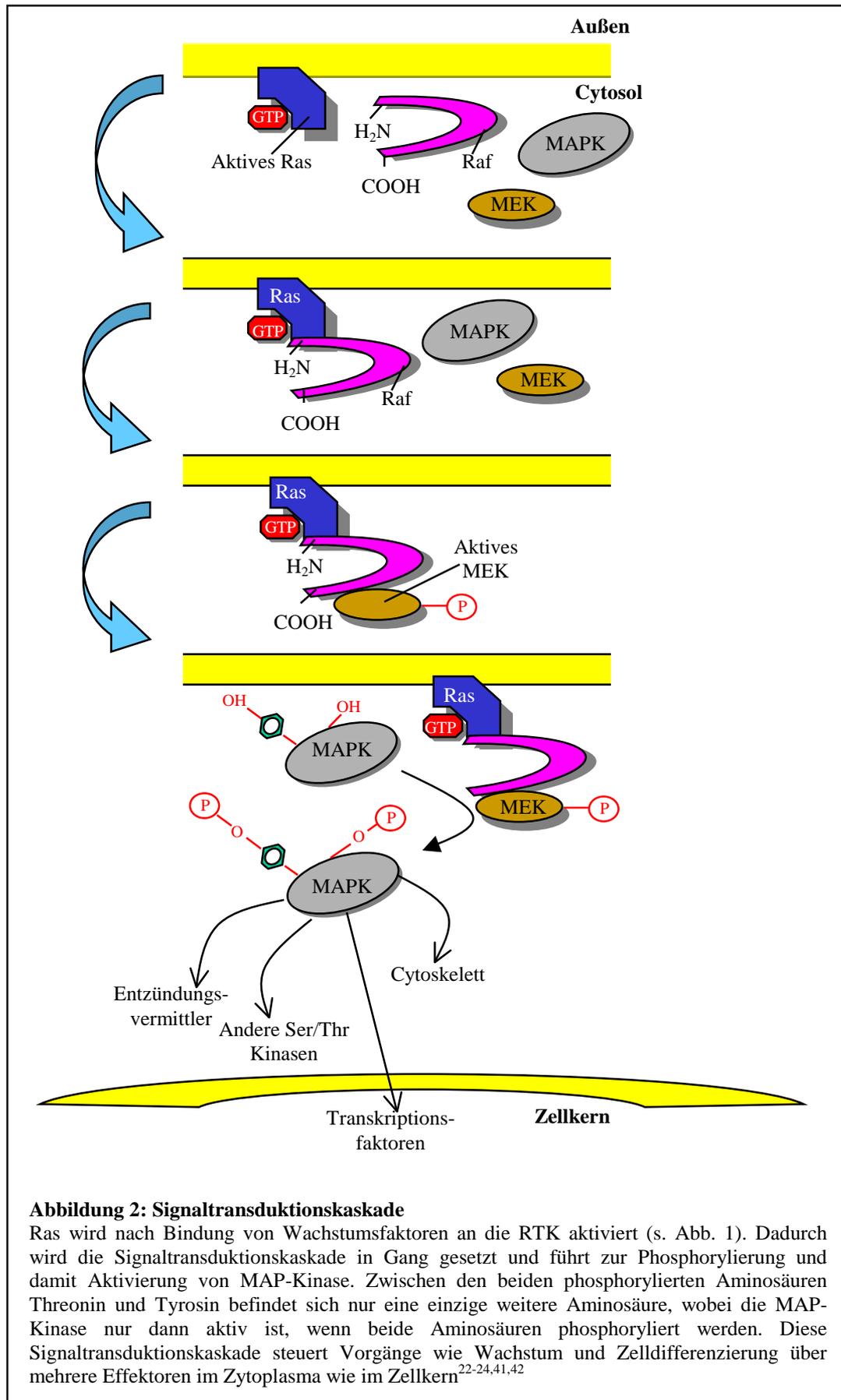


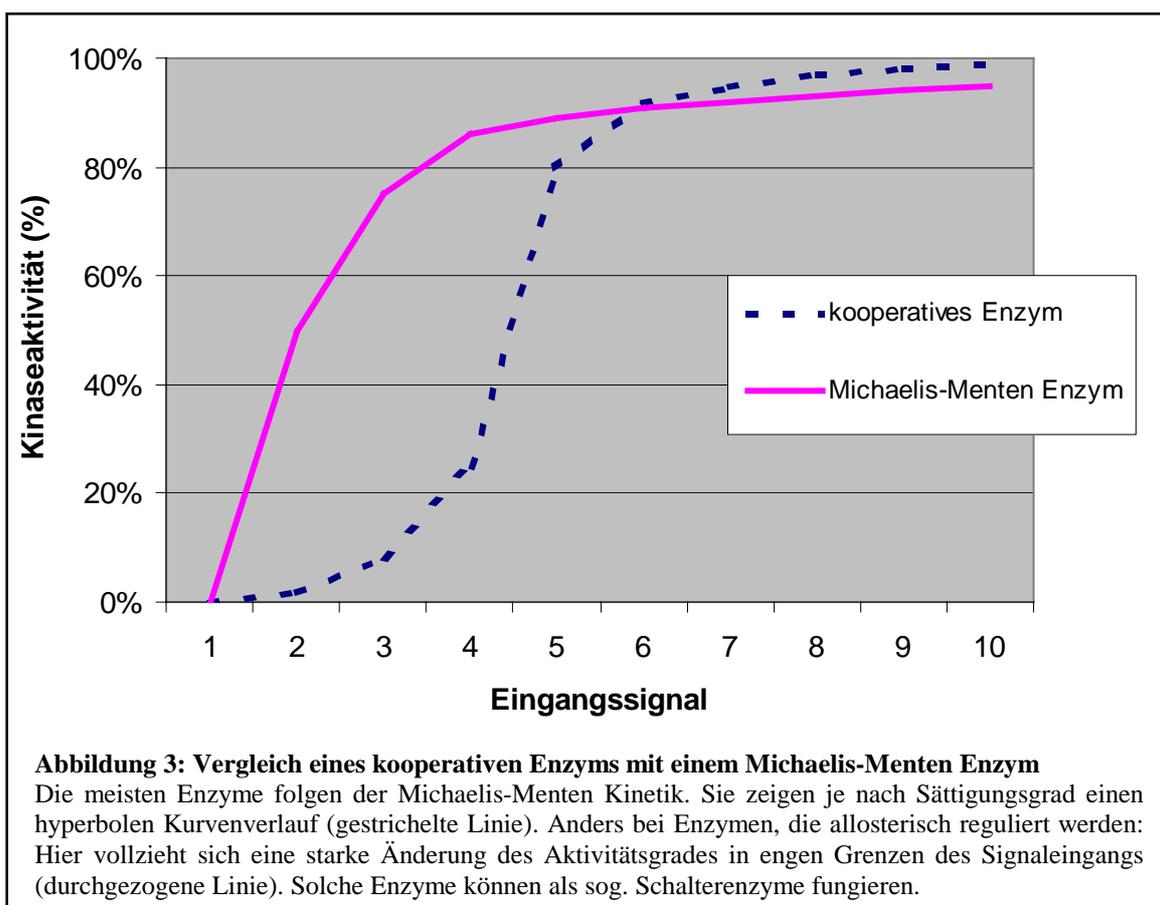
Abbildung 2: Signaltransduktionskaskade

Ras wird nach Bindung von Wachstumsfaktoren an die RTK aktiviert (s. Abb. 1). Dadurch wird die Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt und führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von MAP-Kinase. Zwischen den beiden phosphorylierten Aminosäuren Threonin und Tyrosin befindet sich nur eine einzige weitere Aminosäure, wobei die MAP-Kinase nur dann aktiv ist, wenn beide Aminosäuren phosphoryliert werden. Diese Signaltransduktionskaskade steuert Vorgänge wie Wachstum und Zelldifferenzierung über mehrere Effektoren im Zytoplasma wie im Zellkern^{22-24,41,42}

1.3 Ultrasensitivität der Signaltransduktionskaskade

Die Existenz der hochkonservierten, klassischen Signaltransduktionskaskade wirft die Frage auf, warum diese Enzymkaskade aus drei Kinasen besteht, um ein einziges Signal von der Zellmembran in das Zellinnere weiterzuleiten da andere Signalwege hierfür nur eine einzige Proteinkinase benötigen (Jak/Stat Signalweg und cAMP/Protein Kinase A-Signalweg).

Zum einen ermöglicht die Enzymkaskade eine enorme Verstärkung des Eingangssignals. So beträgt die Amplifizierung des Signals zwischen Ras und MAPK ungefähr einen Faktor 100 bis 500⁴¹⁻⁴³. Da dieser Wert im Vergleich zu anderen Signalwegen eher gering ist (Adrenalin beispielsweise führt zu einer Konzentrationssteigerung von cAMP in der Zelle um das 10⁴fache¹), ergab sich eine andere Erklärung.



Kinetische Untersuchungen der MAPK-Kaskade haben gezeigt, dass diese Kaskade nicht einer typischen Michaelis-Menten Kinetik mit einer hyperbolischen Aktivierungskurve folgt, sondern dass sie sich wie ein kooperatives Enzym analog dem Hämoglobin verhält⁴⁴. Diese Enzyme zeigen eine sigmoidale Aktivierungskurve, wobei bei schwacher Stimulation die Kurve flacher verläuft als bei Michaelis-Menten-Enzymen, die Kurve bei stärkerem Signal

jedoch überproportional steil ansteigt (Abb. 3). Aufgrund dieses Verhaltens wurde der Begriff „Ultrasensitivität“ dieser Enzyme geprägt. Bei entsprechend steilem Kurvenverlauf verhalten sie sich beinahe nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip, sie fungieren somit als Schalter-Proteine^{44,45}. Verschiedene Untersuchungen haben eine „Ultrasensitivität“ auch für die MAPK-Kaskade zeigen können^{41,42,44,46,47}. Diese kann von großem Nutzen für die biologische Funktion der Enzymkaskade sein. Geringe Stimuli werden auf diese Weise herausgefiltert und in einem kleinen Bereich der Eingangssignale die Antwort nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip angeschaltet. Vorgängen wie Proliferation und Differentiation kommt dieses System somit zugute, da fehlerhafte Eingangssignale keine Wirkung entfalten können wenn sie die Reizschwelle nicht überschreiten. Die Beeinflussung von einzelnen Komponenten der Kaskade durch weitere Regulatoren kann dieses Verhalten zusätzlich modulieren.

1.4 Raf Protein Serin/Threonin Kinasen

Der Kinase c-Raf-1 kommt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der klassischen Signaltransduktionskaskade zu⁴⁸. Sie wurde als erstes Mitglied einer Familie zytoplasmatischer Serin-Threonin-Kinasen entdeckt, die bei Säugern aus drei Isoformen besteht: c-Raf-1, B-Raf und A-Raf. Ursprünglich wurde Raf als transformierendes Onkogen in dem Maus-Retrovirus MSV 3611 isoliert (*v-raf*)⁴⁹⁻⁵¹. Retrovirale Onkogene stammen von zellulären Genen ab (*c-onc*), welche bei den verschiedenen Spezies hoch konserviert und häufig mit der Induktion von Tumoren des hämatopoetischen Systems oder mit der Induktion von Sarkomen assoziiert sind. Auch *v-Raf*, welches N-terminal verkürzt und mit Virussequenzen fusioniert ist, kann in neugeborenen Mäusen Fibrosarkome und hämatopoetische Tumore induzieren⁵². Da *v-Raf* kultivierte Zellen transformieren und Tumoren *in vivo* induzieren kann, entwickelte sich schnell ein wachsendes Interesse für dieses Enzym. Bald wurde das zelluläre Homolog c-Raf gefunden, dessen Gen auf Chromosom 3p25 liegt^{53,54}. c-Raf besitzt das Merkmal eines Proto-Onkogens, da seine unregulierte Aktivierung zu zellulärer Transformation und Tumorentstehung führen kann. Zwei Hauptmechanismen sind hierfür verantwortlich:

1. Vermehrte Expression: Kerkhoff et al. konnten zeigen, dass durch Überexpression von c-Raf-1 in transgenen Mäusen Lungentumoren induziert werden können⁵⁵⁻⁵⁷.
2. Onkogene Mutationen im *c-Raf* Gen: Bei Versuchen konnten transformierende Formen von c-Raf-1 in Fibroblasten entdeckt werden, nachdem sie mit DNA

verschiedener Tumore transfiziert wurden^{58,59,60-62}. Diese Mutationen stellen 5'-Deletionen des *raf*-Gens dar, woraus ein N-terminal verkürztes Protein resultiert.

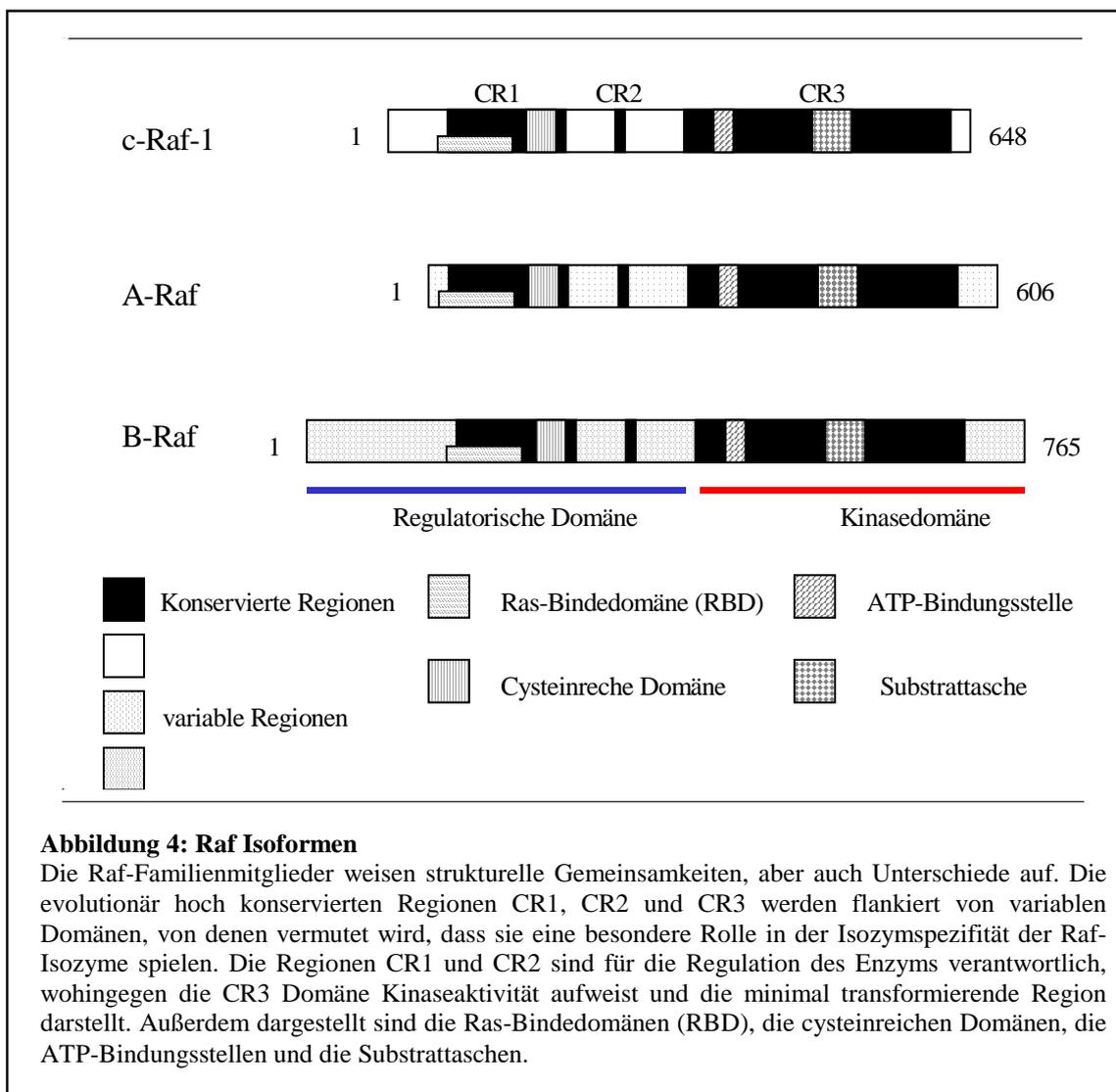
Überexpression sowie spontane Mutationen im *raf* Gen können somit wesentlich an der Entstehung diverser Tumoren beteiligt sein.

1.4.1 Charakterisierung der Raf – Isoenzyme

Bei Vertebraten existieren drei funktionelle *raf* Gene: *c-raf-1*^{63,64}, *B-Raf*^{65,66} und *A-Raf*⁶⁷, wobei die kodierenden Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind: c-Raf auf Chromosom 3p25, B-Raf auf 7p34 und A-Raf auf dem X-Chromosom Xp11.2. Die Expression des c-Raf-1-Transkripts mit einer Größe von 3,4 kb ist am stärksten in der quergestreiften Muskulatur, im Zerebellum und im fetalen Gehirn. B-Raf mit einer Größe von 2,3 kb findet sich vor allem in neuronalem Gewebe und in Testes^{68,69,70}. Das 2,6 kb A-Raf Transkript wird überwiegend in urogenitalem Gewebe exprimiert. Es ist mit 70 kDa das kleinste der drei Proteine, c-Raf-1 weist ein Molekulargewicht von 72 kDa und B-Raf von 90 kDa auf. Sie alle sind cytosolische Phosphoproteine, deren Laufverhalten auf SDS-PAGE-Gelen vom Phosphorylierungsgrad abhängig ist und deshalb variieren kann^{71,72}.

1.4.2 c-Raf-1 Regulation

Die drei Raf-Isoformen bestehen aus drei hochkonservierten Regionen, CR1, CR2 und CR3 (conserved region), die in variable Regionen eingebettet sind. Letztere weisen stark unterschiedliche Sequenzen auf, sind aber trotz allem im Vergleich zu Raf Proteinen anderer Spezies hoch konserviert. Die CR1 und CR2 Domänen repräsentieren den regulatorischen N-Terminus des Enzyms, wohingegen die CR3 Domäne die katalytische Domäne darstellt. Raf-Mutanten, die nur aus der CR3 Domäne bestehen, sind konstitutiv aktiv (Abb. 4)^{26,71}. Die CR1 und CR2 Domäne stellen die Regulationsdomänen von Raf dar. Verschiedene Aktivitätsmodulatoren können an diese Regionen binden. Die wichtigste Interaktion besteht allerdings in der Wechselwirkung von Raf mit Ras über seine Ras Bindedomäne (RBD). Die Bindung von Ras führt zu einer Membrantranslokation und Raf-Teilaktivierung^{24,25}. Die Mechanismen, die zur vollständigen Aktivierung von Raf führen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die cysteinreiche Region in CR1 ist ebenso an diesen Vorgängen beteiligt wie die zahlreichen Phosphorylierungsereignisse^{24,25,63,68,71,73-75}. Zudem wurde erst kürzlich gezeigt, dass eine Dimerisierung von Ras wesentlichen Einfluss auf die Raf Aktivierung haben kann⁷⁶. Auch 14-3-3-Proteine, die in den meisten Geweben exprimiert werden, sollen Einfluss auf

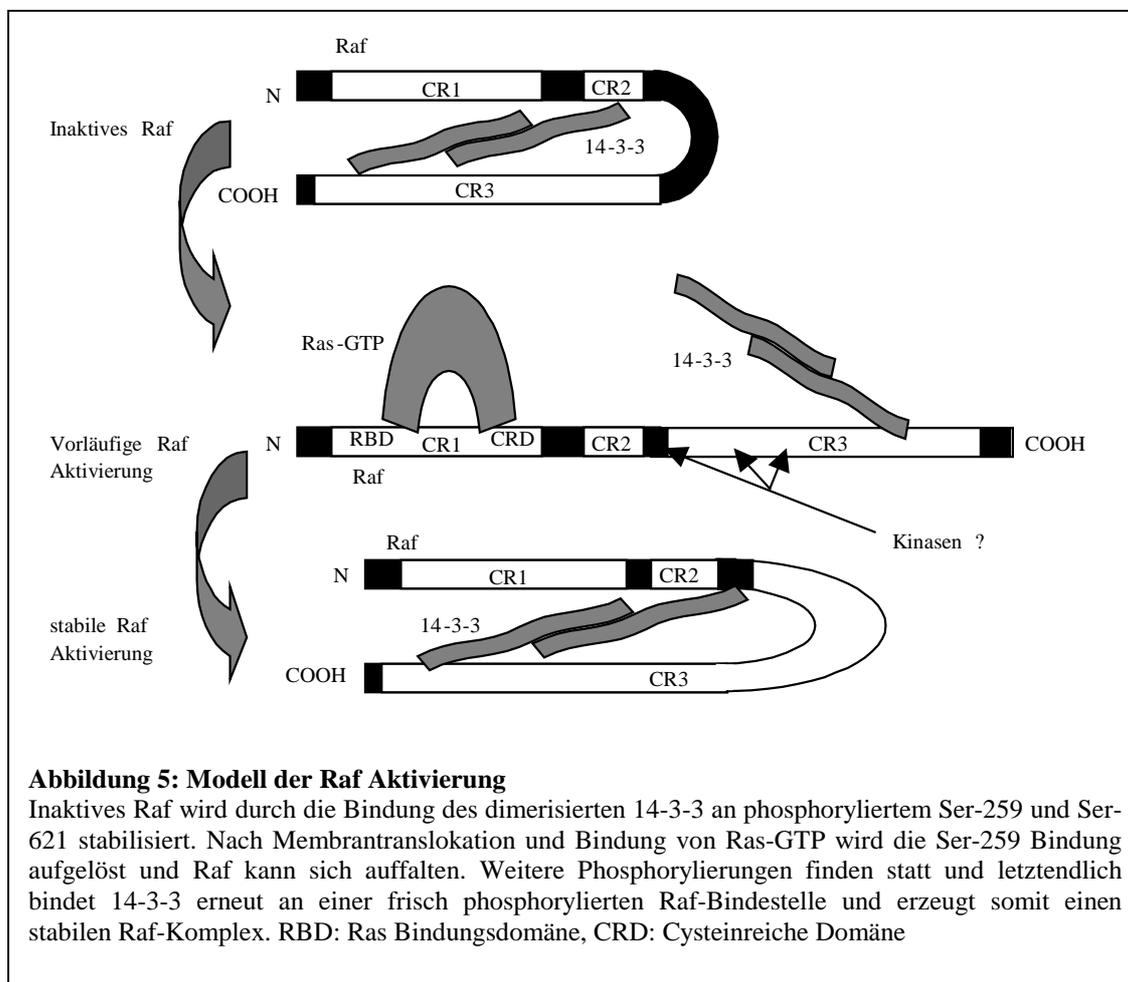


Aktivierung und Stabilität von Raf haben. Zum Mechanismus der komplexen Raf-Aktivierung hat sich zur Zeit folgendes Modell etabliert: Ein dimerisiertes 14-3-3-Protein stabilisiert inaktives Raf über Bindung an die Phosphoserine 259 und 621⁷⁷. Durch die Bindung von aktiviertem Ras an die RBD und die cysteinreiche Region von Raf werden die 14-3-3-Proteine von der Ser-259 Bindungsstelle verdrängt^{78,79}. Hierdurch kommt es zu einer Auffaltung von Raf und einer basalen Aktivierung²⁶. Andere, noch unbekannte Faktoren bewirken dann durch Phosphorylierung eine vollständige Raf-Aktivierung. Nun kann sich aktiviertes Raf von Ras lösen und an sein Substrat MEK binden. Dabei sorgt erneut gebundenes 14-3-3 Protein für die Stabilität der aktiven Raf-Konformation (Abb. 5)⁷⁷.

1.4.3 Eigenschaften der Raf-Isoenzyme

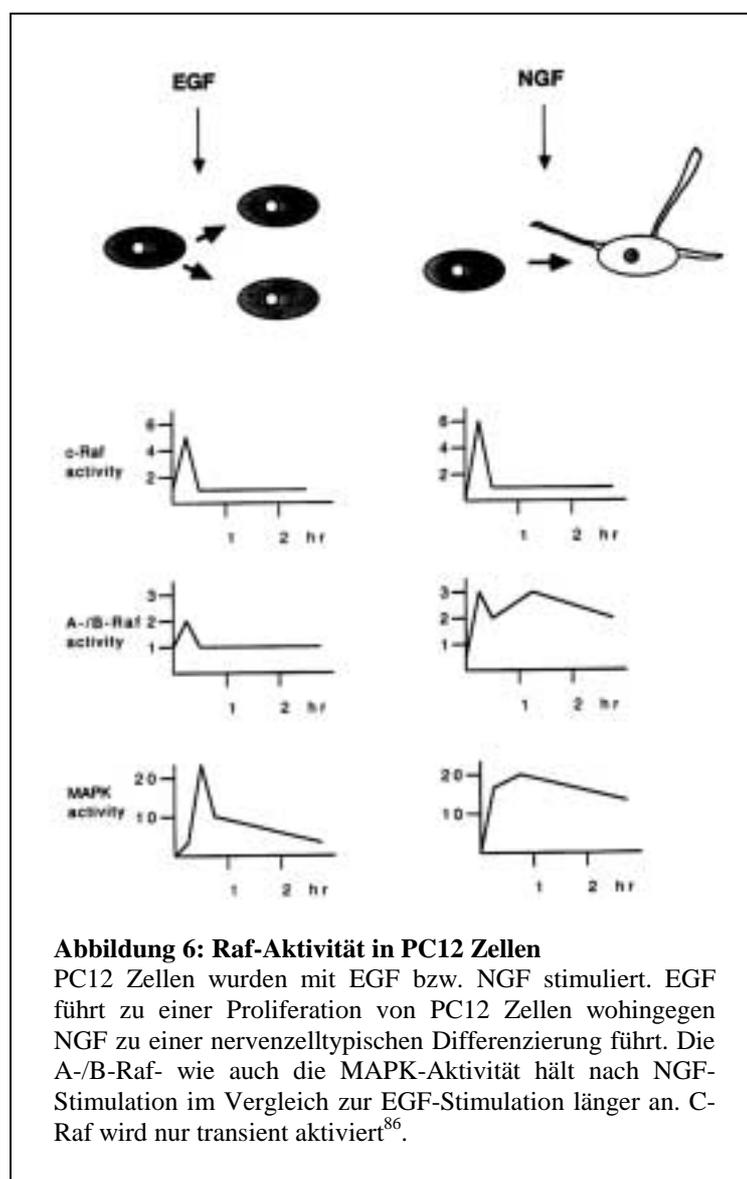
Die Existenz von drei verschiedenen Raf-Isoenzymen, die Verteilung der kodierenden Gene auf unterschiedliche Chromosomen, die evolutionär konservierten strukturellen Unterschiede und die verschiedenen Expressionsraten in unterschiedlichen Geweben stimulierten die

Suche nach spezifischen Funktionen der Isoenzyme. Unterschiedliche Mechanismen finden sich bereits bei der Raf-Aktivierung. So reguliert beispielsweise Ras die c-Raf-1 Aktivierung durch zwei verschiedene Phosphorylierungen, wobei B-Raf solche Phosphorylierungsstellen



nicht aufweist⁸⁰. Auch bei der RBD der Raf-Isoenzyme findet man strukturelle Unterschiede, die die Bindung an Ras beeinflussen. So konnten Weber *et al.* bei Experimenten mit der isolierten RBD der drei Isoenzyme zeigen, dass die Bindungsaffinität von B-Raf und c-Raf-1 zu Ras im Vergleich zu A-Raf aufgrund eines Aminosäureaustausches um ein vielfaches höher ist als bei A-Raf⁶¹. Die Aktivierung von A-Raf könnte also anstelle von Ras auch durch andere Regulatoren bewirkt werden. Auch in unterschiedlichen Geweben und in verschiedenen etablierten Zellsystemen wurden die unterschiedlichen Aktivitäten der Raf-Isoenzyme eingehend untersucht. Es zeigte sich in Rinderhirnextrakten^{82,83}, NIH 3T3 Zellen⁸⁴ und in NGF-stimulierten PC12 Zellen^{85,86}, dass MEK überwiegend von B-Raf aktiviert wird. PC12 Zellen sind zur Untersuchung von Wachstum und Differenzierung besonders geeignet, da sie unter EGF-Stimulation proliferieren und nach NGF-Behandlung nervenzelltypisch differenzieren. Da außerdem alle drei Raf-Isoformen exprimiert werden, können einerseits

die verschiedenen Phänotypen nach Stimulation und andererseits der Aktivierungsgrad der Signaltransduktionskaskade sehr gut untersucht werden.



Wixler *et al.* zeigten, dass nach NGF-Stimulation von PC12 Zellen trotz initialer Aktivierung aller drei Isoformen nur B-Raf und A-Raf kontinuierlich aktiviert werden, während c-Raf-1 nur transient aktiviert wird⁸⁶. Dieser Effekt wurde jedoch nicht nach EGF-Stimulation beobachtet. Während Ras für die initiale Aktivierung von Raf verantwortlich ist fördert möglicherweise ein anderes kleines G-Protein, Rap1, die kontinuierliche B-Raf Aktivität⁸⁷. Die Expression von onkogenen und somit ausdauernd aktivierten Versionen der Raf-Isoformen führt zu Differenzierung von PC12 Zellen (Abb 6)⁸⁶.

Ein aufwendiges aber äußerst instruktives Verfahren zur Charakterisierung essentieller Proteine und deren Bedeutung für den Organismus stellen sog. „Knock-Out-Maus-Modelle“ dar. Hier können Gene, die für unterschiedliche Proteine kodieren, ausgeschaltet und der Effekt auf den Phänotyp untersucht werden. Dabei zeigen B-Raf und A-Raf knock-out Mäuse essentielle Unterschiede:

B-Raf knock-out Mäuse sterben während der frühen Embryonalentwicklung an starken Blutungen in die Körperhöhlen aufgrund massiver Apoptose endothelialer Zellen. Zudem zeigen sie subtile anatomische Abnormalitäten in neuronalem Gewebe. Dieser Phänotyp weist auf eine regulatorische Funktion von B-Raf bei der embryonalen Vaskulogenese und der Suppression des programmierten Zelltodes hin⁸⁸.

Auf der anderen Seite wird A-Raf in ventrikulären Myocyten in Antwort auf wachstumsfördernde Stimuli differentiell reguliert⁸⁹. Bei Mäusen führt gezieltes Zerstören des A-Raf Gens zu neurologischen und intestinalen Abnormalitäten. Die Tiere versterben an extensiver Darmaufblähung zwischen Tag 7 und Tag 21 *post partum*⁹⁰.

Die Entdeckung von Raf-Isoenzym-spezifischen Interaktionspartnern war ein entscheidender Schritt zur Charakterisierung von unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Isoformen. So konnte PA28 α , eine von zwei Untereinheiten der 11S Regulatoreinheit von Proteosomen als B-Raf Bindungspartner in einem Two-Hybrid-Screen einer PC12 Bibliothek identifiziert werden⁹¹. Diese Interaktion war spezifisch, da keine Interaktion zwischen PA28 α und A- oder c-Raf-1 detektiert werden konnte⁹¹.

Als weitere spezifische Wechselwirkung konnte die Interaktion zwischen A-Raf und CK2 β , der Regulator-Untereinheit der Protein Kinase CK2 gezeigt werden^{92,93}, wobei diese Bindung zu einer Aktivierung von A-Raf führte, B-Raf und c-Raf-1 jedoch nicht von CK2 β aktiviert werden konnten⁹². Obwohl die physiologische Relevanz dieser Protein-Protein-Interaktionen bis jetzt noch unklar ist, belegen die Ergebnisse jedoch eindeutig, dass Isoenzym-spezifische Interaktionspartner existieren und somit die Signaltransduktion unterschiedlich beeinflussen können.

1.5 Beeinflussung des Zellmetabolismus durch Onkogene

In den vorausgehenden Abschnitten wurde beschrieben, welche Funktionen Onkogene im menschlichen Organismus ausüben und wie aufgrund von Mutationen in diesen Genen

Tumoren induziert werden können. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der zelluläre Energiestoffwechsel von Onkogenen beeinflusst wird, da die Energiegewinnung von zentraler Bedeutung für die Proliferation von Tumorzellen ist. Denkbar ist also ein Zusammenhang zwischen Karzinogenese durch Onkogene bei gleichzeitiger Veränderung des Energiestoffwechsels.

1.5.1 Der Warburg Effekt

Otto Warburg konnte vor sieben Jahrzehnten eine unterschiedliche Energiegewinnung von „normalen Zellen“ und Tumorzellen zeigen⁹⁴. In nicht transformierten Zellen wird Glukose über die Glykolyse bei hohem Sauerstoffangebot aerob zu Pyruvat abgebaut und im Zitratzyklus weiter verstoffwechselt⁹⁵. Pro mol Glukose werden hierbei 38 mol ATP als energiereiche Verbindungen generiert. Unter sauerstoffarmen Bedingungen wird Pyruvat in der anaeroben Glykolyse weiter zu Laktat verstoffwechselt. Dieser Stoffwechselweg ist deutlich energieärmer, er erbringt pro mol Glukose nur 2 mol ATP⁹⁵.

Warburg beobachtete, dass in Tumorzellen selbst unter aeroben Bedingungen Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse nicht vorwiegend zur Energiegewinnung über den Citratzyklus eingesetzt wurde sondern zur Laktatbildung z.B. über den Weg der Laktatdehydrogenase (LDH-A) verstoffwechselt wurde⁹⁶. Er erklärte dies als ein Resultat der übermäßig gesteigerten Glykolyserate und der erhöhten Glukoseaufnahme in die Zelle. Dieses Phänomen wird nach seinem Entdecker als „Warburg Effekt“ bezeichnet^{94,97-100}. Zwar konnten viele Studien seine Hypothese, ein Defekt in der mitochondrialen Atmung sei für diesen Effekt verantwortlich, nicht stützen, die ursprüngliche Beobachtung wurde jedoch oftmals bestätigt¹⁰¹. Kürzlich konnten Shim *et al.* zeigen, dass der onkogene Transkriptionsfaktor c-myc an das Gen bindet, das für die Expression von LDH-A verantwortlich ist und somit die LDH-A Expression und nachfolgend die Laktat-Produktion steigern kann¹⁰². c-myc, dessen unregulierte Expression in verschiedenen menschlichen Tumoren gefunden werden kann (z.B. Burkitt Lymphom)¹⁰³⁻¹⁰⁵, trägt zur Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose als Transkriptionsfaktor bei^{106,107}. Shim *et al.* konnten damit belegen, dass Interaktionen zwischen Tumor-Metabolismus und onkogener Transformation der Zelle tatsächlich existieren¹⁰².

1.5.2 Energiegewinnung von Tumorzellen

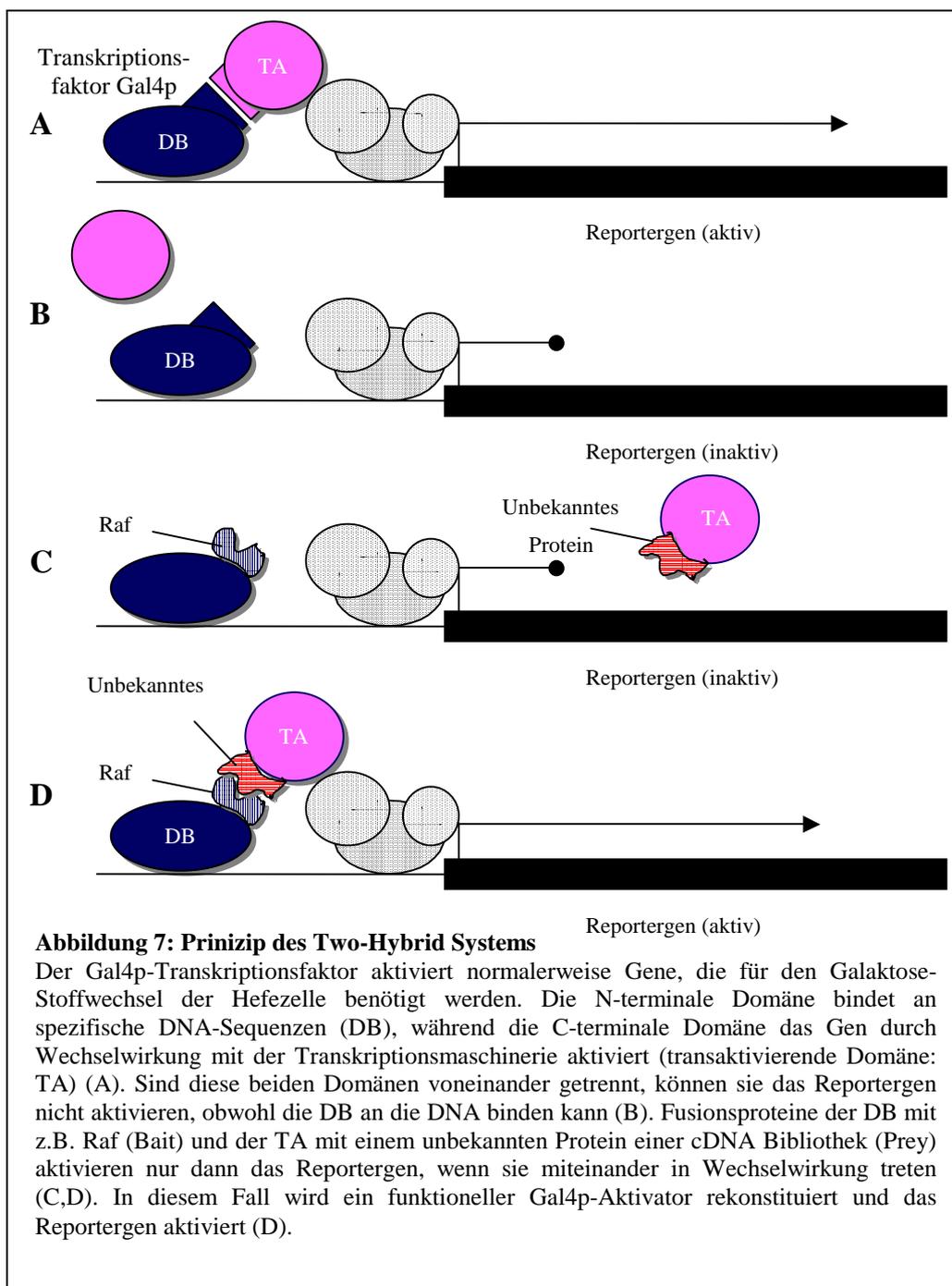
Tumorzellen proliferieren schneller als Endothelzellen, so dass die Blutversorgung über neugebildete Gefäße für die Versorgung des Tumors limitierend sein kann. Ein wichtiger Schritt für sein Überleben ist daher die Adaption des Tumors an ein hypoxisches Milieu und die anaerobe Nutzung der Glukose.

Sauerstoffreiche Umgebung führt bei Tumorzellen über den oben erwähnten Warburg-Effekt zu einer Laktatproduktion aus Glucose und zur Akkumulation von Phosphometaboliten des Glukoseabbaus^{102,108}. Diese Phosphometaboliten werden weniger zur Energiegewinnung als zur Bereitstellung von Ausgangsstoffen für die Zellbausteinsynthese benötigt, da Tumorzellen unter sauerstoffreichen Bedingungen rasch proliferieren. Die Energiegewinnung läuft dabei zum großen Teil über die Verstoffwechslung der Aminosäure Glutamin zu Laktat ab¹⁰⁹⁻¹¹¹. Bei Hypoxie, die normalerweise im Innern einer Tumorzellmasse zu finden ist, wird dieser Weg der Energiegewinnung jedoch abgeschaltet. Der gesamte Energiebedarf der Zelle wird über die Glykolyse gedeckt und somit das Überleben der Tumorzelle auch bei geringer Sauerstoffversorgung gewährleistet¹⁰⁹. Auch die Steigerung der Aktivität des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors (HIF-1), die durch Hypoxie aber auch durch Onkogene wie v-src und H-Ras getriggert wird, trägt zum Überleben der Tumorzelle bei. Es werden vermehrt Proteine exprimiert, welche das Überleben der Krebszelle unter hypoxischen Bedingungen sichern sollen. So werden einerseits vermehrt glykolytische Enzyme, aber auch der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF exprimiert, der für die Angiogenese und damit für das Einsprossen neuer Blutgefäße wichtig ist^{112-114,115,116}.

1.6 Das Hefe Two-Hybrid System

Das Two-Hybrid System ist ein genetischer Screen zur Auffindung und Charakterisierung von Protein-Protein Wechselwirkungen. Es wurde zuerst von Fields und Song beschrieben¹¹⁷. Ihm liegt die Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors zugrunde, der die Expression eines Reporter-Gens und zusätzlich die Expression eines selektierbaren Marker-Gens in Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aktiviert (Abb. 7). Dieses System ist hochsensitiv. So wurde beispielsweise die Interaktion von Ras mit c-Raf-1 durch das Two-Hybrid-System entdeckt, obwohl diese Interaktion in Koimmunopräzipitations-Experimenten vorher nicht beobachtet werden konnte²³. Außerdem stellt das Two-Hybrid System ein *in vivo* Testsystem dar, mit dem ohne großen Aufwand die cDNA's der untersuchten Proteine

isoliert werden können. Ferner kann auch die Stärke der Interaktion über die Aktivität des Reporter-Gens quantifiziert werden¹¹⁸. Bei der Untersuchung einer cDNA-Bibliothek mittels des Two-Hybrid Systems müssen allerdings auch einige Nachteile in Kauf genommen werden:



1. Die Spezifität des Systems ist bei der Untersuchung einer cDNA-Bibliothek niedriger als bei direkten Interaktionstests, da im Gegensatz zu direkten Interaktionstests in

einer cDNA-Bibliothek willkürliche Bruchstücke von Genen translatiert werden. Die Spezifität kann allerdings durch Selektion der positiven Klone nach Proteinen, deren Aminoterminus vollständig repräsentiert wird, erhöht werden.

2. Proteine können in Wechselwirkung treten, die unter physiologischen Bedingungen in unterschiedlichen Zellkompartimenten oder in verschiedenen Zellzyklusphasen exprimiert werden. Dies bedeutet, dass nachgewiesene Interaktionen nicht notwendigerweise in der intakten Zelle stattfinden.
3. Hefezellen führen einige posttranslationelle Proteinmodifikationen durch. Diese Modifikationen können zu einem veränderten Bindungsverhalten der Proteine führen¹¹⁹.

Dennoch ist das Two-Hybrid System, von dem heute verschiedene Varianten bekannt sind, ein hervorragendes Instrument mit drei Hauptanwendungsgebieten^{117,120-122}:

1. Test bekannter Proteine auf Wechselwirkung
2. Definition von Domänen oder Aminosäuren, welche die Interaktionsdomäne repräsentieren
3. Screenen von Bibliotheken auf der Suche nach neuen Proteinen, die bekannte Targetproteine binden können^{119,123}.

1.7 Gegenstand der Arbeit

Entstehungsmechanismen von Tumoren werden seit Jahrzehnten intensiv erforscht. Bei Untersuchungen auf zellulärer Ebene entdeckte man transformierende Onkogene, die maßgeblich an der Zelltransformation beteiligt sind. Heute nimmt man an, dass nicht die Mutation eines einzelnen Proto-Onkogens sondern die schrittweise Mutation mehrerer dieser Gene und die Verknüpfung der verschiedenen Signalwege für die Entstehung von Tumoren verantwortlich ist¹²⁴. Neuere Untersuchungen zum veränderten Intermediärstoffwechsel einer Tumorzelle im dreidimensionalen Tumorzellverbund zeigten, dass klassische Signaltransduktion und Energiestoffwechsel keine voneinander losgelösten Signalwege darstellen, sondern über vielfältige Mechanismen miteinander verknüpft sind¹²⁵. Dennoch konnte eine direkte Regulation des Intermediärstoffwechsels durch Wachstumsfaktor-gesteuerte Signaltransduktion bisher nicht gezeigt werden^{102,126-129}. Vor dem Hintergrund der

o.g. Erkenntnisse und der Vorstellung, dass mutiertes Raf in seiner ATP-Bindungsstelle möglicherweise einer länger anhaltende Bindung zu seinem Interaktionspartner hat, war es das Ziel, zunächst Raf-Mutanten herzustellen, die Mutationen in ihrer ATP Bindungsstelle aufzeigen. Kloniert in geeignete Two-Hybrid-Vektoren konnten sie mit bekannten Raf-Interaktionspartnern auf eine mögliche stärkere Wechselwirkung im Two-Hybrid-System getestet werden. Zum nachfolgenden Two-Hybrid-Screen einer PC12 cDNA-Bibliothek sollten schließlich entweder die Wildtypen oder die Mutanten von Raf eingesetzt werden. Besonderes Interesse galt hierbei der Nachweis einer direkten Verbindung zwischen Raf als Mitglied des klassischen Signaltransduktionsweges und einem Protein des Energiestoffwechsels. Die cDNA-Bibliothek aus PC12 Zellen bietet sich für diese Untersuchungen aus mehreren Gründen an:

1. Alle der Raf-Isoformen werden exprimiert
2. Es handelt sich um eine Tumorzelllinie
3. PC12 Zellen werden abhängig von Wachstumsfaktoren differentiell reguliert

Raf-Kinase wird als Knotenpunkt der Signaltransduktion angesehen. Seine komplexe Aktivierung, drei unterschiedliche Isoformen und die nachgewiesenen Interaktionen mit zahlreichen cytosolischen Proteinen machen dieses Enzym zu einem interessanten und aussichtsreichen „Köderprotein“ zum Entdecken neuer Interaktionspartner.

Zusammenfassend lässt sich das Ziel der Arbeit auf 3 Teile subsumieren:

1. Klonierung von Two-Hybrid-Konstrukten mit Raf-Mutanten einschließlich Two-Hybrid-Tests mit bekannten Raf-Interaktionspartnern
2. Two-Hybrid Screen mit A-Raf und c-Raf-1 als Köderproteine
3. Charakterisierung der „gefischten“ Proteine

Kapitel 2

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Analysenwaage Sartorius
- Autoklav Webeco
- Brutschränke Memmert
- Exponierkassetten REGO
- Feinwaage Mettler
- Filme Amersham (ECL bzw. Hyperfilm-MP)
- Filmentwickler Kodak
- Grobwaage Sartorius
- Heizblöcke Grant Instruments; E.G.O.
- Horizontalrotor Heidolph Reax2
- Hybridisierungsöfen HB-1D Techne
- Kühlzentrifuge Beckmann J5-HS
- Magnetrüher Janke und Kunkel
- Mikroskop Zeiss
- Mikrowelle CLAtronic
- Netzgeräte Biorad; Pharmacia
- Thermo-Cycler Perkin Elmer
- pH-Meter WTW
- Phosphor Imager Fuji
- Photometer Pharmacia; Biotech Novaspec II
- Pipetten Roth P10, P50, P200, P1000
- Schüttelwasserbad New Brunswick Scientific
- Sterilbank Heraeus
- Tischfuge Qualitron
- UV-Crosslinker Hoefer
- UV-Fotoanlage Herolab
- Vortex Gerät Scientific Industry
- Wasserbad MGW Lauda
- Western-Blot-Kammern Hoefer
- Zählkammer Neubauer (improved)
- Zentrifugen Megafuge 1.0R; Biofuge 13 bzw. 15 (alle von Heraeus)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- **Chemikalien**

Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Noras, Serva und Sigma bezogen.

- **Enzyme**

Die verwendeten Enzyme stammen von den Firmen Amersham, Boehringer, Genecraft, New England Biolabs und MBI-Fermentas.

2.1.3 Medien

Falls nicht anders angegeben, beträgt das Endvolumen jeweils 1 Liter. Die Dampfsterilisation erfolgt für 20 min bei 120°C und 1,4 bar im Autoklaven. Die Sterilfiltration wird mit einem 0,22 µm Filter durchgeführt.

2.1.3.1 Bakterienmedien

2x TY Medium

Trypton:	16 g
Hefeextrakt:	10 g
1M NaCl:	5 g
mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen	
→ pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen	
→ autoklavieren	

Ampicillin Stocklösung

100 mg Ampicillin auf 1 ml mit bidest. H₂O auffüllen und lösen, steril filtrieren und bei 20°C aufbewahren

2.1.3.2 Hefemedien

20% Glucose Lösung: (1000 ml)

200g D(+) Glucose auf 1000 ml mit bidest. H₂O auffüllen und lösen → autoklavieren

YEPD Platten/Medium

Hefeextrakt:	11 g
Bacto Pepton:	22 g

Adenin: 55 mg
 (Agar: 22 g)
 → mit bidest. H₂O auf 900 ml auffüllen
 → autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen
 → 100 ml 20% Glucose Lösung hinzufügen

Aminosäuren „drop out“ Lösung: (jeweils die gewünschte(n) AS weglassen)

Arginin: 2 g
 Histidin: 1 g
 Isoleucin: 6 g
 Leucin: 6 g
 Lysin: 4 g
 Methionin: 1 g
 Phenylalanin: 6 g
 Threonin: 5 g
 Tryptophan: 4 g
 → in bidest. H₂O lösen, steril filtrieren und bei 4°C aufbewahren

-Leu - Platten

Difco Hefe Stickstoffbasen ohne Aminosäuren: 8 g
 Agar: 22 g
 Tyrosin: 55 mg
 Uracil: 55 mg
 Adenin: 55 mg
 → autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen
 → 100 ml 20% Glucoselsg.
 → 10 ml „drop out“ Lösung ohne die AS Leucin

-Trp - Platten

Difco Hefe Stickstoffbasen ohne Aminosäuren: 8 g
 Agar: 22 g
 Tyrosin: 55 mg
 Uracil: 55 mg
 Adenin: 55 mg
 → autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen
 → 100 ml 20% Glucoselsg.
 → 10 ml „drop out“ Lösung ohne die AS Tryptophan

2.1.4 Bakterienstämme

E. coli DH5 α : **supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1**

Herkunft: Bethesda Res. Lab. (BRL)

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 A-Raf und c-Raf-1 „kinase-tot“

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
AR1	GAT GTG GCC GTG AGG GTG CTC AAG GTG TCC CAG	33
ARa2	CTG GGA CAC CTT GAG CAC CCT CAC GGC CAC ATC	33
CR9	GGA GAT GTT GCA GTA AGG ATC CTA AAG GTT GTC	33
CRa11	GACAACCTTTAGGATCCTTACTGCAACA TCTCC	33

2.1.5.2 A-Raf Mutationen im c-terminus

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
ARafRPS	G CCT GCC TGC CTA CTC AGC AGG CCT CGC CTT GTG CC	36
ARafRPAs	GG CAC AAG GCG AGG CCT GCT GAG TAG GCA GGC AGG C	36

2.1.5.3 PKM2-Klonierungsmutationen

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
PK-M2-Sal-S	CGC CCG AGG ATC TCG TCG ACC ATG CCC AAG CCA GAC AGC G	40
PK-M2-Sal-As	C GCT GTC TGG CTT GGG CAT GGT CGA CGA GAT CCT CGG GCG	40
PK-pGEX-Bam-S	CGC CCG AGG ACG GGA TCC CGC ATG CCC AAG CCA GAC AGC G	41
PK-pGEX-Bam-As	C GCT GTC TGG CTT GGG CAT GCG GGA TCC CGT CCT CGG GCG	41

2.1.5.4 PKM2-Sequenzierprimer

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Bindungsstelle PK (RATPKMPS)	Länge (-mer)
PKSeqSense	GGG ACT GCC TTC ATT CAG ACC C	126-147	22
PKSeqAS	CCA CGG TAC AGA TGG GCC TGG CG	1481-1504	23

2.1.5.5 PK-Phosphorylierungsstellen-Primer

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
PKM2SRS	CGC CTG GCG CCC ATT TCG CGA GAC CCC ACA GAA GCT GC	38
PKM2SRAs	GC AGC TTC TGT GGG GTC TCG CGA AAT GGG CGC CAG GCG	36
PKM2STS	CGC CTG GCG CCC ATT AGT ACT GAC CCC ACA GAA GCT GC	38
PKM2STAs	GC AGC TTC TGT GGG GTC AGT ACT AAT GGG CGC CAG GCG	36

2.1.5.6 PK M2- ADP – Bindungsstellen – Mutanten -Primer

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'-Richtung	Bindungsstelle PK (RATPKMPS)	Länge (-mer)
PK-K366M-S	CTG TCC GGA GAA ACA GCC ATG GGG GAC TAC CCT CTG	???	36
PK-K366M-As	CAG AGG GTA GTC CCC CAT GGC TGT TTC TCC GGA CAG	?	36

2.1.5.7 PCR-Primer

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'-Richtung	Bindungsstelle PK (RATPKMPS)	Länge (-mer)
PK-pGEX-S	CGC ACG GGA TCC GTG ATT GCC CGA GAG GCA GAG C	1126-1159	34
PK-pGEX-As	CC AGG AAT TCC AGA CTT GTT GAG CAC GAT AAT GG	1280-1316	34
PKPC12sense	GCC CGG TAC CGC CCA AGG GCT C	1424-1446	22
PKPC12AS	CCA GGG CTG GGA ATT CTC TGG	1963-1974	21

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

2.1.6.1.1 12CA5 (Anti-HA-Ak)

Das HA-Epitop (YPYDVPDYA; AS 98 - 106) stammt aus dem Hämagglutininprotein HA1, das als Oberflächenglykoprotein für die Infektion des menschlichen Influenzavirus benötigt wird. Es wird durch den monoklonalen anti-HA (Klon 12CA5) AK der Maus erkannt¹³⁰.
Herkunft: MSZ

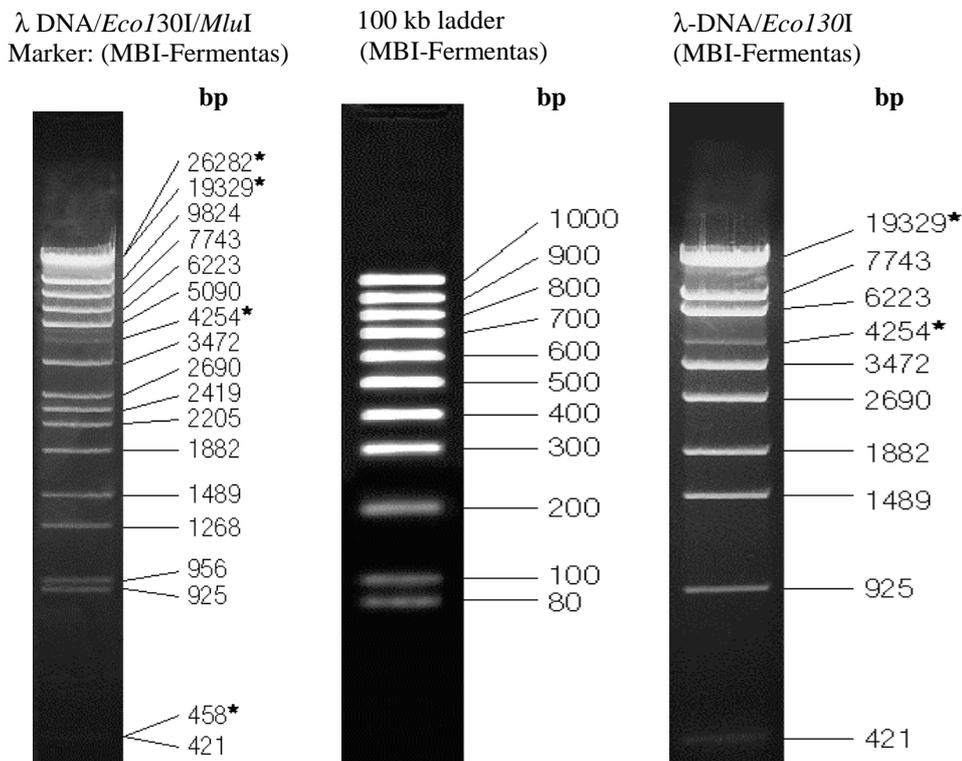
2.1.6.1.2 DF4 (Anti-Tu-M2-PK-Ak)

Monoklonaler Maus-Anti-human M2-PK Antikörper der Hybridom-Zelllinie HRA 10 FD 4 B7 AG von ScheboTech, Wettenberg¹³¹

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

- Anti-Maus IgG, F(ab')₂-Meerrettichperoxidase
 - Anti-Kaninchen IgG, F(ab')₂-Meerrettichperoxidase
- Herkunft: Amersham

2.1.7 Molekulargewichtsstandard



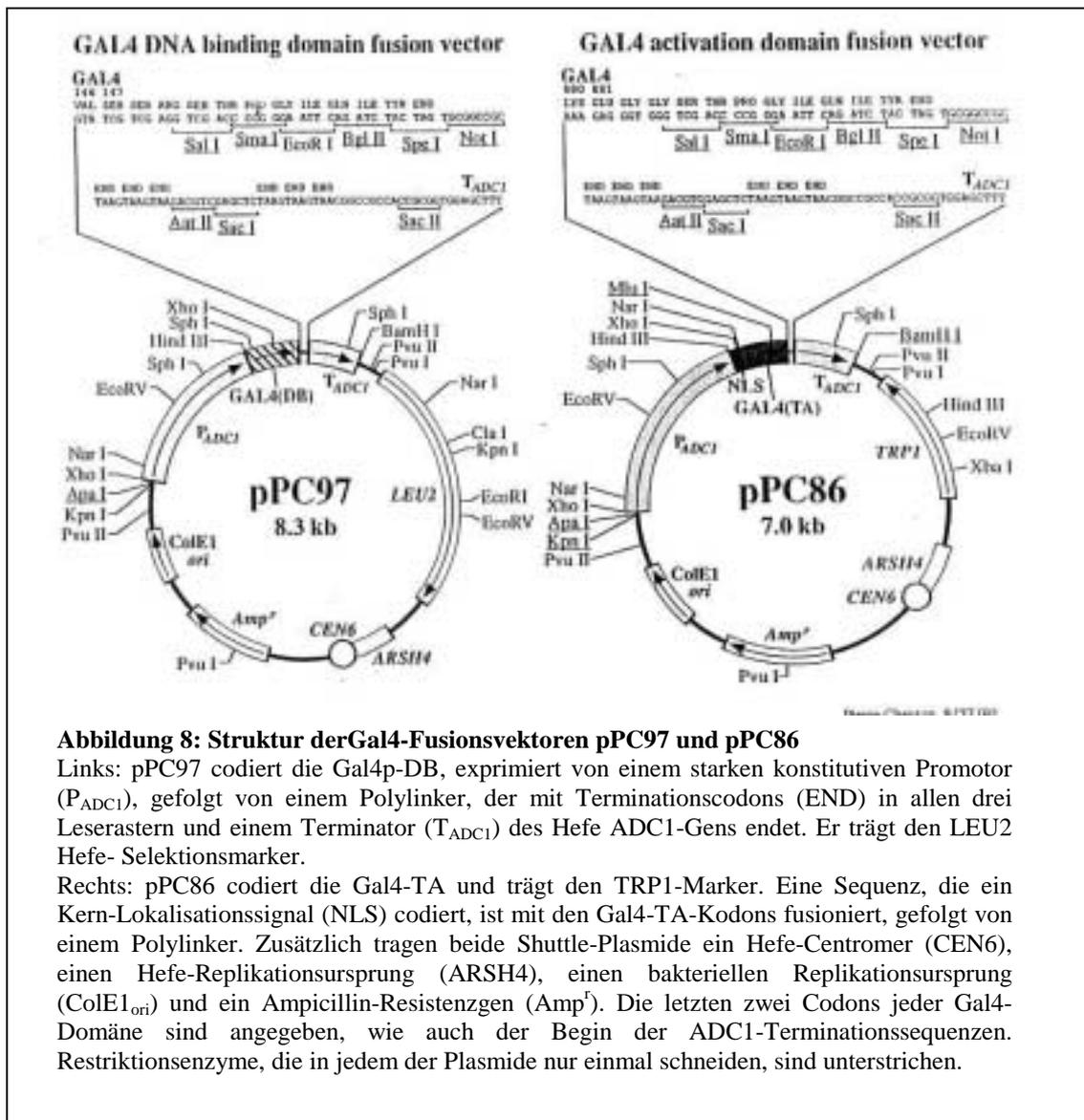
2.1.7.1 Proteinmarker SDS-7B: (Sigma)

Bande	[kDa]
1	205
2	112
3	87
4	69
5	56
6	38
7	33

2.1.8 Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Doktorarbeit verwendet:

2.1.8.1 pPC97 und pPC 86



Für die Two-Hybrid-Experimente wurden ausnahmslos die Vektoren pPC97 (P. Nathans 1992, personal communications) und pPC86¹³² verwendet, deren Struktur schematisch in Abb. 8 dargestellt ist. Diese Vektoren erlauben die Expression eines Fremdgens, welches an Teile des *GAL4*-Gens fusioniert ist, unter der Kontrolle eines starken *ADC1*-Promoters in Hefe-Zellen.

2.1.8.2 pUC19

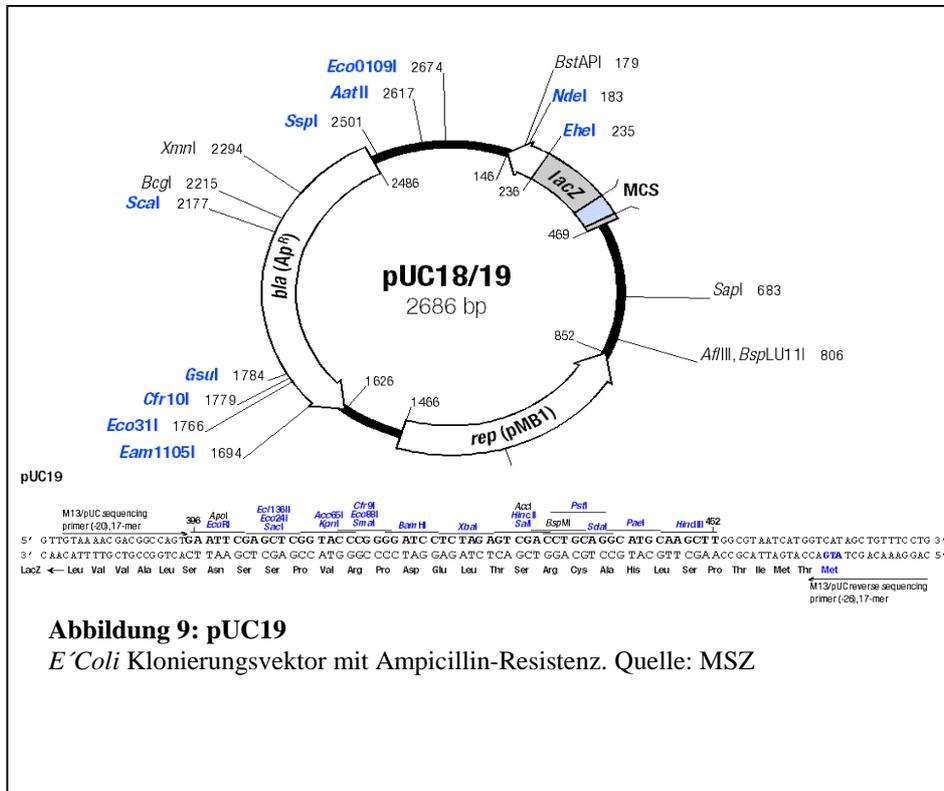


Abbildung 9: pUC19
E. Coli Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz. Quelle: MSZ

2.1.8.3 pBluescript

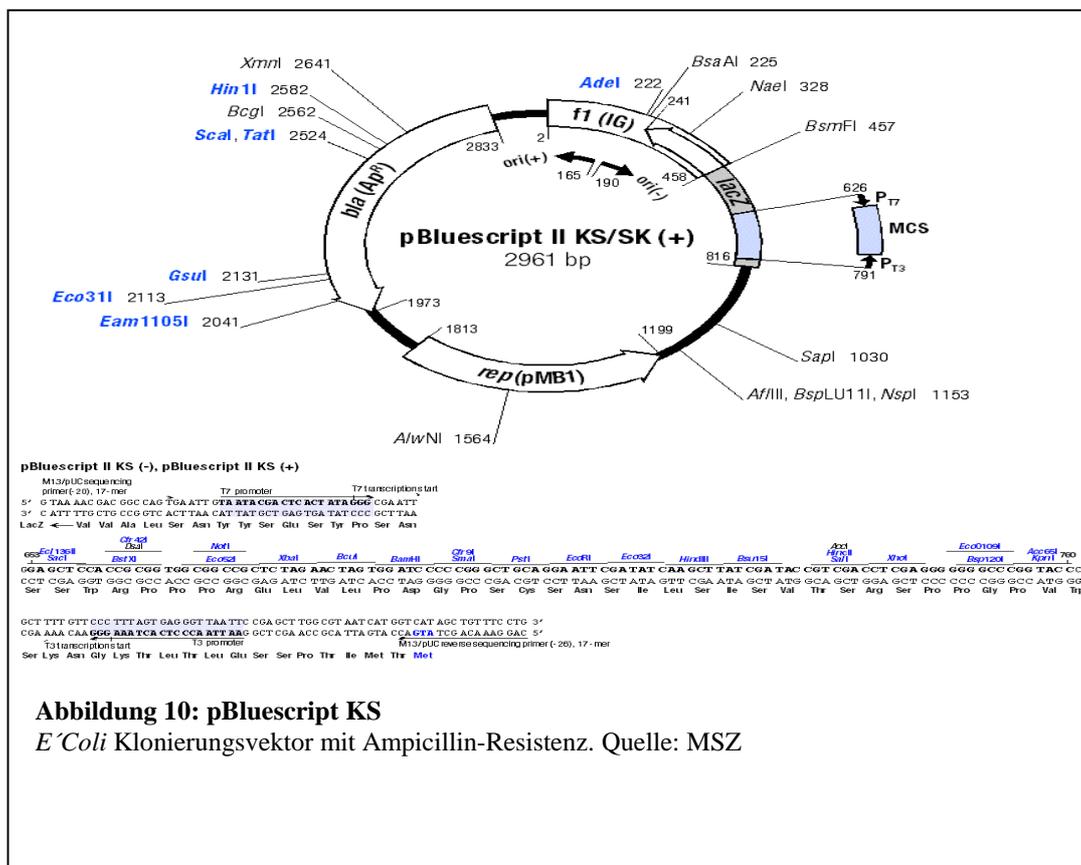
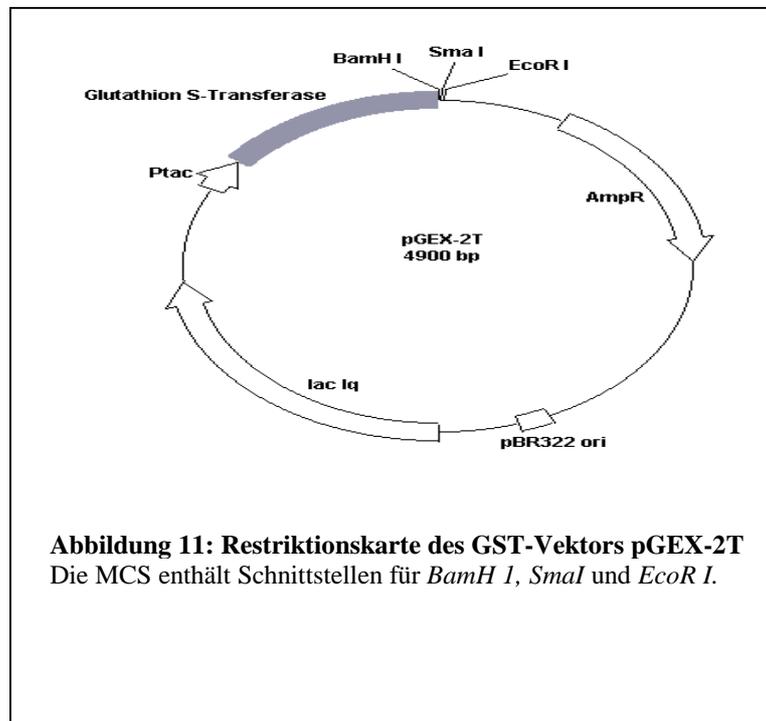


Abbildung 10: pBluescript KS
E. Coli Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz. Quelle: MSZ

2.1.8.4 pGEX 2-T



2.1.8.5 pCDNA3

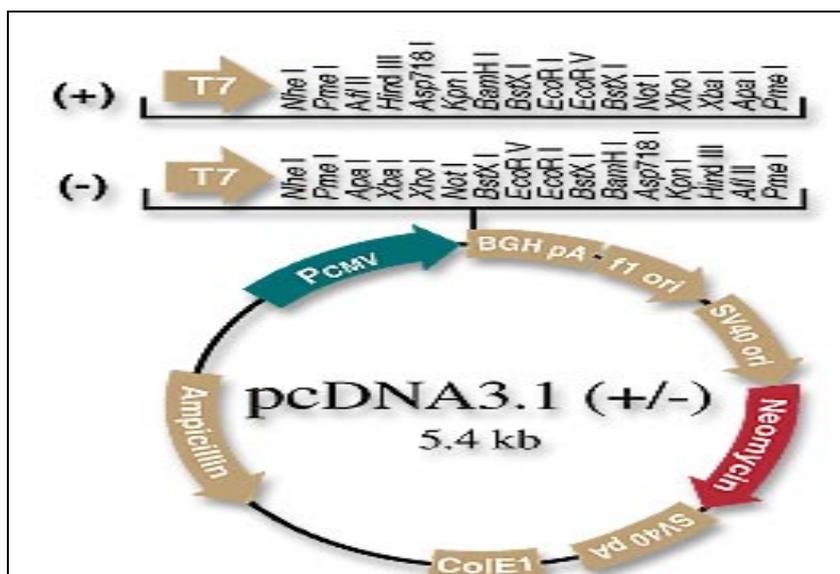


Abbildung 12: Struktur des pCDNA 3 Vektors

Vor der MCS befindet sich die Promotor-Sequenz des menschlichen Cytomegalievirus-Gens für hohe Transkriptionsraten. Die Polyadenylation-Signal- und Transkriptions-Terminations-Sequenzen bestehen aus dem „bovine growth hormone“ (BGH) und erhöhen die RNA Stabilität. Der SV40 Ursprung ist wichtig für die episodale Replikation in Zelllinien, die das SV40 large T-Antigen exprimieren (z.B. NIH 3T3). Mit dem Neomycin-Resistenz-Gen können jene NIH 3T3 selektioniert werden, die den Vektor tragen. Das Ampicillin-Resistenz-Gen und der ColE1 Ursprung sind essentiell für Selektion in E Coli (Quelle: InvitroGen)

2.1.8.6 pPC 86HA3

In den Two-Hybrid Vektor pPC86 wurde ein dreifacher HA-Tag in die *Sal I*-Schnittstelle des Polylinkers inkloniert. Quelle: A. Kalmes, MSZ⁹¹

2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, stammen die hier aufgeführten Methoden aus dem Laborhandbuch: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ von Sambrook et al.¹³³, sowie aus den "Current Protocols in Molecular Biology" von Ausubel et al.¹³⁴

2.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.2.1.1 Herstellung ultrakompetenter Bakterien

Plasmid-DNA kann durch das Bakterium *Escherichia coli* amplifiziert werden. Hierfür wird die Plasmid-DNA in Bakterien transformiert, nachdem diese mit Calciumchlorid behandelt wurden und somit kompetent sind¹³⁵.

Aus einem tiefgefrorenem Glycerolstock (-80° C) werden *E. coli* des Stammes DH5 α auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 l SOB Medium wird mit ca. 20 großen Bakterienkolonien angeimpft und bei 18°C in einem 2 l Kolben unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (bei $\lambda = 600$ nm) kultiviert. Nach Abkühlen auf Eis werden die Bakterien zentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 10 min) und das Pellet wird vorsichtig in 320 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgt ein erneuter Zentrifugationsschritt, wobei das Pellet diesmal in 80 ml TB aufgenommen wird. Um die Bakterien einfrieren zu können, wird unter sachtem Rühren DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% hinzugefügt und die Lösung erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, bevor sie, bis zu ihrer Verwendung, bei -80°C gelagert werden. Die Kompetenz der Bakterien wird in Anzahl der transformierten Bakterien (= sichtbare Klone auf der Platte) pro eingesetzte DNA (μ g) angegeben.

- SOB Medium: 2% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄
10 mM NaCl; auf pH 6,7 - 7,0 einstellen; autoklavieren
- TB-Puffer: 10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; auf pH 6,7 einstellen; 55 mM MnCl₂
zugeben; steril filtrieren (0,22 μ m)

2.2.1.2 Transformation mit kompetenten *E. coli*s

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Dabei werden die Bakterien mit Plasmiden transformiert, die ein bestimmtes Resistenzgen beinhalten (z.B. Amp^r). Die Bakterien werden daraufhin auf Selektionsplatten ausgestrichen (z.B. mit Ampicillin), so dass nur Wachstum der transformierten Bakterien stattfindet¹³⁵.

In der beschriebenen Methode werden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wird Plasmid-DNA im gewünschten Mengenverhältnis (i.d.R. 50-200 µl *E. coli* und 1-2 µl Plasmid-DNA je nach Konzentration) hinzugefügt und die gemischte Suspension für ca. 15-30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C (45 sec., dadurch werden die Bakterienwände abgedichtet) werden die Zellen erneut für 5 min auf Eis gelegt, danach wird 1 ml LB-Medium hinzupipettiert und der Transformationsansatz für eine Stunde im Brutschrank (37°C) kultiviert. Während dieser Inkubation kommt es zur Expression des Resistenzmarkers (meist Ampicillinresistenzgen). Anschließend werden die Zellen auf 2xTY + Amp. Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank herangezüchtet.

LB-Medium

Bacto Trypton: 10 g; Hefeextrakt: 5 g; 1M NaCl: 5 g; mit bidest. H₂O auf 1 l auffüllen

→ pH mit 1 M NaOH auf 7,5 einstellen

→ autoklavieren

2x TY Platten/Medium + Ampicillin

Trypton: 16g; Hefeextrakt: 10g; 1 M NaCl: 5g; Agar: 15g

→ pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen; autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen

→ 1 ml der Ampicillin Stocklösung hinzufügen

2.2.2 Molekularbiologische Methoden – DNA

2.2.2.1 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

a) Präparativer Maßstab (Maxiprep)

Plasmid-DNA wird aus *E. coli* isoliert, indem eine Kolonie der Selektionsplatte in 100 ml Nährmedium 2xTY + Amp. inokuliert und über Nacht bei 37°C kultiviert wird. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation (4000 rpm, 4°C) wird das Pellet in 5 ml Lyselösung A resuspendiert. Die Lösung wird daraufhin durchmischt und erscheint nun viskös. Jetzt erfolgt

der Zusatz von 10 ml Lyselösung B, die Lösung wird geschwenkt und für max. 5 min auf Eis gelegt (Lyse der Zellwände). Anschließend wird die Lösung mit eiskalter Lyselösung C neutralisiert und für 15 min auf Eis gestellt. Bei der anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm wird der Zelldetritus abgetrennt, der Überstand über eine Mullbinde in zwei neue 50 ml Reaktionsgefäße abfiltriert und mit je etwa 45 ml Isopropanol versetzt (10 min auf Eis). Da durch Zugabe von Isopropanol die Plasmid-DNA ausfällt, kann sie durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 15 min) pelletiert werden. Das Pellet wird in 500 µl TE aufgenommen, mit 500 µl sterilem 5 M LiCl-Lösung vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 10 min), der Überstand gesammelt und in einem 14 ml Reaktionsgefäß mit 1 Vol Phenol gemischt (Abzug). Der Zusatz von Phenol bewirkt die Abtrennung der Nukleinsäuren von den Lipiden und den nicht gefällten, restlichen Proteinen. Hierbei werden die unterschiedlichen Ladungen von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen genutzt. Nach der folgenden Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 5 min) sind drei Phasen zu erkennen: die untere Phase ist aufgrund der größeren Dichte von Phenol gegenüber Wasser die Phenolphase, worin sich die Proteine befinden. In der darüberliegenden, wässrigen Phase sind Plasmid-DNA und RNA gelöst. Zwischen der Phenolphase und der wässrigen Phase befindet sich die Interphase, in der sich Lipide, verbleibende Proteine und Zelltrümmer befinden. Der Überstand (wässrige Phase) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform gemischt. Bei dieser Nachextraktion wird die Polarität des Chloroforms zur Entfernung der verbleibenden Proteine und des Phenols genutzt. Durch nachfolgende Zentrifugation wird das Chloroform vom wässrigen Überstand getrennt, welcher in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wird. Nach Zugabe von 1/20 Vol. steriler 8 M LiCl-Lösung und 1 Vol Isopropanol wird das Reaktionsgefäß für 5 min auf Eis gelegt und danach bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird daraufhin abgesaugt, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, 10 min im Vakuum getrocknet und in 300-400 µl TE gelöst. Durch 4 µl RNase (10 mg/ml) kann störende RNA beseitigt werden. Bis zur weiteren Verwendung wird die DNA bei -20°C eingefroren.

- | | |
|----------------|--|
| - Lyselösung A | 50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA |
| - Lyselösung B | 1% SDS; 0,2 M NaOH |
| - Lyselösung C | 3 M KOAc; 2 M HOAc |
| - TE (pH 8,0) | 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); mit bidest Wasser auffüllen |

b) Analytischer Maßstab (Miniprep)

Eine Miniprep wird durchgeführt, wenn ein bestimmtes Plasmid (z.B. aus einer Klonierung) im Restriktionsverdau analysiert werden soll, die Vorgehensweise ähnelt dabei der Maxiprep. 2 ml Über-Nacht-Kultur werden in Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100 µl Lyselösung A resuspendiert, 200 µl Lyselösung B hinzugegeben, max 5 min auf Eis inkubiert und zum Schluss mit 150 µl Lyselösung C versetzt und das Reaktionsgefäß leicht geschüttelt. Nun wird 1 ml Ethanol 100% hinzugegeben, gevortext, 10 min bei -20°C gelagert und dann zentrifugiert (5 min bei 13000 rpm). Daraufhin wird der Überstand verworfen und 100 µl TE und 100 µl 5 M LiCl-Lösung werden dem Pellet hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Lagerung bei -20°C wird noch einmal zentrifugiert, der Überstand zu 600 µl Ethanol 100% gegeben, zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

2.2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA und DNA-Fragmenten sowie zur Kontrolle von RNA-Transkripten dient die horizontale Agarosegelelektrophorese. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrates wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit wegen des Widerstandes der Agarose-Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Relaxierte DNA wandert langsamer als die ringförmige superhelikale Form. Man verwendet zum Vergleich der DNA-Größen standardisierte Größenmarker (z.B. λ -DNA/*Eco130I* oder 100 base pair ladder). Für DNA-Fragmente bis zu einer minimalen Größe von 1000 bp werden 1%-Agarose-Gele verwendet, für kleinere Fragmente 2%-Agarose-Gele. Zur Herstellung der Gele wird das Agarosepulver mit TAE (z.B. 1 g Agarose mit 100 ml TAE) aufgekocht. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hat, wird 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml hinzugefügt. Ethidiumbromid ist als interkalierende Substanz in der Lage, sich in die DNA-Doppelhelix einzulagern und die DNA im UV-Licht sichtbar werden zu lassen. Die Agaroselösung wird in abgedichtete Gelschlitten gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur kann der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingelegt werden, die mit TAE gefüllt ist. Die Taschen werden mit den mit Probenpuffer vermischten DNA-Proben gefüllt. Dabei richtet sich die Menge der eingesetzten DNA nach der Konzentration und der Größe des Fragmentes. Von 2 µl im 20 µl Ansatz verdauter Miniprep DNA mit einer Plasmidlänge von 5000 bp werden beispielsweise 4 µl Verdau-Lösung plus 0.8 µl 6 x Puffer eingesetzt. Eine Tasche wird mit

2 µl BSA (1 mg/ml)
1-5 u Restriktionsenzym
mit ddH₂O auffüllen

Der Ansatz wird für etwa 1 h bei der entsprechenden Temperatur (üblicherweise 37°C) inkubiert. Nach Zugabe des Probenpuffer wird die DNA in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt und dann analysiert.

- präparativer Verdau (50 µl): 10-30 µl Plasmid-DNA (je nach Konzentration und Größe)
 5 µl Reaktionspuffer (10x)
 5 µl BSA (1 mg/ml)
 2-10 u Restriktionsenzym
 mit ddH₂O auffüllen

Die Inkubation erfolgt in diesem Fall gewöhnlich bei 37°C über Nacht. Anschließend erfolgt die Kontrolle des Verdau durch elektrophoretische Auftrennung (→ 2.2.1.2) auf einem Agarosegel und Agarose-Gel-Extraktion (→ 2.2.1.3)

2.2.2.5 Herstellung von „blunt-end“ DNA-Fragmenten

Durch den Verdau von DNA-Molekülen mit Restriktionsenzymen entstehen DNA-Fragmente, die entweder glatte Enden, d.h. „blunt-end“ (z.B. *EcoRV*, *SmaI*), 5'-überhängende („sticky“) Enden (z.B. *EcoRI*, *XbaI*) oder 3'-überhängende Enden (z.B. *SacI*, *KpnI*) besitzen.

Sollen zwei DNA-Fragmente, die mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen („sticky“) geschnitten wurden, ligiert werden, muss eine blunt-end Ligation erfolgen, wobei zuvor die DNA-Fragmente mit überhängenden Enden mit den komplementären Basen aufgefüllt werden. Es ist allerdings auch möglich, eine partielle Auffüllreaktion durchzuführen, wobei entweder ATP, GTP, CTP oder TTP in der gewünschten Kombination der Reaktion hinzugegeben wird.

Beispiel: 5' Überhang: AACC, 3' Überhang GGAA : Zugabe von TTP, da G die komplementäre Base zu C ist und deshalb nicht aufgefüllt werden muss.

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wird die Klenow DNA-Polymerase verwendet, welche 5' Exonuclease und 3' Polymerase Aktivität besitzt.

Standardansatz: 4 µl 10x Klenow-Puffer
 4 µl 10 mM dNTP's

- 2 µl Klenow-Fragment (10 U/µl)
- 30 µl DNA-Fragment (ca. 0,1 - 4 µg DNA)

Der Ansatz wird für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion entweder mit 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt oder der Reaktionsansatz über einer Säule gereinigt (→ 2.2.2.10)

2.2.2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit CIAP

Die DNA-Enden der Vektor-DNA sollten nach erfolgreicher Restriktion dephosphoryliert werden um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Dies geschieht mit CIAP („Calf Intestinal alkaline Phosphatase“), welche die Entfernung der 5' Phosphatgruppe von DNA, RNA, sowie Ribo- und Desoxyribonucleosidtriphosphaten katalysiert. Dadurch kann die T4-DNA-Ligase nicht die Verknüpfung von Hydroxylenden zu Phosphatenden durchführen und der Vektorhintergrund bei Klonierungen minimiert wird.

Direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau oder die Gelextraktion wird folgender Ansatz zubereitet

- Standardansatz: 28 µl DNA (nach Gelextraktion)
- 5 µl 10 x Puffer
 - 1 µl CIAP 1,3 u
 - 16 µl H₂O

Dieser Ansatz wird für 30 min bei 37° C inkubiert und anschließend wird die Vektor-DNA durch Phenolisierung (→ 2.2.9) oder über eine Säule (→ 2.2.10) aufgereinigt.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase kann freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA verknüpfen, indem sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung katalysiert. T4-DNA-Ligase kann sowohl kohäsive („sticky“) Enden als auch glatte („blunt“) Enden miteinander ligieren. Klonierungsvektor und Insert werden vor der Ligation mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (→ 2.2.2.4), gereinigt (→ 2.2.2.3) und, um die Konzentrationen vergleichen zu können, auf ein Agarosegel aufgetragen.

Wichtig für die Ligation ist das Konzentrationsverhältnis von Insert und Plasmid. Zu berücksichtigen sind dabei die Konzentration der DNA und die Größe der jeweiligen Fragmente. Allgemein gilt, dass die Konzentration des Inserts bei kohäsiven Enden das 3-5-fache und bei glatten Enden das 7-10-fache der des Plasmids betragen sollte, bei sehr kleinen

Inserts (PCR-Fragmente) müssen jedoch die Größenverhältnisse mit einbezogen werden. Daher wurde eine Formel entwickelt, die für Ligationen mit Inserts jeder Größe anwendbar ist und als Anhaltspunkt dienen kann:

$$\frac{[\text{LängeInsert}] \cdot [\text{VerhältnisInsert / Plasmid}] \cdot [\text{KonzPlasmid}]}{[\text{LängePlasmid}] \cdot [\text{KonzInsert}]} = \text{Insert} / \text{Plasmid}$$

Legende: LängeInsert = Länge des Inserts in bp

VerhältnisInsert/Plasmid = Überschuß des Inserts im Vergleich zum Plasmid

KonzPlasmid = Konzentration des Plasmids ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

LängePlasmid = Länge des Plasmids in bp

KonzInsert = Konzentration des Inserts ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Als Richtwert für die Plasmidmenge wird 250 ng angegeben.

- Ligation kohäsiver und glatter Enden:
 - x μl Insert
 - y μl Plasmid
 - 2 μl 10x Ligationspuffer
 - 4 μl PEG 4000 50%
 - 1 μl T4-Ligase (1 u/ μl)
 - auf 20 μl mit ddH₂O auffüllen
- Religation eines Plasmids:
 - y μl Plasmid
 - 5 μl 10x Ligationspuffer
 - 10 μl PEG 4000 50%
 - 2 μl T4-Ligase (1 u/ μl)
 - auf 50 μl mit ddH₂O

Der Ligationsansatz wird bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

Beide Ansätze können nachfolgend für eine *E. coli* Transformation (\rightarrow 2.2.1.2) verwendet werden.

2.2.2.8 Herstellung von PKM2 Deletionsmutanten

- **Klonierung von pPC86/PK 1-1430**

pPC86 wurde mit *Not I* geschnitten, Überhänge wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt, der Vektor mit *EcoRI* geschnitten und isoliert. pPC86 / PKM2 wurde *KpnI* geschnitten, Überhänge mit Klenow-Fragment aufgefüllt, daraufhin mit *EcoRI* geschnitten und in den isolierten Vektor hineinligiert. Der Erfolg der Ligation wurde mit Doppelverdau *Sall* / *AatII* kontrolliert.

- **Klonierung von pPC86/PK 1-700**

pPC86 / PKM2 wurde im Doppelverdau mit *SacI* / *PstI* geschnitten, pPC86 / PK 1-550 aus dem Gel isoliert, die Überhänge mit Klenow-Fragment aufgefüllt und mittels einer blunt-end-Ligation der Vektor religiert. Der Erfolg der Re-ligation wurde durch *BglII* Verdau kontrolliert.

- **Klonierung von pPC86/PK 1-620**

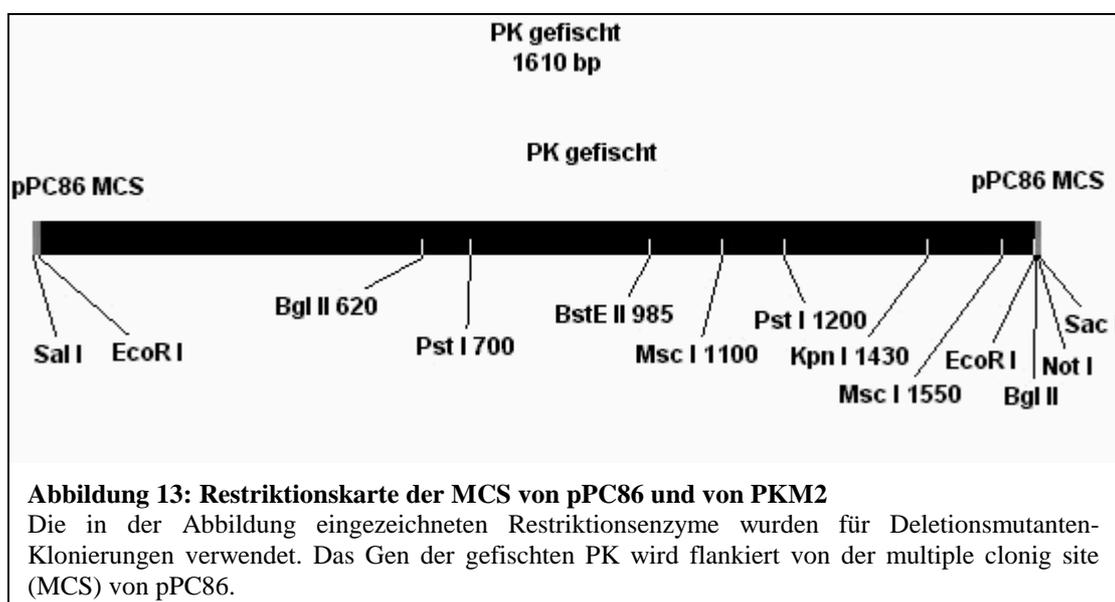
pPC86 /PKM2 wurde mit *BglII* geschnitten, das pPC86 / PK 1-517 Fragment aus dem Gel isoliert und der Vektor daraufhin religiert. Der Erfolg der Religation wurde mit Doppelverdau *SalI* / *NotI* kontrolliert.

- **Klonierung von pPC86/PK 1-985**

pPC86 wurde mit *NotI* geschnitten, Überhänge wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt, der Vektor mit *EcoRI* geschnitten und isoliert. pPC86 / PKM2 wurde *BstE II* geschnitten, Überhänge mit Klenow-Fragment aufgefüllt, daraufhin mit *EcoRI* geschnitten und in den isolierten Vektor hineinligiert. Der Erfolg der Ligation wurde mit Doppelverdau *SalI* / *AatII* kontrolliert.

- **Klonierung von pPC86/PK Δ1100-1550**

Bei der Durchführung dieser Klonierung mußte verhindert werden, dass nach Religation ein



„Frameshift“ des Leserahmens entsteht. pPC86 /PKM2 wurde mit *Msc I* geschnitten, das pPC86 / PK Δ 1100-1550 Fragment aus dem Gel isoliert und der Vektor daraufhin religiert. Der Erfolg der Religation wurde mit Doppelverdau *EcoR I* / *Not I* kontrolliert. Abb 13 gibt einen Überblick über die entsprechenden Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme.

2.2.2.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR-Reaktion ermöglicht die selektive Anreicherung von Genabschnitten definierter Sequenz und Länge in einem sich vielfach wiederholenden Prozess. Für diese Reaktion kommen hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien zum Einsatz, z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Diese Polymerasen bleiben auch nach mehrfachem Erhitzen auf 94°C aktiv. Als Matrize können chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder Bakterien- bzw. Hefezellen dienen. Der zu amplifizierende Abschnitt wird von zwei Oligonukleotiden (Primern) im großen Überschuss flankiert, die jeweils an einen der beiden DNA-Stränge binden.

Im ersten Schritt (*Denaturierung*) wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstrang-DNA (ssDNA) überführt. Im nächsten Schritt (*Annealing*) wird die Temperatur auf 50-60° C gesenkt, wobei die zu wählende Annealingtemperatur von der Schmelztemperatur und der Homologie der Oligonukleotide zur Templatesequenz abhängig ist. Die genomische DNA bleibt dabei denaturiert, weil die komplementären Stränge in einer zu geringen Konzentration vorliegen, um während der Inkubationsdauer aufeinander zu treffen. Die spezifischen Oligonukleotide jedoch, die in sehr hohen Konzentrationen vorhanden sind, hybridisieren mit ihren komplementären Sequenzen auf der genomischen DNA. Sie dienen nun als Starter für die Synthese eines neuen DNA-Stranges, die nach Zugabe der Oligonukleotide und der temperaturresistenten DNA-Polymerase beginnt. Im dritten Schritt (*Elongation*) findet die Kettenverlängerung, d.h. Vervielfältigung, der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden der Primer durch die thermostabile Polymerase bei 72°C statt. Die Elongationszeit sollte dabei ca. 1 min pro kb betragen. Nach Beendigung der Synthese wird das gesamte Gemisch erneut auf 95° C erhitzt, um die neu gebildeten DNA-Doppelstränge zu schmelzen. Nach erneuter Temperatursenkung findet eine neue Syntheserunde statt. In jeder Runde wird die Anzahl der Kopien von der zwischen den Startermolekülen synthetisierten Sequenz verdoppelt. Die gewünschte Sequenz wird somit exponentiell vermehrt.

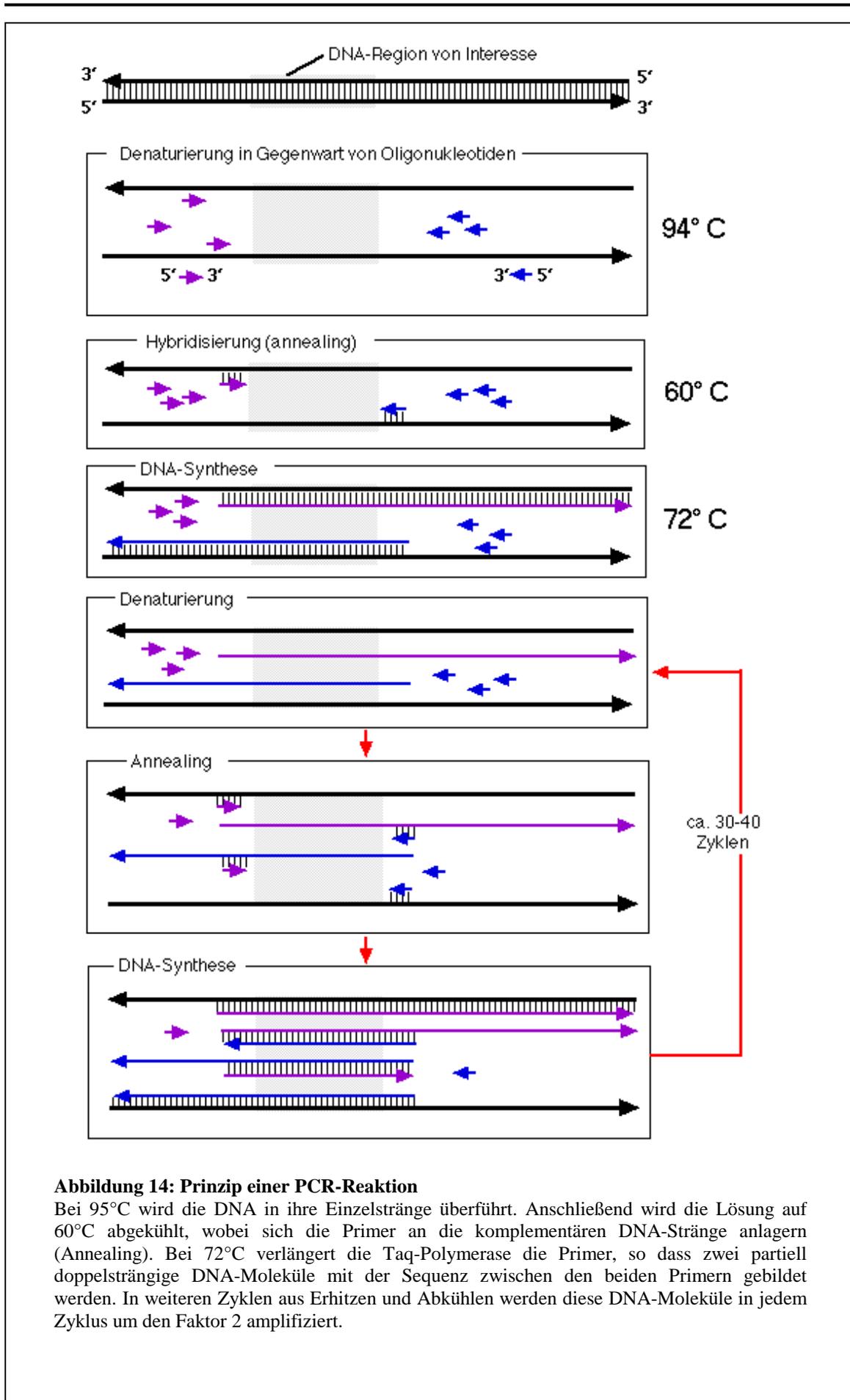


Abbildung 14: Prinzip einer PCR-Reaktion

Bei 95°C wird die DNA in ihre Einzelstränge überführt. Anschließend wird die Lösung auf 60°C abgekühlt, wobei sich die Primer an die komplementären DNA-Stränge anlagern (Annealing). Bei 72°C verlängert die Taq-Polymerase die Primer, so dass zwei partiell doppelsträngige DNA-Moleküle mit der Sequenz zwischen den beiden Primern gebildet werden. In weiteren Zyklen aus Erhitzen und Abkühlen werden diese DNA-Moleküle in jedem Zyklus um den Faktor 2 amplifiziert.

Standard PCR-Ansatz:

DNA (Plasmid- oder chromosomale)	50 ng
10x Reaktionspuffer der Polymerase (ohne MgCl ₂)	10,0 µl 25 mM MgCl ₂
	3,0 µl
10 mM dNTP's	2,0 µl
Primer I und II	50 pmol
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	auf 100 µl auffüllen

eventuell Überschichten mit einem Tropfen Mineralöl (vom Thermocycler abhängig, Gebrauchsanweisung beachten)

30 Zyklen:

60'' 94°C Denaturierung

60'' 62°C Annealing

60' 72°C Elongation

10' 72°C last step delay

halten auf 4°C

Bei der Auswahl der Oligonukleotide sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- GC-Gehalt ca. 50%
- ideale Länge 18 - 28 bp; längere Primer müssen HPLC-gereinigt sein
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologien der Primer zueinander vermeiden
- G oder C am 3'-OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR-Reaktion entstehenden Hybrids, längere GC-Abfolgen jedoch vermeiden

Anhand einer Faustregel kann die Schmelztemperatur (T_m) der Primer errechnet werden:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$$

Die optimale Annealing-Temperatur liegt 2 – 5°C unter dem niedrigsten errechneten Schmelzpunkt. Diese Faustregel gilt allerdings nur für Primer mit ca. 18 – 24 bp. Falls unspezifische PCR-Produkte gebildet werden, sollte die Annealingtemperatur erhöht werden.

2.2.2.10 DNA-Aufreinigung durch Phenolisierung

Im ersten Schritt der Reinigung werden mit Hilfe von Phenol die Proteine entfernt, im zweiten Schritt wird die DNA durch EtOH präzipitiert.

Vortex, 3-5 sec zentrifugieren, 5-10 min im Wasserbad kochen, danach sofort auf Eis und erneut kurz zentrifugieren

3 μ l Mix A,
6 μ l [α -³²P]-dATP (entsprechen 60 μ Ci)
1 μ l Klenow Fragment (3u/ μ l)
5 min bei 37 ° C
4 μ l dNTP
5 min bei 37 ° C
1 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Anschließend muss die DNA-Sonde aufgereinigt werden.

2.2.2.13 Reinigung radioaktiver DNA-Sonden (Gelchromatographie)

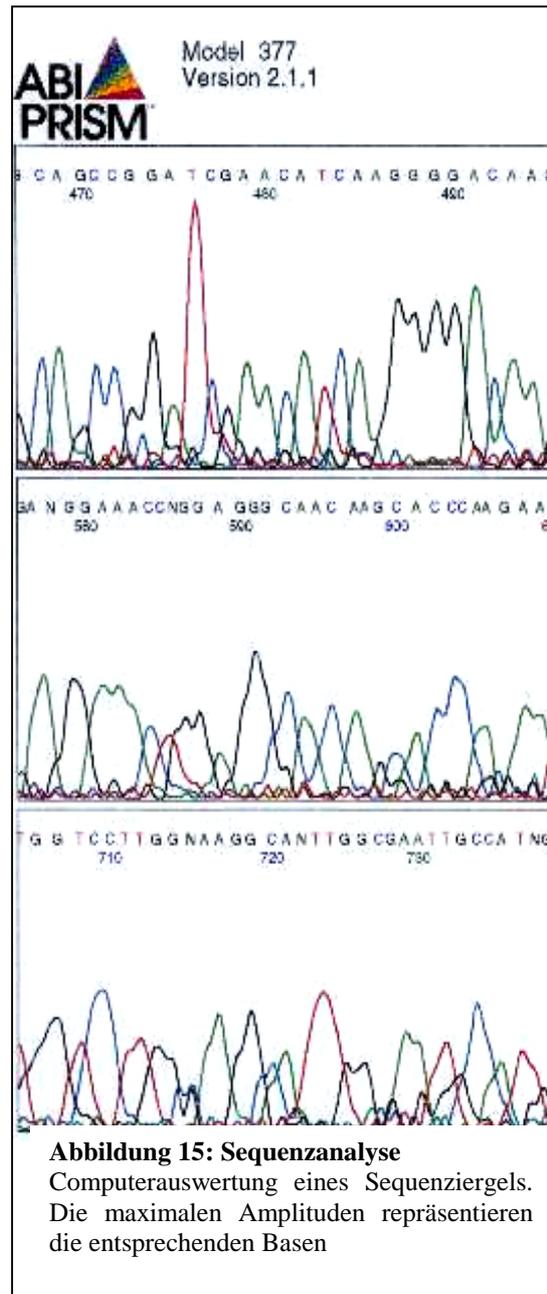
Nicht inkorporierte, radioaktive Nucleosidtriphosphate werden mittels Gelchromatographie entfernt. Die DNA-Sonde wird hierbei in eine Gelsäule gegeben, die aus porösen Netzen besteht (Sephadex G-50). Kleine Moleküle dringen in die Poren ein und werden langsamer eluiert als große. Die nicht hybridisierten [α -³²P]-dATP's und „random primer“ werden also durch das Gel zurückgehalten, die hybridisierten Sonden werden eluiert.

Zur Durchführung wird der Auslass von 1 ml Spritzen mit etwas Glaswolle verschlossen und anschliessend mit Sephadex G-50 aufgefüllt. Die Spritzen werden im Glasreagenzglas 3 min bei 2300 rpm zentrifugiert, daraufhin wird die Gelhöhe in der Spritze kontrolliert. Bei zu geringer Gelhöhe in der Spritze wird etwas Gel nachgefüllt und erneut zentrifugiert. Die Spritze wird nun in ein neues Glasreagenzglas überführt, welches in ein 50 ml Falcon-Tube eingehängt und mit der radioaktiven Probe beladen wird. Erneut wird für 3 min bei 2300 rpm zentrifugiert, das gewonnene Eluat kann zur Kolonie-Hybridisierung weiterverwendet werden.

2.2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion nach der Sanger-Methode¹³⁶. Grundlage ist dabei die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, außer Deoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTP's) auch 2',3'-Dideoxyribonucleosidtriphosphate (ddNTP's) als Substrate zu verwenden.

Das für die Reaktion eingesetzte Nucleotidgemisch enthält außer den vier Desoxynucleotiden auch jeweils ein Dideoxynucleotid. Dadurch kommt es auch zum Einbau dieser ddNTP's, die ein weiteres Wachstum der Kette blockieren, da ihnen ein 3'-



Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Bei der automatisierten DNA-Sequenzierung wird ein fluoreszenzmarkierter Primer eingesetzt, mit dem mittels PCR in vier verschiedenen Reaktionsansätzen basenspezifische Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge erzeugt werden. Die Reaktionsgemische werden auf ein Sequenziergel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die durch das Gel wandernden Banden anhand eines Laser detektiert. Die Daten werden im Computer gespeichert und analysiert.

Sequenzierungsansatz:

ca. 1 µg DNA

10 pmol Primer

auf 16 µl mit ddH₂O auffüllen
 4 µl Terminator-Mix (enthält
 dRhodamin-Terminatoren)

Die Sequenzierung selbst wurde von einem hauseigenen Servicedienst übernommen, wobei ein ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler eingesetzt wird.

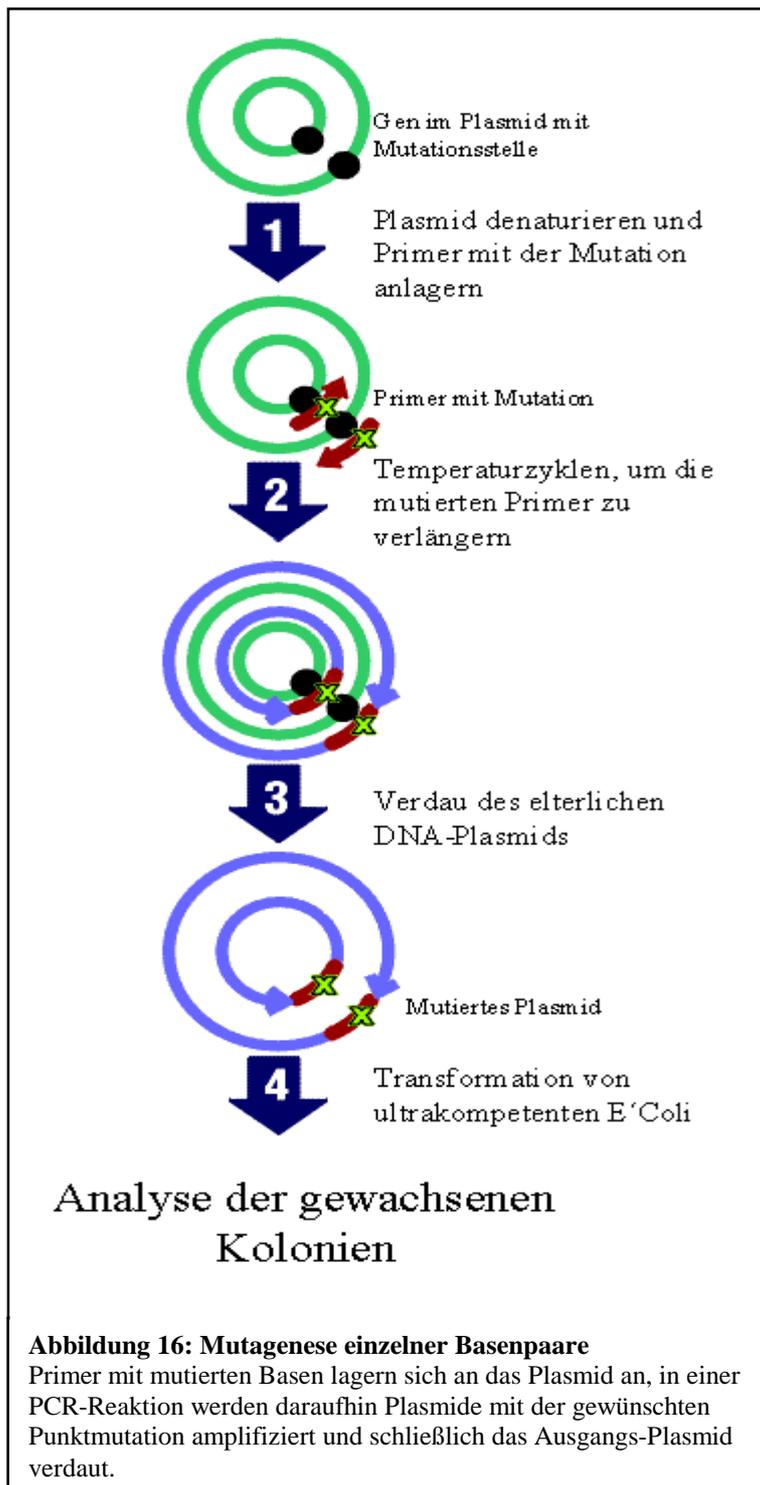
2.2.2.15 Mutagenese einzelner Basen

Die Mutagenese einzelner Basen in einem Plasmid wird exakt nach dem Stratagene „QuikChange™ Site - Directed Mutagenesis Kit“ - Protokoll durchgeführt. Hierbei können entweder Punktmutationen oder ganze Aminosäuren ausgetauscht werden. An die zu mutierende Region werden Oligonukleotid-primere angelagert, welche die Mutation besitzen (siehe Schema). Mittels der *Pfu*-Polymerase werden die Plasmide verdoppelt. Nach diesem Temperatur-„Cycling“ wird die „elterliche“ Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, welche spezifisch für methylierte DNA ist (DNA, die von *E. coli* isoliert wurde ist *dam* methyliert und damit angreifbar für *Dpn I*). Das mutierte Plasmid kann nun in ultrakompetente *E. coli* transformiert und analysiert werden. Folgende Reaktion wird vorbereitet:

5 µl 10 x Reaktions-Puffer
 5-50 ng DNA -Plasmid
 125 ng Oligonukleotid-Primer 1
 125 ng Oligonukleotid-Primer 2
 2 µl 10 mM dNTP Mix
 mit ddH₂O auf 50 µl auffüllen
 1 µl native *Pfu* DNA Polymerase 2,5 U/µl)

Für Punktmutationen werden 12 Zyklen angesetzt, für einzelne Aminosäure-Mutationen 16 und für mehrere Aminosäuren 18 Zyklen:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 sec
2	12-18	95°C	30 sec
		55°C	1 min
		68°C	2 min/kb Plasmid-Länge



Danach wird 1 μl *Dpn I* (10 U/ μl) der Reaktionslösung hinzugegeben und für eine Stunde (37°C) inkubiert. Letztendlich werden kompetenten Bakterien transformiert (\rightarrow 1.2.1.2), von den gewachsenen Klonen Minipreps angefertigt und sequenziert. Falls durch die Mutation eine neue Schnittstelle entstanden ist, so kann der Erfolg der Mutation mittels Restriktionsenzymverdau kontrolliert werden.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden - Proteine

2.2.3.1 Isolierung von Proteinextrakten aus der Hefe (pPC Vektor)

Eine Kolonie der jeweiligen Dropout-Platte wird in 2 ml SD Mangelmedium (-Leu bei pPC 97, -Trp bei pPC86) überführt und 48 h bei 30° C im Wasserbad inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 30 µl 2 x SDS-Lämmli Puffer resuspendiert, sofort für 3 min gekocht (Protease-Inaktivierung) und die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Durch Hinzufügen von in Säure gewaschenen Glasperlen und das Schütteln im Tischschüttler werden die Zellen aufgebrochen und sind unter dem Lichtmikroskop als dunkle „Geisterzellen“ zu erkennen. Die Reaktionsgefäße werden kurz auf Eis gestellt und es schließt sich ein weiterer Mischungs-Vorgang an. Es wird dann 70 µl 2 x SDS-Lämmli-Puffer hinzugefügt, erneut geschüttelt und die Flüssigkeit in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

SD-Mangelmedium -Leu bzw. -Trp

Difco Hefe Stickstoffbasen ohne Aminosäuren:	8 g
Agar:	22 g
Tyrosin:	55 mg
Uracil:	55 mg
Adenin:	55 mg

→ autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen

→ 100 ml 20% Glucoselsg.

→ 10 ml „drop out“ Lösung ohne die AS Leucin bzw. Tryptophan

2x SDS-Laemmli Puffer 0,6 M Tris-HCl (pH 6,8); 4% β-Mercaptoethanol; 4% SDS; 10%

Glycerol;

Bromphenolblau zugeben, bis Blaufärbung eintritt

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die extrahierten Proteine (→ 2.2.3.1) befinden sich nicht in einer wäßrigen Lösung, sondern in einem Medium, daß auch das stark negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Dieses bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine mit zwei wesentlichen Effekten: 1. Einzelne Proteinmoleküle werden aus ihrer Bindung an andere Proteine oder Lipide freigesetzt, 2. Die Proteinmoleküle erhalten eine Netto-Minusladung. Bei der Elektrophorese wandern daher alle Proteine unabhängig vom Ionisierungsgrad zum

Pluspol. Zusätzlich wird die reduzierende Substanz β -Mercaptoethanol hinzugesetzt, die alle Disulfid-Brückenbindungen im Protein spaltet, so dass auch mögliche Untereinheiten eines Protein analysiert werden können. Bei der SDS-Page werden denaturierte Proteine hauptsächlich nach ihrer Masse aufgetrennt, wobei größere Proteine langsamer wandern als kleine. 7,5%ige Trenngele werden aus einer 30% Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% quervernetzendem Bisacrylamid durch Zugabe entsprechender Mengen an Trenngelpuffer und dest. Wasser gemischt, das 3,9%ige Sammelgel durch Verdünnen der gleichen Stammlösung mit Sammelgelpuffer. Die Polymerisation wird durch Zugabe des Radikalstarters APS eingeleitet. Die Gele werden mit Hilfe einer „Mighty Small“ (*Hofer*) Gießvorrichtung gegossen. Entgaste Trenngellösung wird in die Halterung gefüllt und mit 2-Propanol überschichtet, um eine gleichmäßige Grenze zwischen den beiden Gelteilen zu erhalten und um das Gel vor Sauerstoff zu schützen. Nach der Entfernung des Propanols wird das Sammelgel gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach etwa 30 min ist dieser Teil auspolymerisiert.

Anschließend wird die Gelelektrophoresekammer (*Hofer*) aufgebaut, zwei Gele darin eingespannt und mit 1 x Lämmli-Laufpuffer befüllt. Jede Kammtasche wird mit 20 μ l Probe bzw. mit 7 μ l Proteinmarker beladen. Solange sich die Lauffront im Sammelgel befindet, werden konstante 20 mA pro Gel angelegt. Ist das Trenngel erreicht, so wird auf 110 V (oder 30 mA) umgeschaltet. Die Elektrophorese wird gestoppt, sobald die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hat.

- Trenngelpuffer („Resolving Buffer“) 1,5 M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4% TEMED; 0,4% SDS
- Sammelgelpuffer („Stacking Buffer“) 0,14 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,11% TEMED; 0,11% SDS
- 10% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat)
- 5x Laufpuffer („Running Buffer“) 25 mM Tris-HCl; 50 mM Glycin; 0,1 % SDS

2.2.3.3 Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine können mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Das Proteingel wird für 2 h in einer Fixierlösung auf dem Orbitalschüttler geschwenkt. Anschließend wird es für ca. 4 h in Coomassie-Blau Lösung überführt. Überschüssiger Farbstoff wird mit Entfärbungslösung ausgewaschen bis schließlich nur noch die einzelnen Proteinbanden sichtbar sind. Solche Gele können jedoch nicht mehr für Western-Blot Analysen verwendet werden.

- Fixierlösung 50% Methanol; 10% Essigsäure

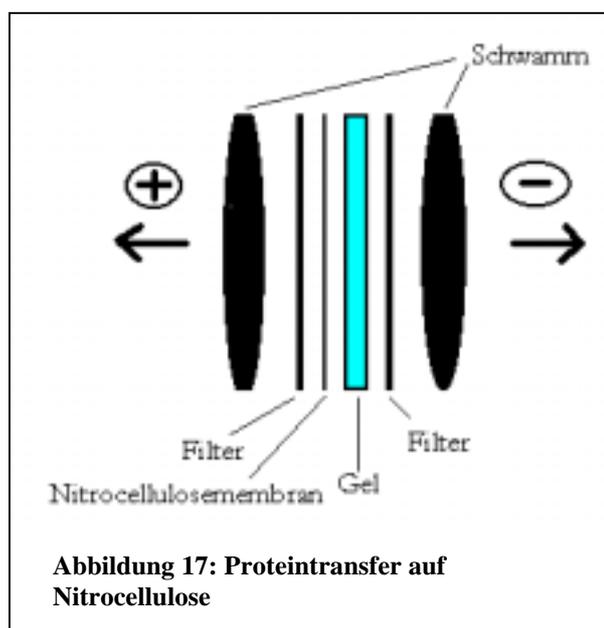
- Coomassie-Blau Lösung 50% Methanol; 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% Essigsäure
- Entfärbungslösung 5% Methanol; 7% Essigsäure

2.2.3.4 Western-Blot Analyse

„Western-Blot“ bezeichnet den Transfer von Proteinen mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus einer Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran. Auf dieser können die immobilisierten Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper und geeignete Detektionssysteme sichtbar gemacht werden.

2.2.3.4.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran

Dieser Vorgang erfolgt mit einer Elektroblokkammer von *Hofer*, die mit Towbin-Puffer gefüllt ist. Um eine Erhitzung des Blots zu verhindern, findet die Durchführung im Kühlraum bei 4°C statt. Auf das Gel wird eine auf die gleiche Größe zurechtgeschnittene, in Towbin-Puffer getränkte, Nitrocellulosemembran gelegt und mit zwei ebenfalls angefeuchteten Whatman-Papieren überdeckt. Die andere Seite des Gels wird auch mit



Whatman-Papierlagen abgedeckt. Zwischen allen Schichten sind Luftblasen unbedingt zu vermeiden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer erfolgt. Beide Seiten des „Sandwiches“ werden noch mit dünnen Schwämmchen belegt, bevor er in die Transferkassette eingesetzt wird. Diese wird daraufhin so in die Blotting-Kammer eingeführt, daß die Membran in Richtung Anode zeigt. Der Transfer findet unter konstantem Stromfluß bei 400 mA für 2 ½ h statt.

- Towbin-Puffer (Blotting-Puffer) 192 mM Glycin; 25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 0,1% SDS; 10% Methanol

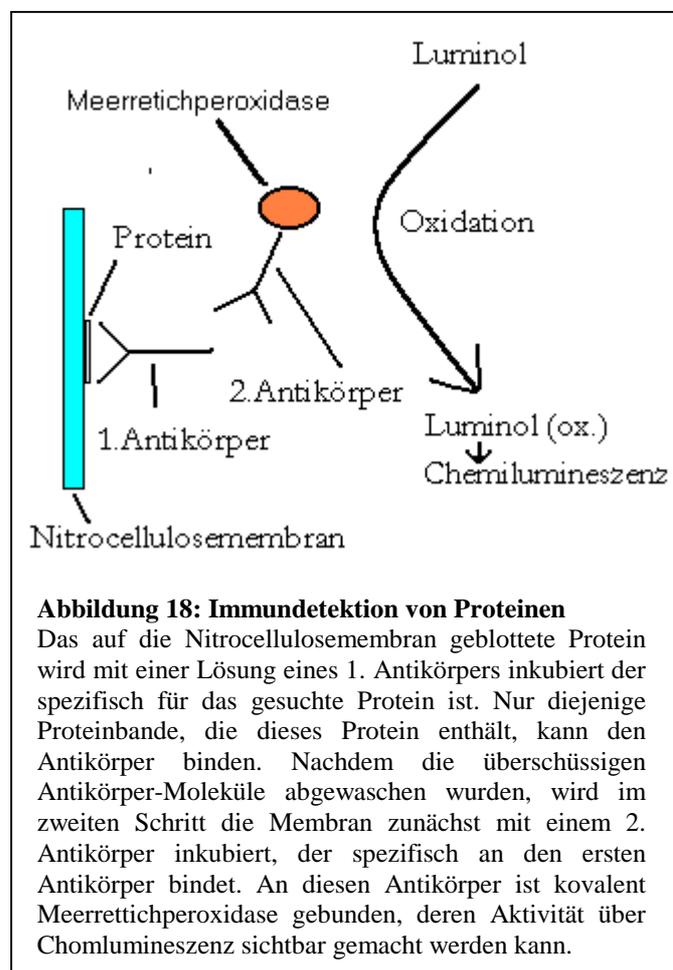
2.2.3.4.2 Färbung der Membran mit PonceauS

Zur Kontrolle des Protein-Transfers kann die Membran mit PonceauS angefärbt werden. Der Nitrocellulosefilter wird für 5 min in PonceauS Lösung geschwenkt und anschließend unter fließendem Wasser solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Zur weiteren Verwendung muß die Membran wieder vollständig von der Farbe befreit werden.

- PonceauS Lösung 0,5% PonceauS Farbstoff; 1% Essigsäure

2.2.3.4.3 Immundetektion von Proteinen

Zunächst werden unspezifische Bindungsstellen, die störende Hintergrundsignale verursachen können, durch Inkubation (mind. 1 h auf dem Horizontalrotator) des Filters in



Blocking-Reagenz abgedeckt. Nach Abgießen der Lösung wird der Filter kurz in TBST geschwenkt. Anschließend wird der erste Antikörper, verdünnt in TBST, hinzugefügt und für 1 - 2h auf dem Rotator inkubiert (RT). Nach gründlichem Waschen (1x 15 min und 2x 5 min) mit TBST, um überschüssigen, nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen, erfolgt eine 60 minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (ebenfalls in TBST verdünnt), der spezifisch an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet. Danach wird der Blot wieder, wie zuvor beschrieben, gewaschen und einer ECL (Enhanced Chemoluminescence) Reaktion unterworfen. ECL Lösungen enthalten Luminol, welches ein Substrat für Meerrettichperoxidase darstellt und nach Oxidation in einen angeregten Zustand übergeht, wobei Licht emittiert wird. Dazu werden für 1 min 1 ml der beiden 1:1 vermischten ECL Lösungen über den Filter gegeben, dieser anschließend getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt und in eine ECL-Expositionskassette platziert. Die leuchtenden Banden können durch Auflegen eines ECL Hyperfilms dokumentiert werden.

-TBST	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,2% Triton X-100
- Blocking-Reagenz	5% fettfreies Milchpulver in 1x TBST lösen

2.2.3.5 GST-Gen-Fusions-System

Das Glutathion-S-Transferase (GST) Gen-Fusions-System eignet sich für die Expression, Reinigung und Detektion von Fusionsproteinen. Dieses System besteht aus drei Hauptkomponenten:

- a) pGEX-Plasmidvektoren
- b) GST-Reinigungssystem
- c) GST-Detektionssystem

Die pGEX-Plasmidvektoren wurden für induzierbare, hochgradig intrazelluläre bakterielle Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusionsprodukte mit *Schistosoma japonicum* – GST entwickelt. Durch die Thrombinspaltstelle kurz vor der MCS des Plasmids kann das Protein von dem GST abgespalten werden. Die Proteinexpression von einem pGEX-Plasmid steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promoters, der durch das Lactose-Analogon IPTG aktiviert wird. Mit IPTG induzierte Kulturen exprimieren das GST-Fusionsprotein für mehrere Stunden.

Die lysierten Bakterien werden zusammen mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Die Struktur des Glutathions ist komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion-S-Transferase, so dass die Moleküle einen Komplex bilden. Das Fusionsprotein kann durch Zugabe von GSH im Überschuss von der Sepharose-Matrix eluiert oder durch Thrombin abgespalten werden.

2.2.3.5.1 Amplifikation und Reinigung des GST-Fusionsproteins

Die DNA im pGEX-2T-Vektor wird in Bakterien (BL 21 DE 3) transformiert und eine Kolonie in 50 ml YT-G Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin über Nacht kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,6 wird die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und bei 25°C und 100 rpm über Nacht stimuliert. Daraufhin wird das Medium in der Beckmann-Zentrifuge bei 4000 rpm bei 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Resuspensionspuffer A plus Zusätze aufgenommen (mit Lysozym, um die Zellwände aufzubrechen). In flüssigem Stickstoff werden die Bakterien für 5 min schockgefroren und danach in warmen Wasser wieder aufgetaut. Um die Zellwände vollständig zu lysieren wird eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Mit dem Sonicator werden die Zellen dreimal für 30 sec bei 100 W beschallt und die Lyse der Zellwände unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach Zugabe von 1 mM PMSF + 1% Triton und bei reichlicher DNA-Menge 10 µl DNAase + 10 mM MgCl₂ werden die Zelltrümmer bei 15500 rpm für 20 min abzentrifugiert (4°C). Das Pellet wird verworfen, zum Überstand wird 1 ml Glutathion-Sepharose gegeben und 1 h bei 4°C auf dem Rotarischer inkubiert. Anschließend wird GSH-Sepharose bei 2400 rpm ohne Bremse für 3 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird nun dreimal mit dem Resuspensionspuffer A gewaschen (ohne Zusätze) und schließlich dreimal mit je 300µl Elutionspuffer eluiert.

2 x YT-G Medium	16 g Bacto-Trypton 10 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl in 900 ml H ₂ O gelöst, auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert Nach dem Abkühlen plus 100 ml 20% Glucose-Lösung
Resuspensionspuffer A:	50 mM Tris pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Zusätze:	10 mg/ml Leupeptin und Aprotinin 10 mM β-Mercaptoethanol 1 mM Benzamidin

Elutionspuffer:	50 mM Tris
	20 mM GSH pH 8.0
	10 µg/µl Leupeptin und Aprotinin
	1 mM Benzamidin

2.2.3.5.2 Detektion der GST-Fusionsproteine durch Silberfärbung

Je nach Größe der GST-Fusionsproteine wird ein 10-12%iges Proteingel gegossen und eine SDS-PAGE mit den Proben durchgeführt (→ 2.2.3.2). Nach Abtrennung des Sammelgels wird das Trenngel für 30 min in Fixierlösung 1 gelegt. Daraufhin folgt eine dreißigminütige Fixierung mit Lösung 2 und schließlich wird Fixierlösung 3 für zweimal 15 min auf das Gel gegeben. Nach einminütiger Inkubation mit der Oxidationslösung wird das Gel dreimal mit Aqua dest jeweils für 1 min gewaschen. Das Gel wird dann für 6 min mit der Silberlösung überschichtet und auf dem Schüttler inkubiert. Es folgen wieder 2 Waschschrte mit Aqua dest. Schließlich werden mit Zugabe der Entwicklerlösung für 1-10 min die ersten Proteinbanden sichtbar. Ist das Gel ausreichend gefärbt, wird es erneut mit Aqua dest gespült und die Färbereaktion 5 min mit Stopplösung beendet. Vor dem Trocknen wird das Gel mit 3% Glycerol für mind. 30 min eingeweicht und im Anschluss auf feuchtes Blotting-Papier gelegt, mit einer Klarsichtfolie abgedeckt und auf dem Vakuumtrockner für 2 Stunden bei einer Temperatur von 80°C getrocknet.

Fixierlösung 1:	Methanol 40%, Eisessig 10%
Fixierlösung 2:	Ethanol abs. 10%, Eisessig 5%
Fixierlösung 3	Ethanol abs. 10%
Oxidationslösung:	Natriumthiosulfat-Lösung 0,042%, Formaldehyd-Lösung 0,05%, frisch zubereitet
Silberlösung:	Silbernitratlösung 0,2%, Formaldehydlösung 37%, frisch zubereitet
Entwicklerlösung:	Natriumcarbonat 6%, Formaldehyd-Lsg. 0,05%, Natriumthiosulfat-Lsg. 0,042%, frisch zubereitet
Stopplösung:	Eisessig 3%

2.2.3.6 Baculovirus-Expressionssystem

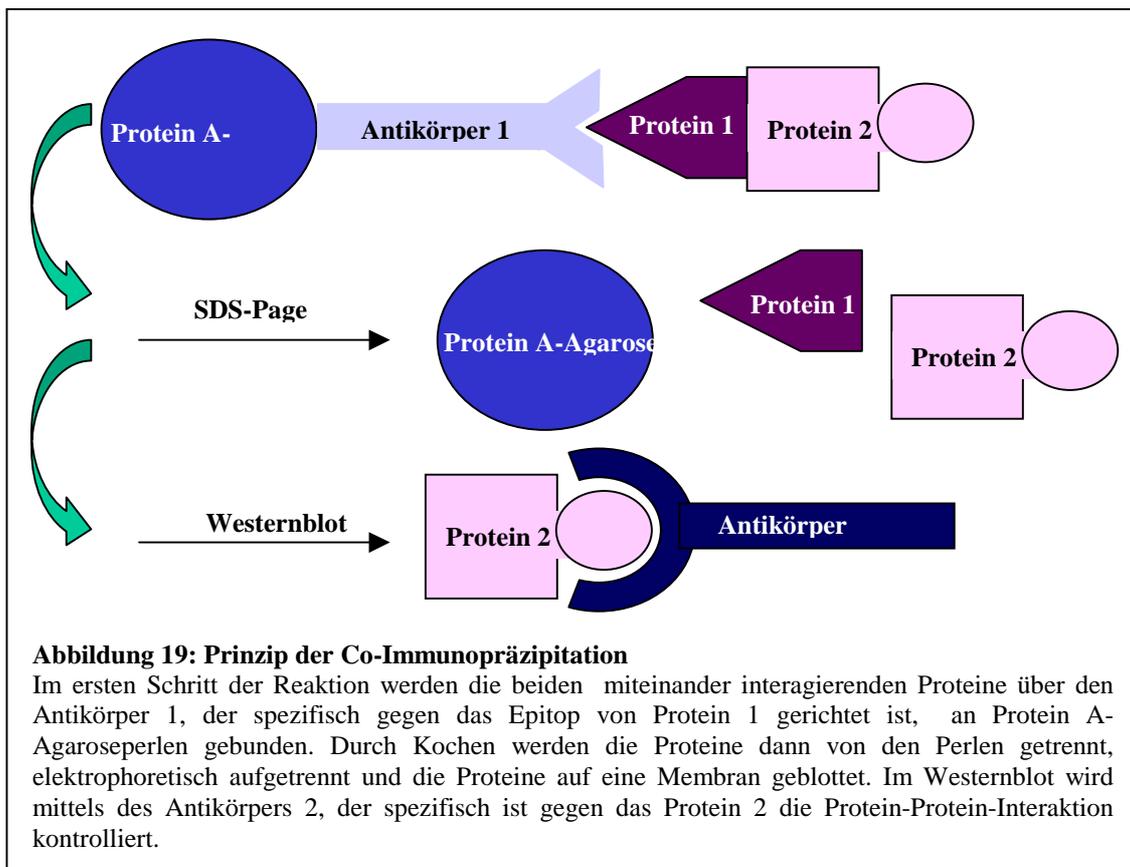
Mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystem lassen sich unterschiedliche Gene exprimieren¹³⁷⁻¹³⁹. Nach Transfektion von Sf9 Zellen, dies sind Zellen des Insekts *Spodoptera frugiperda*, durch Baculoviren, welche das gewünschte Gen tragen, werden die Zellen kultiviert und die Protein-exprimierenden Zellen selektioniert. Protein exprimierende Sf9 Zellen wurden von C. Weber (MSZ) zur Verfügung gestellt.

2.2.3.6.1 Gewinnung von Zelllysaten aus Sf9 Zellen

Baculovirus-infizierte Sf9-Zellen werden in 15 ml Greiner-Röhrchen umgefüllt, 3 Minuten bei 200 x g (1100 rpm) sedimentiert und mit 3 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wird nun in 1 ml PBS resuspendiert und die Suspension Eppendorfgläser überführt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 200 x g wird der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird dann in 1 ml Lysispuffer auf Eis resuspendiert und unter zwischenzeitlichem Vortexen 10 bis 15 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lysieren die Zellen. Es folgt ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g (14.000 rpm) und bei 4°C, um Zellmembranen und Kerne abzutrennen. Der Überstand wird für Westernblot- oder Co-Immunpräzitationsexperimente bei -20°C gelagert.

Lyse Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; 1 mM PMSF

2.2.3.6.2 Co-Immunpräzitations-Experimente



Mit Hilfe von Co-Immunpräzitations-Experimenten kann die Fähigkeit eines Proteins an ein anderes Protein zu binden nachgewiesen werden (z.B. Kinase/Substrat Interaktion). Abb. 16 verdeutlicht das Prinzip dieser Technik. 20 µl Protein A-Agarose werden in 80 µl Lyse-

Puffer in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt, 1 mg des Zellysates (photometrische Konzentrationsbestimmung) werden hinzugegeben und zusammen mit Antikörper 1 für 1 Stunde bei 4°C auf einem Rotarimischer inkubiert. In dieser Zeit bindet der Antikörper sowohl an sein spezifisches Epitop als auch an die Agaroseperlen und bildet so einen Komplex, der im nächsten Schritt durch einminütige Zentrifugation bei 150 x g (1500 rpm) sedimentiert wird. Dem Pellet wird 30 µl 2 x Lämmli-Puffer zugefügt und 5 Minuten gekocht. Nach einer folgenden Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit wird die Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt und in Westernblots auf co-präzipitierte Proteine untersucht.

2.2.3.6.3 Kinase-Assays

In Kinase-Assays können Phosphorylierungsereignisse und Aktivierungsprozesse von Kinasen untersucht werden. Proteinkinasen werden z.B. in Sf9-Zellen überexprimiert und co-exprimierte Regulatorproteine können Effekte auf sie ausüben. Nach der Zellyse und Präzipitation der Kinase können dann in vitro Substrate und radioaktiv markiertes ATP hinzugegeben werden. Je nach Aktivierungsgrad ist die Kinase in der Lage, das Substrat unter Verwendung des radioaktiven Phosphats zu phosphorylieren. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE kann der Phosphorylierungsgrad des Substrates im Röntgenfilm ausgewertet werden.

Die ersten Schritte bei einem Kinaseassay sind identisch mit denen der Co-Immunopräzipitation. Zellen werden lysiert und die gewaschenen Proteine mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Das Präzipitat wird zweimal mit 1 ml Lysepuffer und einmal mit 1 x Kinasepuffer gewaschen. Die Pellets werden dann mit 30 µl 2x Kinasepuffer, der die entsprechenden Substrate und pro Reaktion 10 µCi [γ^{32} P]-dATP enthält, vermischt und 15 Minuten bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran werden 30 µl Blaupuffer hinzugegeben und 5 Minuten bei 100°C gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgt durch SDS-PAGE. Nach dem Blotten auf Nitrozellulosemembranen werden sie mit Hilfe eines Röntgenfilmes exponiert und ausgewertet.

- Lysis Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM EDTA; 1% (v/v) NP40; 1mM PMSF
- 2x Kinase Puffer: 5 mM Hepes (pH 7,5); 50 mM β -Glycerophosphat; 3 mM EGTA; 10% Glycerol

Für die Kinase Reaktion werden frisch hinzugegeben:

1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 100 µM ATP

2.2.4 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.4.1 Hefe-Transformationen

- **Modifizierte Lithiumacetat Hefetransformation für direkte Interaktionstests**

Für eine Über-Nacht-Kultur wird eine Hefekolonie des Stammes Hf7c in 50 ml YEPD Medium inokuliert. Jeweils 1 ml dieser Zellkultur wird in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und 5 s in der Tischfuge zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ca. 50 - 100 µl verworfen. Der verbleibende Rest dient der Resuspension des Pellets. Nach Zugabe von 2 µl „carrier DNA“ (Salmon Sperm DNA; 10 mg/ml) und ca. 1 µg DNA (~ 1 - 3 µl) wird gut geschüttelt. Nun werden 0,5 ml PLATE-Mix und 20 µl DTT hinzugegeben und wiederum vermischt. Die Reaktionsgefäße werden anschließend für 6 - 8 h (höchste Transformationseffizienz nach 24 h) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C (10 min) können anschließend 200 µl Zellen in Bodennähe des Reaktionsgefäßes entnommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen werden. Die Inkubation erfolgt bei 30°C im Brutschrank für mindestens 3 Tage, bis Klone sichtbar werden (modifiziert von Elble et al.)¹⁴⁰.

- PLATE-Mixture: 45% PEG 4000 (steril filtriert); 1 M Lithiumacetat; 1 M Tris-Cl (pH 7,5);
0,5 M EDTA

- 1 M DTT 3,09 g DTT in 20 ml 0,01 M Natriumacetat (pH 5,2) lösen; steril filtrieren (0,22 µm)
und in 1 ml Aliquots bei -20°C aufbewahren

- **Hefetransformation für Two-Hybrid-Screen**

Je eine Hefekolonie, welche die Köder-DNA im Vektor pPC97 enthält, wird zu 4 x 2 ml SD Medium -Leu gegeben und 24-30 h im 30°C Wasserschüttler inkubiert. Die vier Reagenzgläser mit den gewachsenen Hefekulturen werden daraufhin auf drei 200 ml Kolben mit 200 ml SD Medium -Leu verteilt und 16-18 h im 30°C Wasserbad inkubiert. Das Wachstum der Zellen wird im Photometer bei 600 nm kontrolliert. Das Medium sollte eine Dichte von $OD_{600}=1,0-1,6$ haben. Die Medien werden nun mit YEPD bis auf eine $OD_{600}=0,35$ verdünnt, auf vier 1 l Kolben verteilt und 4 h bei 30°C und 230 rpm im Wasserschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 1000g (2300 rpm BECKMANN-Zentrifuge, 5 min) wird der Überstand verworfen, die Pellets in je 50 ml TE resuspendiert und erneut für 5 min zentrifugiert (Überstand erneut werfen). Für die Hefetransformation werden die Pellets nun in je 10 ml LiAc/TE-Mix resuspendiert, in 50 ml Falconröhrchen

überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig werden 4 x 2 ml Carrier-DNA für 5 min gekocht und danach sofort auf Eis gestellt. Zu dieser DNA werden je 4 x 600 µg Library-DNA (aus PC12-Zellen in pPC86) gegeben diese Suspension dann in 70 ml PEG/LiAc-Mix zusammengeführt. Danach wird die LiAc/TE-Suspension hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 x 8,8 ml DMSO und einem Hitzeschock bei 42°C (6 min) werden die Kolben auf 4°C abgekühlt, in einem Zentrifugenbecher zusammengeführt, für 5 min bei 2300 rpm zentrifugiert und mit 50 ml TE gewaschen. Nun wird die Probe zu 1 l YEPD gegeben, 1 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert, erneut zentrifugiert, in 50 ml TE gewaschen und letztendlich auf 20 ml in TE resuspendiert. Je 300 µl der Suspension werden auf 150 mm -Leu-Trp-His-Platten ausgestrichen, die mind. 3 Tage bei 30°C im Brutschrank inokuliert werden, bis Kolonien sichtbar sind. Zur Berechnung der Transformationseffizienz werden 1:1000, 1:100 und 1:10 Verdünnungen der Zellsuspension hergestellt und auf -Leu-Trp-Platten ausgestrichen (Transformationseffizienz für beide Plasmide). Zur Berechnung der Effizienz wird eine Platte mit 30-300 sichtbaren Kolonien herangezogen (modifiziert nach Clontech-Protokoll Version PR 57459)¹⁴¹.

$$\frac{cfu \cdot Total - Suspensions - Vol(\mu l)}{Vol. - ausplattiert(\mu l) \cdot Verd. \cdot DNA - Menge} = cfu / \mu g \text{ DNA}$$

Legende: cfu = „colony forming units“ (sichtbare Kolonien auf der Platte)

Total-Suspensions-Vol = gesamtes Volumen der Suspension

Vol.-ausplattiert = Volumen auf der Platte

Verd. = Verdünnungsfaktor

DNA-Menge = eingesetzte Library-DNA-Menge

cfu/µg DNA = gewachsene Kolonien pro eingesetzte DNA

Doppel-Dropout-Platten (-Leu -Trp)

Difco Hefe Stickstoffbasen ohne Aminosäuren: 8 g; Agar: 22 g; Tyrosin: 55 mg; Uracil: 55 mg; Adenin:
55 mg

→ autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen

→ 100 ml 20% Glucoselsg.

→ 10 ml „drop out“ Lösung ohne die AS Tryptophan und Leucin

Tripel-Dropout-Platten (-Leu -Trp-His)

Difco Hefe Stickstoffbasen ohne Aminosäuren: 8 g

Agar: 22 g

Tyrosin:	55 mg
Uracil:	55 mg
Adenin:	55 mg

→ autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen

→ 100 ml 20% Glucoselsg.

→ 10 ml „drop out“ Lösung ohne die AS Tryptophan, Leucin und Histidin

10 x TE: 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5 autoklaviert

10 x LiAc 1 M Lithiumacetat, pH 7,5, autoklaviert

40 ml 1 x TE-MIX: 4 ml 10 x TE
 4 ml LiAc 10 x

32 ml ddH₂O

70 ml PEG/LiAc-Mix

56 ml PEG 50%

7 ml LiAc 10 x

7 ml TE 50 x

2.2.4.2 β -Galaktosidase-Assay (lacZ Assay)

Dieser Versuch wird exakt nach dem CLONTECH Protokoll Version PR 57459 durchgeführt.

Für den β -Galaktosidase-Assay werden direkt gewachsene Kolonien der Hefetransformation gepickt und auf Tripel-Dropout-Platten ausgestrichen. Hierbei wird zunächst ein Nitrocellulosefilter (Hybond C extra; Amersham) auf den Agar aufgelegt und dann mehrere Klone nebeneinander ausgestrichen. Zur Kontrolle werden diese Klone außerdem auch auf Doppel-Dropout-Platten ausgestrichen. Diese Platten werden dann für ca. 2 Tage bei 30°C im Brutschrank kultiviert. Für den eigentlichen Test werden passgenaue, kreisrunde Whatman-Filter in Petrischalen gelegt und mit 1,5 ml Z-Puffer/X-Gal Lösung angefeuchtet. Nun werden die bewachsenen Nitrocellulosefilter mit einer Pinzette von den Tripel-Dropout-Platten abgehoben und in ein Bad aus flüssigem Stickstoff überführt (10 sec). Das nachfolgende Auftauen bei RT führt zur Permeabilisierung der Zellen. Daraufhin werden die Filter auf die vorbereiteten Whatman-Filter gelegt (Seite mit den Kolonien zeigt nach oben), mit Paraffinfilm verschlossen und bei 30°C inkubiert. In Abständen von 30 min werden die Filter auf blau gefärbte Kolonien hin untersucht. Inkubationszeiten länger als 24 h führen in der Regel zu falschpositiven Ergebnissen (s. Abb. 20).

Tripel-Dropout-Platten (-Leu -Trp -His)

Difco Hefe Stickstoffbasen ohne Aminosäuren: 8 g

Agar:	22 g
Tyrosin:	55 mg
Uracil:	55 mg
Adenin:	55 mg

→ autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen

→ 100 ml 20% Glucoselsg.

→ 10 ml „drop out“ Lösung ohne die AS Tryptophan, Histidin und Leucin

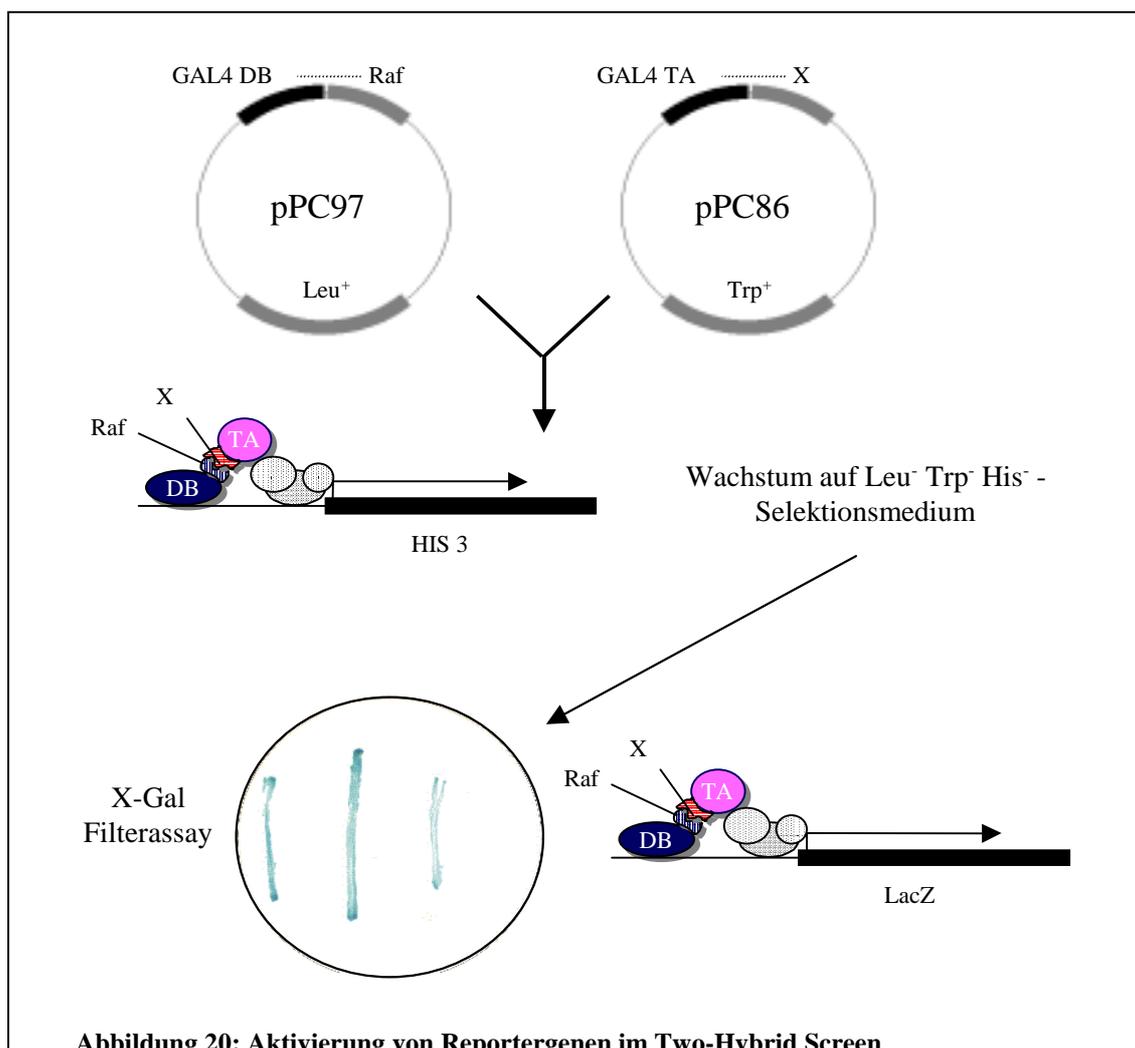


Abbildung 20: Aktivierung von Reportergenen im Two-Hybrid Screen

Die Two-Hybrid Vektoren pPC97 (DNA-Bindedomäne (DB) fusioniert mit den Raf Isoenzymen A-Raf oder c-Raf) und pPC86 (Aktivierungsdomäne (TA) fusioniert mit der PC12 cDNA-Bibliothek) werden in den Bierhefe-Stamm Hf7c sequentiell transformiert und auf $-Leu/-Trp/-His$ -Tripel-Dropout Kulturplatten ausgestrichen. Das Fehlen der Aminosäuren Leucin und Tryptophan dient der Selektion solcher Hefezellen, die beide Plasmide aufgenommen haben. Der Mangel an Histidin selektiert für interagierende Proteine, die den Transkriptionsfaktor Gal4 rekonstituieren und damit das erste Reportergen His3 aktivieren. Somit zeigen nur Kolonien Wachstum, welche beide Plasmide enthalten und deren exprimierte Proteine miteinander in Wechselwirkung treten. Zur Erhöhung der Spezifität (auf dieser Ebene treten viele Falsch-Positive auf) wird in einem anschließenden X-Gal-Filterassay zusätzlich die Aktivität des zweiten Reportergens, des LacZ-Gens (β -Galactosidase) bestimmt. Hierbei führt die Transkription und damit die Aktivität der β -Galactosidase zur Blaufärbung der entsprechenden Kolonien durch Umsetzung des chromogenen Substrates X-Gal.

Z-PufferNa₂HPO₄ · H₂O 16,1 g/lNaH₂PO₄ · H₂O 5,50 g/l

KCl 0,75 g/l

MgSO₄ · H₂O 0,25 g/l

auf pH 7 einstellen und autoklavieren; bei RT aufbewahren

X-Gal Stocklösung

X-Gal wird mit einer Konzentration von 20 mg/ml in DMF gelöst; lichtgeschützt und

bei -20°C aufbewahren

Z-Puffer/X-Gal Lösung

100 ml Z-Puffer; 0,27 ml β-Mercaptoethanol; 1,67 ml X-Gal Stocklösung

2.2.4.3 Hefe-Kolonie-Hybridisierung ("Yeast-Colony-Hybridization")

Der Hefe-Kolonie-Hybridisierungs-Test dient dazu, bekannte Interaktionspartner von Raf zu identifizieren und somit die Anzahl der positiven Klone nach dem β-Galaktosidase Assay (→ 2.2.4.2) bei einem Two-Hybrid-Screen zu verringern (modifiziert nach „Methods in Yeast Genetics“)¹⁴². Grundlage dieses Tests ist die Aufspaltung der Hefe-Zellwände mit Glucanex^(c)¹⁴³, die Denaturierung der DNA-Stränge mit NaOH und anschließend eine irreversible Anheftung an eine Nitrocellulose-Membran, um eine Renaturierung der DNA-Stränge zu verhindern. Derartige Kolonien können mit radioaktiv markierten DNA-Sonden bekannter Interaktionspartner von Raf hybridisiert und mittels Autoradiographie oder Phosphoimager sichtbar gemacht werden (→ 2.2.2.11).

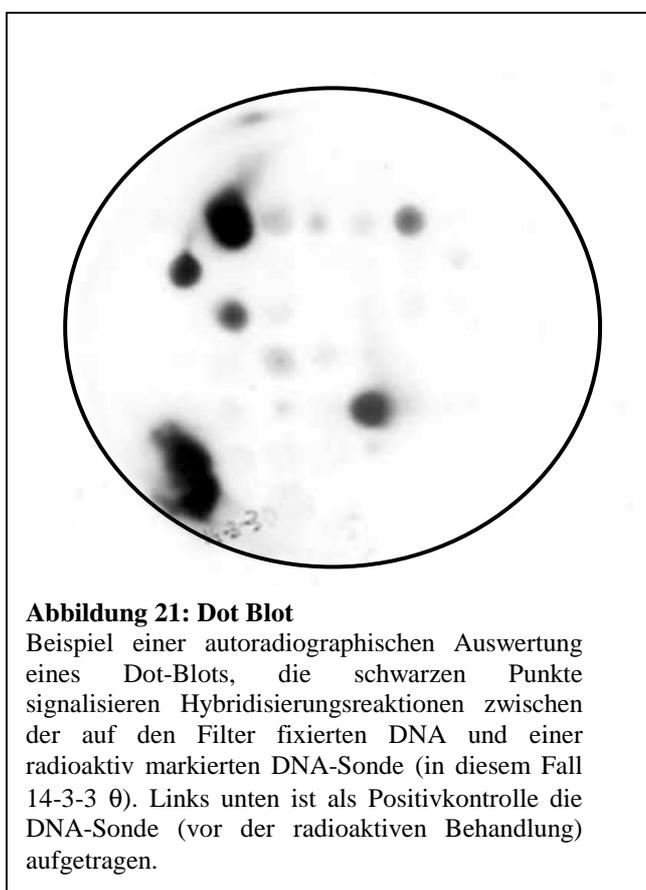
- **Vorbereitung der Filter**

Die zu untersuchenden Kolonien werden mittels einer Schablone auf –Leu-Trp-Platten übertragen und zwei Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Nun wird ein Nitrocellulose Filter „Hybond Super“ auf den Agar mit den Kolonien gelegt, sanft angedrückt, wieder abgezogen und mit der Kolonieseite nach oben auf eine frische YEPD-Platte gelegt. 12-18 Stunden wird die Platte bei 30°C im Brutschrank inkubiert (cave: Plasmidverlust bei längerer Bebrütungsdauer), der Filter wird dann kurz an der Luft getrocknet und für 15 min in SCEM-Puffer eingelegt. Danach wird der Filter zum Aufbruch der Zellwände in eine 1,5 ml SCEM + Glucanex (10 mg/ml) Lösung über Nacht eingelegt und am nächsten Tag der Aufbruch der Zellwände unter dem Lichtmikroskop (in 5% SDS) kontrolliert. Nach kurzer Lufttrocknung werden die DNA-Stränge auf dem Filter durch 0,5 N NaOH denaturiert (7 min). Die Filter werden durch zweimalige Behandlung mit 0,5 Tris pH 7,5/SSC 10 x für 4

min und einer einmaligen Behandlung mit zweifach SSC für 2 min neutralisiert. Im UV-Crosslinker wird die DNA schließlich auf dem Filter fixiert und kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

- **Dot Blot**

Die Hybridisierungsreaktion wird mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt. Die Filter werden zur Vorbehandlung in geeignete Hybridisierungsröhren gegeben und im Prähybridisierungspuffer (15 ml) für eine Stunde bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Hierdurch wird die Membran abgesättigt und unspezifische Bindungen werden



verhindert. Währenddessen wird zu der radioaktiv markierten Sonde 1/10 Volumen 1N NaOH zur Denaturierung der DNA-Stränge gegeben und für 10 min. inkubiert. In die Hybridisierungsröhren wird nun neuer Prähybridisierungspuffer (15 ml) eingefüllt und die radioaktiv markierte Sonde hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Hybrid-Ofen. Um nicht hybridisierte, radioaktive Sonden von den Filtern abzuwaschen, wird die Hybridisierungslösung zuerst abgossen, dann der Filter zunächst mit Waschlösung 1 behandelt, und danach einmal mit Waschlösung 1 für 20 min bei 65°C im Ofen inkubiert, daraufhin zweimal mit Waschlösung 2 für 20 min bei 65°C. Nach dieser Behandlung wird der

Filter getrocknet und auf Whatman-Papier fixiert. Mittels Phosphoimager-Platte (Fuji) wird der Versuch ausgewertet. Hierzu wird ein geeigneter Film auf den Filter in eine Kassette gelegt, 10 min exponiert und am Computer ausgewertet. Alternativ kann der Film auch 2 Tage bei -80°C mit einem Röntgenfilm exponiert werden.

SCEM: 0,9 M Sorbitol, 50 mM EDTA, 100 mM $\text{Na}_3\text{-Citrat}$, 14 mM $\beta\text{-Mercaptoethanol}$

SSC 20 x: 3 M NaCl, 0,3 M $\text{Na}_3\text{-Citrat}$, pH 7

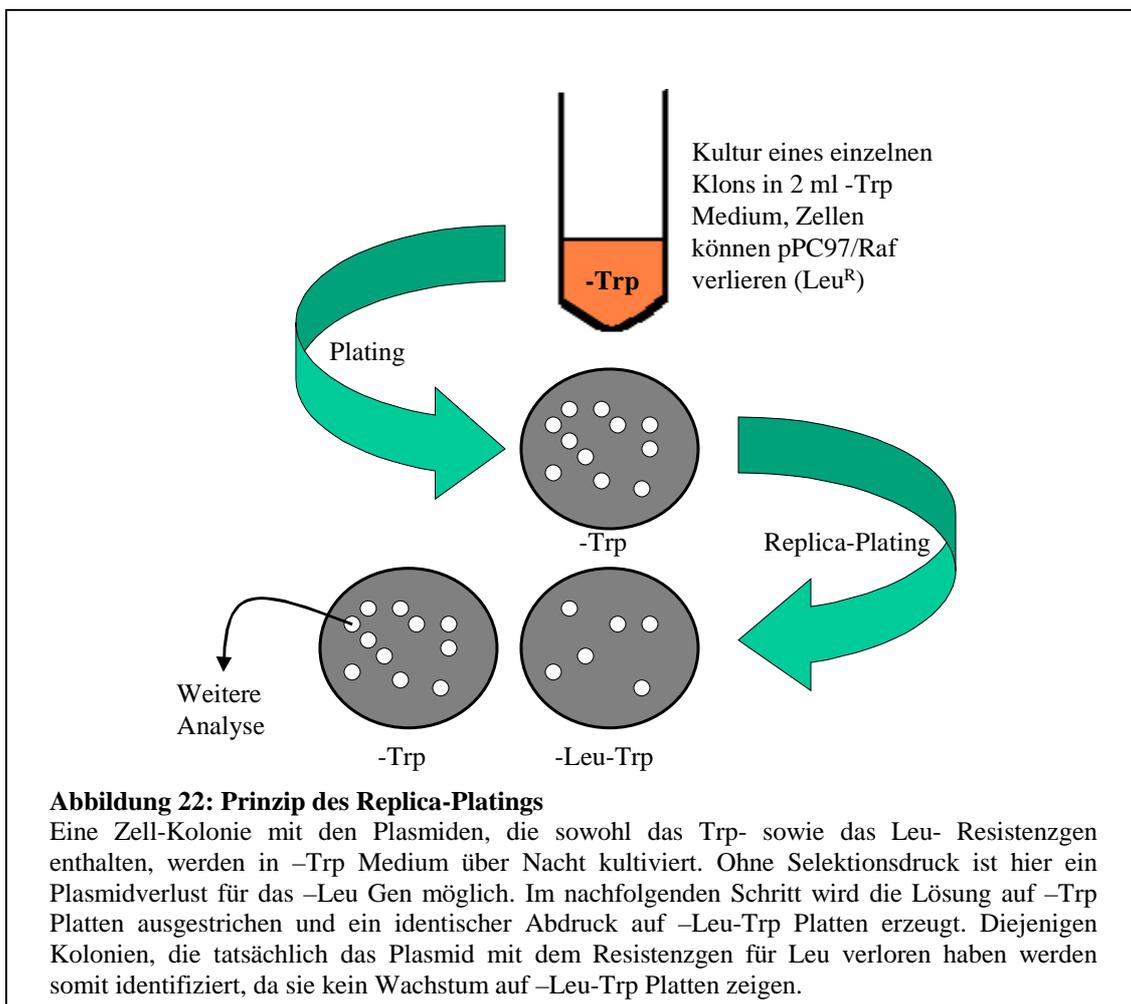
Prähybridisierungspuffer: 0,5 M Phosphatpuffer; 7% SDS, 1 mM EDTA

Waschlösung 1: 40 mM Phosphatpuffer, 5% SDS, 1 mM EDTA

Waschlösung 2: 40 mM Phosphatpuffer, 1% SDS, 1 mM EDTA

2.2.4.4 Replica-Plating mit Hefe-Kolonien

Dieses Verfahren soll das Plasmid pPC97/Raf aus der Hefezelle entfernen, um bei der nachfolgenden Plasmidextraktion aus Hefe nur das Library-Plasmid zu extrahieren. Dazu wird eine einzelne Kolonie in 2ml $-\text{Trp}$ -Medium bei 30°C im Wasserbadschüttler inkubiert,



so dass die Hefezellen das pPC97-Plasmid verlieren können, da sie auf das Resistenzgen (Leu^R) nicht mehr angewiesen sind. Das Zellwachstum wird in der Zählkammer unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Lösung wird solange mit TE verdünnt, bis eine Zellkonzentration von 500-2000 Zellen/ml eingestellt ist. Von dieser Suspension werden 200 μl auf $-\text{Trp}$ Platten ausgestrichen und 2-4 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert, bis große Kolonien sichtbar sind. Die Platte mit den Kolonien wird nun auf einen Stempel mit einem sterilen Samttuch angedrückt, so dass Kolonien auf dem Tuch verbleiben. Diese Kolonien werden auf eine $-\text{Leu-Trp}$ -Platte übertragen, indem diese ebenso auf den Stempel angedrückt wird. Beide Platten werden 1-2 Tage bei 30°C inkubiert und dann die Kolonien miteinander verglichen (siehe Abb. 19). Zur weiteren Analyse wird jene Kolonie gepickt, welche Wachstum auf der $-\text{Trp}$ -Platte, jedoch nicht auf der $-\text{Leu-Trp}$ -Platte zeigte (kein Leu -Resistenzgen mehr vorhanden) und die Plasmid-Extraktion wird durchgeführt.

2.2.4.5 Plasmid-Extraktion aus der Hefe

Eine Hefekolonie wird in SD-Medium $-\text{Trp}$ (1,5 ml) über Nacht bei 30°C im Wasserbadschüttler inkubiert, für 10 sec. auf der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird anschließend in 100 μl STET Puffer aufgenommen und ein gleiches Volumen von in Säure gewaschenen Glasperlen hinzugefügt. Für 5 min wird das Reaktionsgefäß auf dem Vibrax-Vortexer geschüttelt und weitere 100 μl STET Puffer werden zugefügt. Die Lösung wird daraufhin 3 min lang gekocht, kurz auf Eis gestellt und für 10 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert (4°C). Der Überstand wird zu 50 μl 7.5 M Ammoniumacetat hinzugefügt und 30 min bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Es wird daraufhin nochmals für 10 min zentrifugiert, der Überstand wird zu 400 μl 100% Ethanol gegeben. Nach Zentrifugation (10 min) wird der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 20 μl TE aufgenommen.

- Lysis Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 137 mM NaCl; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA; 25 mM Natriumpyrophosphat x $10\text{H}_2\text{O}$; 50 mM Natriumglycerophosphat; 10% Glycerin; 1% Triton X-100

Vor der Verwendung des Puffers werden jeweils die folgenden Proteaseinhibitoren hinzugefügt:

50 mM Natriumfluorid; 1 mM Benzamidin; 1 mM Natriumvanadat; 1 mM PMSF; 5 mM Aprotinin; 4 $\mu\text{g}/\text{m}$ Leupeptin; 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ Pepstatin A; 118 μM TLCK; 242 μM TPCK; 0,1% β -Mercaptoethanol

- 2x Kinase Puffer:

25 mM Hepes (pH 7,5); 25 mM β -Glycerophosphat; 1,5 mM EGTA; 5% Glycerin

Für die Kinase Reaktion werden frisch hinzugegeben: 1 mM DTT; 10 mM MnCl_2 ; 100 μM ATP

Kapitel 3

ERGEBNISSE

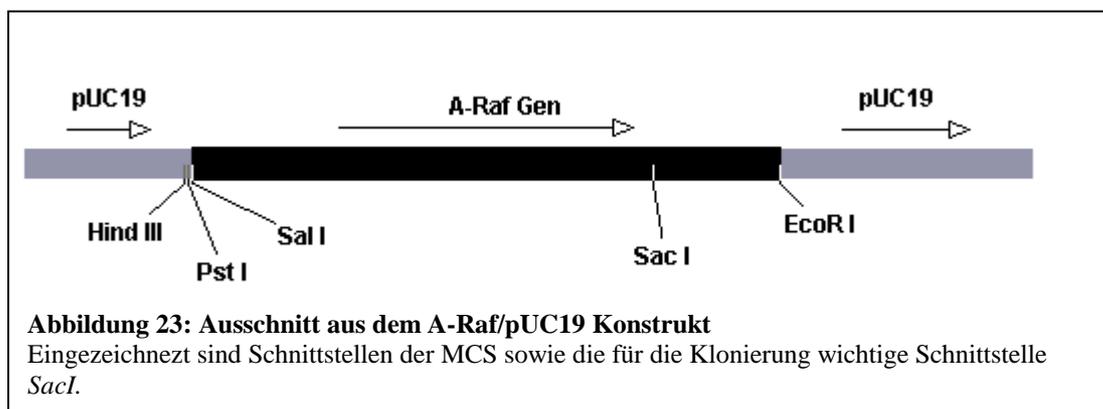
3.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Expressionssystem

3.1.1 Konstruktion von *S. cerevisiae*-Expressions-plasmiden

Für die geplanten Two-Hybrid-Experimente wurden folgende Gene in die Multiple-Cloning-Region des Vektors pPC97 subkloniert: A-Raf K336M, c-Raf K375W und c-Raf K375R. Diese Varianten besitzen Mutationen in ihren ATP-Bindungsstellen, was zu einem Verlust der Kinaseaktivität führt³². Ziel der Versuche sollte es sein, die Stärke der Bindung zu bekannten Interaktionspartnern zu untersuchen.

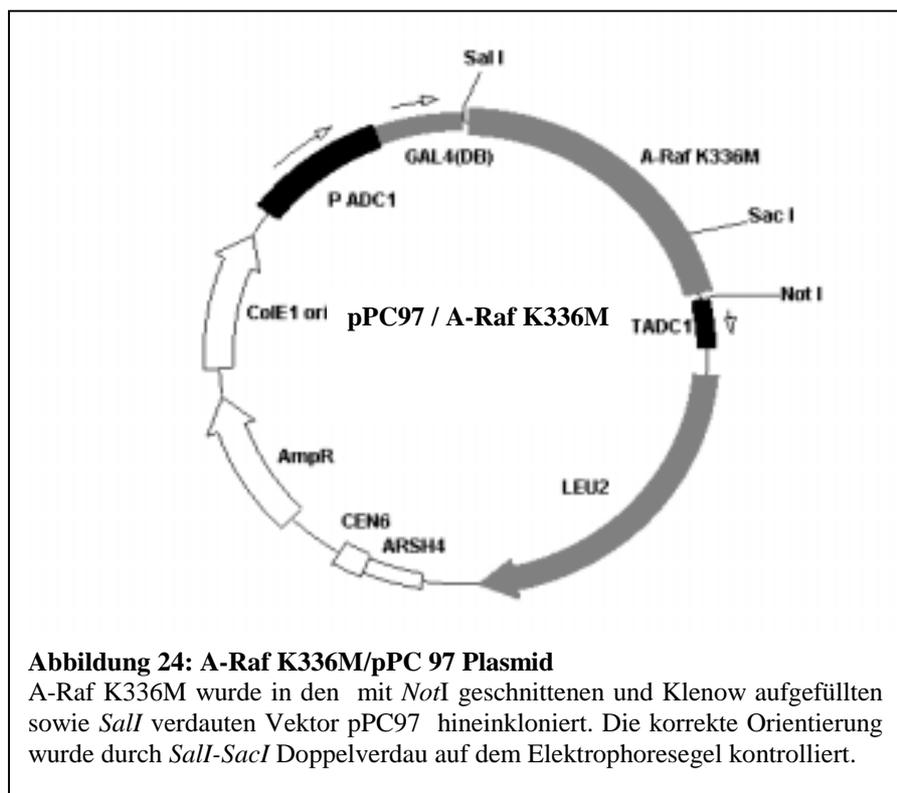
3.1.1.1 Herstellung eines A-Raf K336M – pPC97 – Konstruktes

Ausgangskonstrukt für die K336M-Mutation (Herkunft: MSZ) war das A-Raf/pUC19-Konstrukt von Carsten Hagemann (siehe Abb. 23). Im Gegensatz zum Wildtyp ist hier Lysin



an der ATP-Bindungsstelle bei AS 336 durch Methionin ersetzt. Das A-Raf-Konstrukt wurde mit *EcoRI* verdaut, mit *Klenow*-Fragment aufgefüllt und mittels einer zweiten Verdaureaktion mit *SalI* aus dem Vektor herausgeschnitten und aus dem Gel isoliert. Der Vektor pPC97 wurde mit *NotI* geschnitten, mit *Klenow*-Fragment aufgefüllt und dann mit *SalI* erneut verdaut und aus dem Gel isoliert. Der Vektor wurde daraufhin dephosphoryliert und die Mutante schließlich in das Plasmid ligiert (siehe Abb. 24). Die nach Transformation von DH5 α ampicillinresistenten Kolonien wurden im 1,5 ml Maßstab aufgezüchtet, Plasmid-DNA

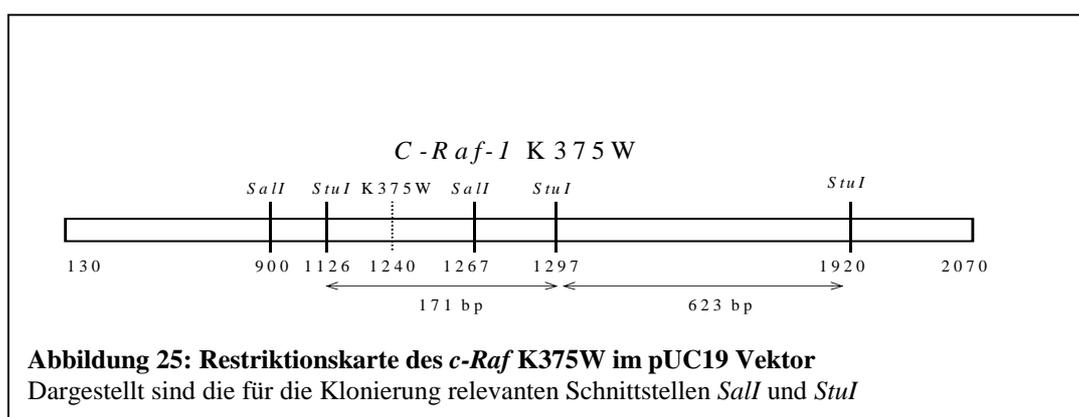
präpariert und die Ligation und Orientierung von A-Raf K336M durch Restriktionsverdau



mittels Doppelverdau *SalI* - *SacI* kontrolliert.

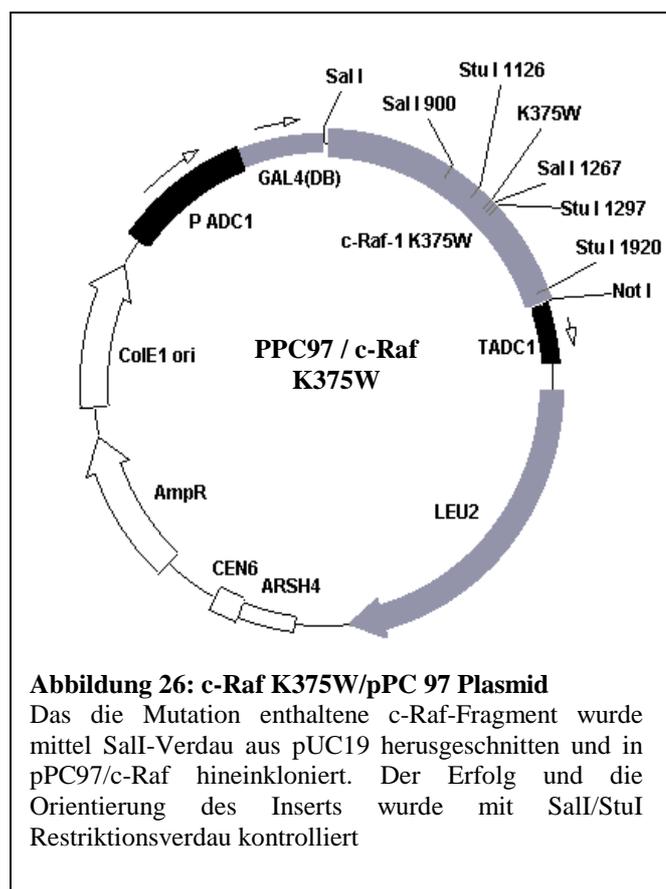
3.1.1.2 Herstellung eines c-Raf-1 K375W – pPC97 – Konstruktes

Ausgangskonstrukt für die K375W-Mutation (Herkunft: MSZ) war das c-Raf-1/pUC19



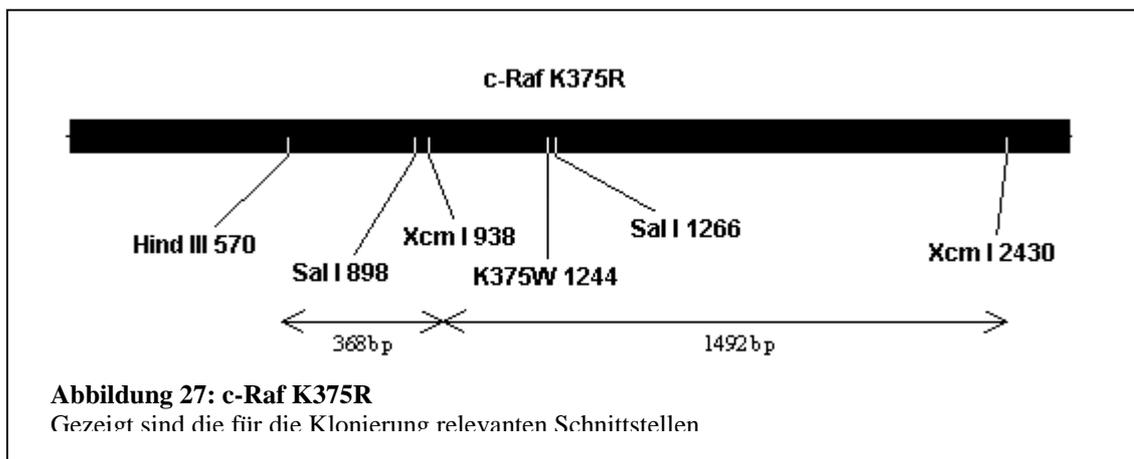
Konstrukt (Herkunft: MSZ, Abb. 25). Die Region der Mutation wird flankiert von zwei *SalI*-Schnittstellen. Somit wird mittels *SalI*-Verdau ein 300 bp-großes Bruchstück aus pUC19 isoliert, welches die Mutation trägt. C-Raf-1-pPC97 (Herkunft: MSZ) wird ebenso mit *SalI* geschnitten und der Vektor isoliert und dephosphoryliert. Es schließen sich die Ligation des *SalI*-Bruchstückes aus dem pUC19-Vektor mit dem pPC97 Vektor, die Transformation von

DH5 α ampicillinresistenten Kolonien, die Aufzuchtung im 1,5 ml Maßstab und die Plasmid-DNA Préparation an. Den Erfolg der Ligation und die Orientierung des Inserts wird durch Restriktionsverdau mittels *SalI* und *StuI* kontrolliert (Abb.26).



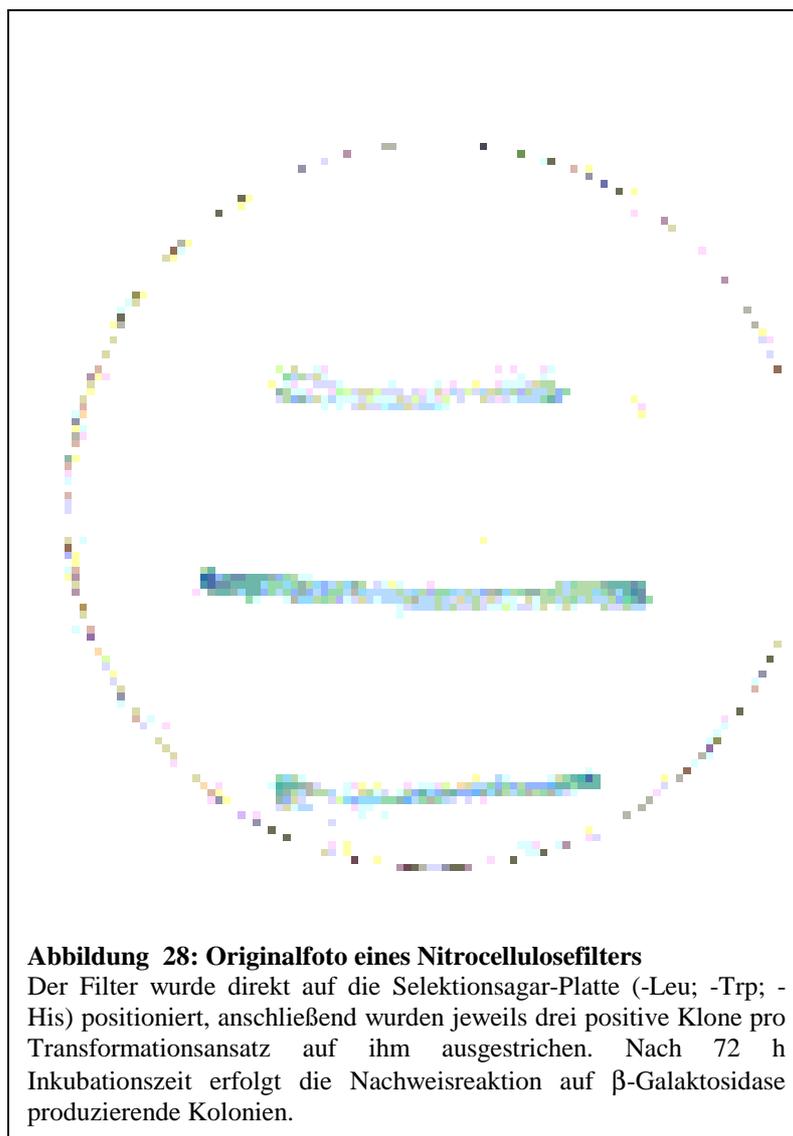
3.1.1.3 Klonierung von pPC97 c-Raf K375R

Zur Herstellung des pPC97/c-Raf K3375R-Konstrukts wurde im pBluescript/c-Raf-Plasmid die Aminosäure 375 (Lysin: AAG) zu Arginin (AGG) mutiert. Dazu wurden die Primer CR9 und CRa11 verwendet. Der Erfolg der Mutation wurde durch Sequenzierung von 6 Minipreps kontrolliert. Von dem positiven Klon wurde eine Maxiprep angefertigt und daraufhin das Teilstück, welches die Mutation trägt, in pPC97/c-Raf auf folgende Weise hineinkloniert: pBluescript/c-Raf K375R. wurde mit *SalI* verdaut (preparativer Maßstab), das Teilstück mit der Mutation isoliert und in den pPC97/c-Raf-Vektor ligiert, nachdem auch dieser mit *SalI* geschnitten und isoliert worden war. Nach Transformation von E.Coli und DNA-Préparation wurde die Ligation und Orientierung von c-Raf K375R durch Restriktionsverdau mittels Doppelverdau *XanI* und *HindIII* kontrolliert (siehe Abb. 27).



3.1.2 Two-Hybrid Test mit Raf-Mutanten

Die in ihrer ATP-Bindungsstelle veränderten Raf-Konstrukte sollten die Kinaseaktivität verloren haben und damit eine stärkere Bindung zu Substraten zeigen^{144,145}. Da die



Bindungsstärke von Interaktionspartnern mit der Intensität der Blaufärbung im Two-Hybrid-Test korreliert¹¹⁸, wurden Two-Hybrid-Tests mit den Raf-Mutanten und physiologischen Interaktionspartnern im Vergleich zu den Raf-Wildtypen durchgeführt, um eine möglicherweise stärkere Blaufärbung bei den Mutanten zu entdecken. Ziel des Tests sollte weiterhin sein, Erkenntnisse über das allgemeine Bindungsverhalten von Raf zu Interaktionspartnern und den möglichen Verlust der Bindung durch Zerstörung der Tertiärstruktur zu erhalten. Zur Durchführung des Experiments wurden die entsprechenden Plasmide in den Hefestamm Hf7c transformiert und nachfolgend der LacZ-Assay durchgeführt (Abb. 28). Tabelle 1 zeigt das Ergebnis des Experiments. Wie erwartet zeigte sich keine Wechselwirkung mit dem leeren Plasmid pPC86, mit den physiologischen Interaktionspartnern zeigte sich jedoch eine bedeutend schwächere Wechselwirkung der

pPC97 – DNA-Bindedomäne

verschiedenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Insbesondere erfolgte beim

pPC86 – Transaktivierungs- domäne

	A-Raf	A-Raf K336M	c-Raf-1	c-Raf-1 K375R	c-Raf-1 K375W
leerer Vektor	-	-	-	-	-
Ras	++	-	++	++	+
MEK 1 (Hase)	+	-	+	-	-
14-3-3 β	++	-	+++	++	-
Ck2 β	++	+	-	n.d.	n.d.

Tabelle 1: Ergebnisse des Two-Hybrid-Tests

Die β -Galactosidase Aktivität (LacZ) bedeutet +++ blaue Kolonien innerhalb ½ h, ++ blaue Kolonien innerhalb 2 h, + blaue Kolonien innerhalb 4 h, - keine Blaufärbung erkennbar, n.d. nicht durchgeführt

Substratbindungstest zwischen Raf und MEK keine Blaufärbung. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise mit der Störung der Tertiärstruktur durch die Mutationen erklären, welche die Bindungsaffinität zu Interaktionspartnern abschwächt.

Da aufgrund dieser Ergebnisse keine erhöhte Wahrscheinlichkeit bestand, bei einem Screen mit diesen „Kinase-toten“-Raf-Mutanten Substrate zu fischen, wurde ein Two-Hybrid Screen

mit Wild-Typ A-Raf als Köder durchgeführt, da die Erkenntnisse über dieses Isoenzym noch relativ gering waren und es verschiedene Hinweise auf Isoenzym-spezifische A-Raf-Wirkungen gab^{146,147}. Im Anschluss in diesen Screen folgte ein weiterer Two-Hybrid-Screen mit c-Raf als Köder-Protein. Isozymspezifische Unterschiede zu A-Raf sollten hier näher untersucht werden.

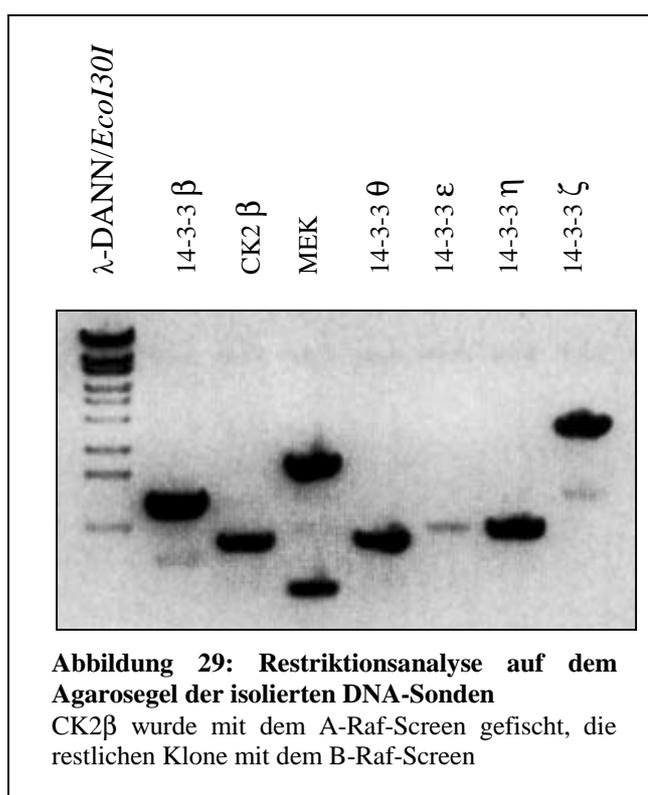
3.2 Two-Hybrid-Screen mit A-Raf als Köder-Protein

3.2.1 Hefe-Transformierung und β -Gal-Assay

Der Hefestamm Hf7c wurde sequentiell zuerst mit pPC97/A-Raf (1-606) und daraufhin mit der DNA aus der PC12 Bibliothek (pPC86/pPC12) transformiert. 650 gewachsene Kolonien wurden auf neue Tripel-Dropout-Platten ausgestrichen und nach einem Tag die Aktivierung des lacZ Reporter-Gens im β -Gal – Assay getestet. 85 Kolonien zeigten hier eine Blaufärbung. Deshalb wurde mit diesen Kolonien die Hefe-Kolonie-Hybridisierung durchgeführt um bereits bekannte Interaktionspartner von A-Raf zu erkennen und auszusortieren.

3.2.2 Herstellung der DNA-Sonden

Zur Herstellung der DNA-Sonden wurden gefischte Klone des B-Raf-Screens⁹¹ und des A-



Raf-Screens⁹² mit *EωRI* aus pPC86 herausgeschnitten und isoliert. Abbildung 29 zeigt das Agarosegel mit den isolierten Banden. Hierbei ist zu beachten, dass die Größe der Banden nicht mit der Größe der Gene übereinstimmen muss, da bei einem Two-Hybrid-Screen oftmals nur Genfragmente „gefischt“ werden. Die Sonden wurden radioaktiv markiert und die Kolonie-Hybridisierung durchgeführt.

Sonde	14-3-3β	CK2β	MEK	14-3-3θ	14-3-3ζ	14-3-3ε/η
Anzahl	3	25	1	5	6	9

Tabelle 2: Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Fünf Filter wurden hybridisiert, wovon 14-3-3 ε und η mit je einem Filter behandelt wurden.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis der Koloniehybridisierung. Die Kolonien, die sich nicht hybridisieren ließen, d.h. durch dieses Experiment nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden mittels „Replica-Plattieren“ weitergehend untersucht. Es wurde jeweils diejenige Kolonie von der –Trp – Platte gepickt und auf einer neuen –Trp – Platte ausgestrichen, welche nach „Replica-Plattierens“ auf der –Leu-Trp-Platte kein Wachstum mehr zeigte. Das fehlende Wachstum auf der Doppeldropout-Platte zeigte den pPC97-Plasmidverlust an. Mit den neu ausgestrichenen Kolonien wurde nochmals ein β-Gal-Assay durchgeführt, um Kolonien herauszufiltern, die Plasmide enthielten, die ohne Interaktionspartner Blaufärbung zeigen (falsch Positive). Bei diesem Test zeigte eine einzige Kolonie eine Blaufärbung. Die übrigen Kolonien wurden mit Plasmidextraktion aus Hefe weiter behandelt, ultrakompetente E.Coli mit dieser DNA transformiert und aus den Bakterien Plasmid-DNA im Miniprep-Maßstab isoliert, da isolierte Hefe-Plasmid-DNA zur Sequenzierung nicht geeignet ist. Mit dieser Mini-Prep-DNA wurde der Hefestamm HF7c mit pPC97/A-Raf, pPC97/B-Raf und pPC97/c-Raf für direkte Interaktionstest retransformiert und der β-Gal-Assay mit allen Raf-Isoformen durchgeführt um die weiteren falsch-Positiven und eventuelle Isoenzympezifitäten zu erkennen. Die Mini-Prep-DNA derjenigen Kolonien, die bei diesen Re-transformationstests Blaufärbung zeigten wurden anschließend sequenziert. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 dargestellt.

<i>Klon (pPC86)</i>	<i>Sequenzierergebnis</i>	<i>A-Raf (pPC97)</i>	<i>B-Raf (pPC97)</i>	<i>c-Raf (pPC97)</i>
4	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	++	-	-
6	14-3-3 ζ	++	++	++
7	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	+++	-	-
11	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	+	-	+
12		-	-	-
13	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	++	-	-
14	14-3-3 ζ	+++	+++	+
15	14-3-3 θ	++	++	++
16		-	-	-
17	14-3-3 θ	-	+++	++
19	14-3-3 β	+++	+++	++
21	14-3-3 β	++	+++	++
22	14-3-3 ζ	+++	+++	+++
23	14-3-3 θ	-	+++	+++
26	14-3-4 ϵ	+	-	-
37	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	++	-	-
38	14-3-3 ζ	++	++	++
39	14-3-3 β	+++	-	++
40	14-3-3 η	-	+++	++
43	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	++	-	-
45	c-Ras-H-2	+++	++	++
46		-	-	-
48		-	-	-
49		-	-	-
50	14-3-3 ζ	-	++	++
52	14-3-3 ζ	++	++	++
54	14-3-3 ζ	+++	+	++
55	MEK 2	++	++	++
57	MEK 2	++	++	+++
59	Prolyl 4-Hydroxylase α -Unter-einheit	+++	-	-
60	14-3-3 ζ	++	++	++
61	14-3-3 ζ	++	+++	++
63	14-3-3 ζ	++	+++	++
65	MEK 2	+++	+++	+++
68	14-3-3 ζ	+++	+++	+++
71	Pyruvatkinase M2	+++	-	-
72	14-3-3 ζ	+++	+++	++
74	14-3-3 ζ	++	++	++
76	14-3-3 θ	-	++	++
82		-	-	-

Tabelle 3: Ergebnisse der direkten Interaktionstests

Die β -Galactosidase Aktivität (LacZ) bedeutet: +++ blaue Kolonien innerhalb $\frac{1}{2}$ h, ++ blaue Kolonien innerhalb 2 h, + blaue Kolonien innerhalb 4 h, - Keine Blaufärbung feststellbar, Kolonien ohne Blaufärbung wurden nicht sequenziert.

3.3 Two-Hybrid-Screen mit c-Raf als Köder-Protein

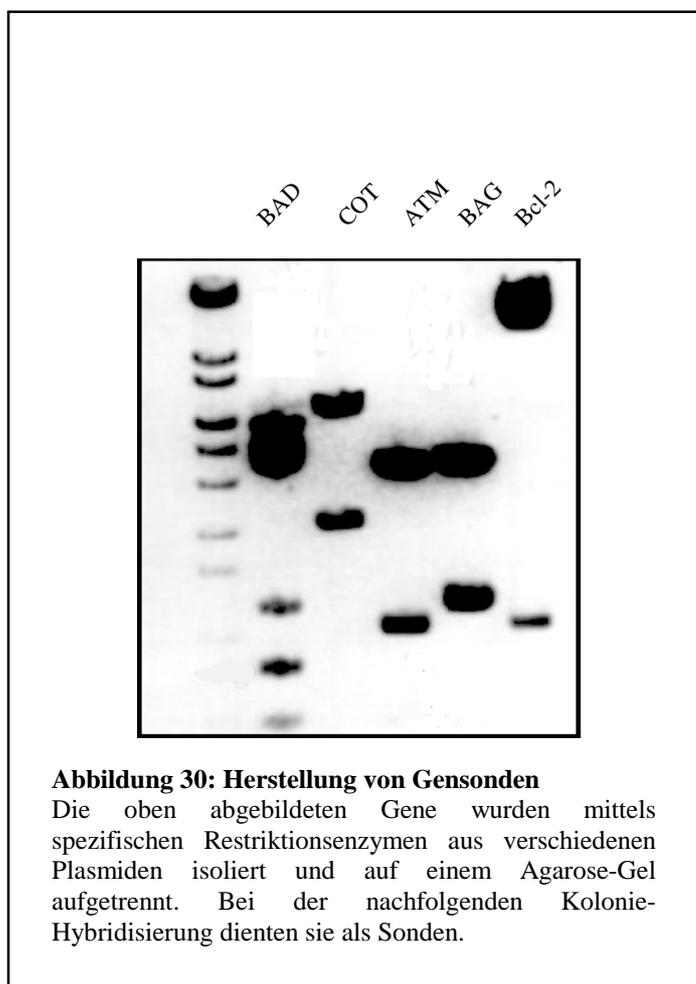
Der Two-Hybrid Screen mit c-Raf als Köder wurde analog dem A-Raf Screen durchgeführt. pPC97/c-Raf wurde für diesen Screen eingesetzt, dabei wurden 4×10^6 Klone dieser Bibliothek gescreent. Von den 237 identifizierten, Histidin-positiven Klonen waren 68 LacZ-positiv. Bei der folgenden Kolonie-Hybridisierung wurden 16 Klone als 14-3-3 β/ζ , 19 Klone als 14-3-3 $\eta/\theta/\epsilon$ und 1 Klon als MEK identifiziert. Die verbliebenen Klone wurden aus der Hefe extrahiert, in E-Coli transformiert und mit allen 3 Raf-Isoformen im direkten Interaktionstest untersucht. Hierbei zeigten 4 Klone keine Blaufärbung im Two-Hybrid-Test, erwiesen sich also als falsch-Positive, alle anderen Klone wurden sequenziert. Abb. 5 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der beiden Two-Hybrid-Screens.

Bibliothek	PC12	PC12
Köder	A-Raf	c-Raf
Gescreente Klone	$3,3 \times 10^7$	4×10^6
His+	650	237
LacZ+	85	68
c-Ras-H-2	1	-
MEK1	-	1
MEK2	3	-
14-3-3 β/ζ	22	16
14-3-3 ϵ/η	11	42
14-3-3 θ	7	5
CK2 β	26	-
Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit	7	-
Pyruvatkinase M2	1	-
Falsch-Positive	7	4

Tabelle 4: Zusammenfassendes Ergebnis der beiden Two-Hybrid-Screens

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass sich in Bezug auf c-Raf keine neuen Erkenntnisse bezüglich möglicher neuer Interaktionspartner ergaben. Die weiteren Untersuchungen bedienten sich deshalb der neu entdeckten Interaktionspartner des A-Raf Screens.

3.4 Sensitivität der direkten Two-Hybrid-Tests



In den durchgeführten Two-Hybrid-Screen wurden positive Klone isoliert, welche nach Retransformation in Hf7c bei direkten Interaktionstests mit allen drei Raf-Isoformen keine Blaufärbung mehr zeigten. Aus dieser Beobachtung heraus und der Kenntnis, dass es mit dem pPC-System ist es bisher nicht gelungen war, eine Interaktion zwischen c-Raf und Bcl-2 oder BAG-1 nachzuweisen, obwohl diese mit dem pGilda-System nachgewiesen werden konnten¹¹⁸, ergaben sich folgende Fragen:

1. Ist die Sensitivität der β -Gal-Assays im Two-Hybrid-Screen größer als bei direkten Interaktionstests oder handelt es sich bei diesen Klonen um falsch-Positive?
2. Entsprechen diese Klone möglicherweise jenen, die mit Hilfe von anderen Two-Hybrid-Systeme isoliert werden konnten?

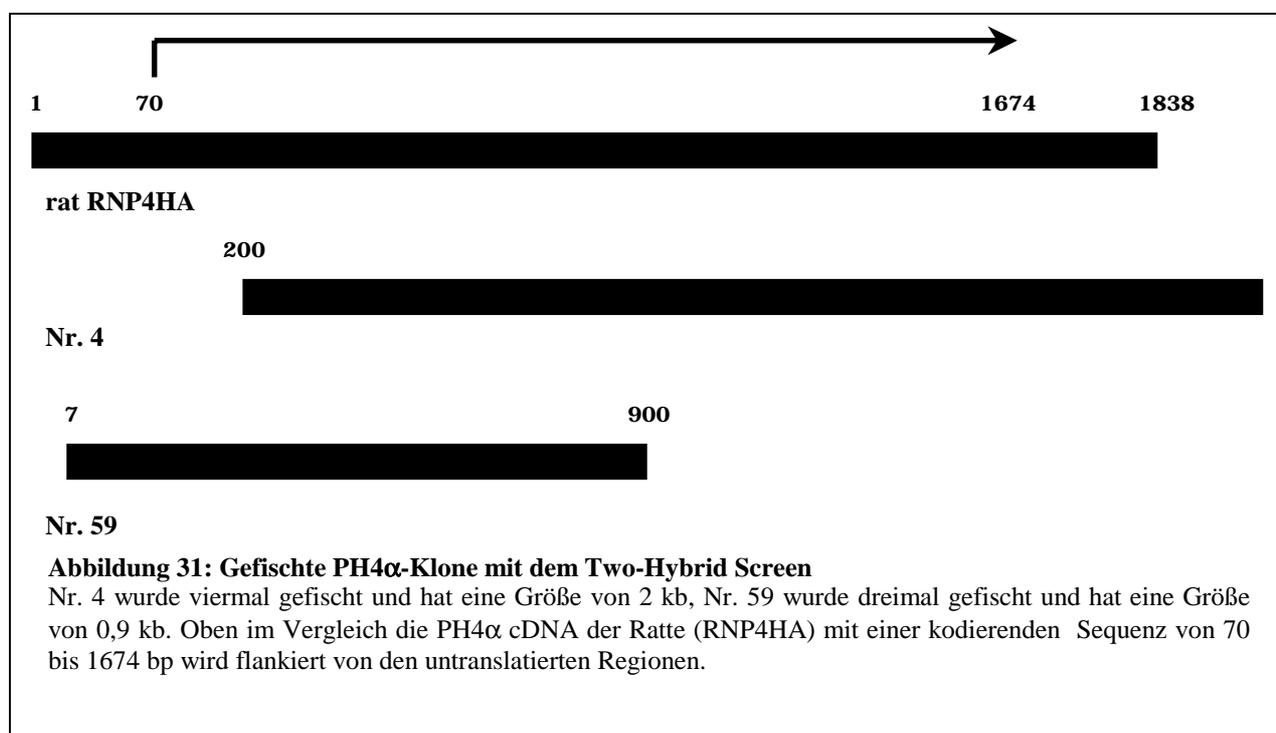
Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die falsch-Positiven Klone der Screens weiter analysiert. Sie wurden für Hybridisierungsversuche mit folgenden Sonden verwendet: Bad,

Cot, ATM, Bag-1 und Bcl-2. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktionskaskade. Bei Bcl-2 und Bag-1 wurde eine direkte Interaktion mit c-Raf-1 im Two-Hybrid-Test nachgewiesen¹⁴⁸, Cot, Bad und ATM stehen in unmittelbarer Verbindung zu C-Raf¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Für diesen Versuch wurden jene 10 Klone des Screens mit den o.g. Sonden hybridisiert, welche nach Retransformation in E-Coli und anschließenden β -Gal Assay mit den drei Raf-Isozymen keine Blaufärbung zeigten. Die Ergebnisse der Hybridisierung und des anschließenden Dot-Blots zeigten jedoch keine positiven Kolonien. Weder konnten die Daten von Wang et al.¹⁴⁸ mittels Koloniehybridisierung reproduziert noch neue Interaktionspartner mit diesem System detektiert werden. Es muss also davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen 10 Klonen tatsächlich um falsch-Positive handelt.

3.5 Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit

Der Two-Hybrid Screen einer PC12 Bibliothek mit A-Raf brachte als einen neuen Interaktionspartner die Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit hervor. Prolyl 4-Hydroxylase ist ein Schlüsselenzym der Kollagensynthese. Es katalysiert die Bildung von 4-Hydroxyprolin



durch Hydroxylierung bestimmter Prolinreste im rauhen endoplasmatischen Retikulum. Sequenzanalysen der gefischten PH4 α Klone ergaben das in Abb. 31 dargestellte Bild. Beim Vergleich mit dem Gen der Ratte¹⁵² wird deutlich, dass die Interaktionsdomäne zwischen den

Basenpaaren 200 und 900 liegen muss, da beide Klone im direkten Interaktionstest Blaufärbung zeigten. Bei den gefischten Klonen handelte es sich allerdings nicht um full-length-Klone.

pPC97 – DNA-Bindedomäne

		A-Raf	A-Raf (1-261)	A-Raf (255-606)	B-Raf	c-Raf
PPC86 – Transaktivierungs- domäne	leerer Vektor	-	-	-	-	-
	PH4 α Klon No.4	++	++	-	-	-

Tabelle 5: Ergebnisse des Two-Hybrid-Tests

Die β -Galactosidase Aktivität (LacZ) bedeutet +++ blaue Kolonien innerhalb $\frac{1}{2}$ h
 ++ blaue Kolonien innerhalb 2 h + blaue Kolonien innerhalb 4 h - Keine
 Blaufärbung feststellbar

Um die Bindedomäne von A-Raf in Bezug zu PH4 α einzugrenzen, wurden zwei verschiedene A-Raf-Deletionskonstrukte auf direkte Wechselwirkung mit PH4 α getestet. Außerdem wurden Interaktionstests mit c-Raf und B-Raf durchgeführt, welche die isozymspezifische Interaktion von PH4 α zu A-Raf reproduzieren sollte, nachdem weder in PC12 library screens mit B-Raf noch mit c-Raf die PH4 α isoliert werden konnte⁹¹. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis der direkten Interaktionstests.

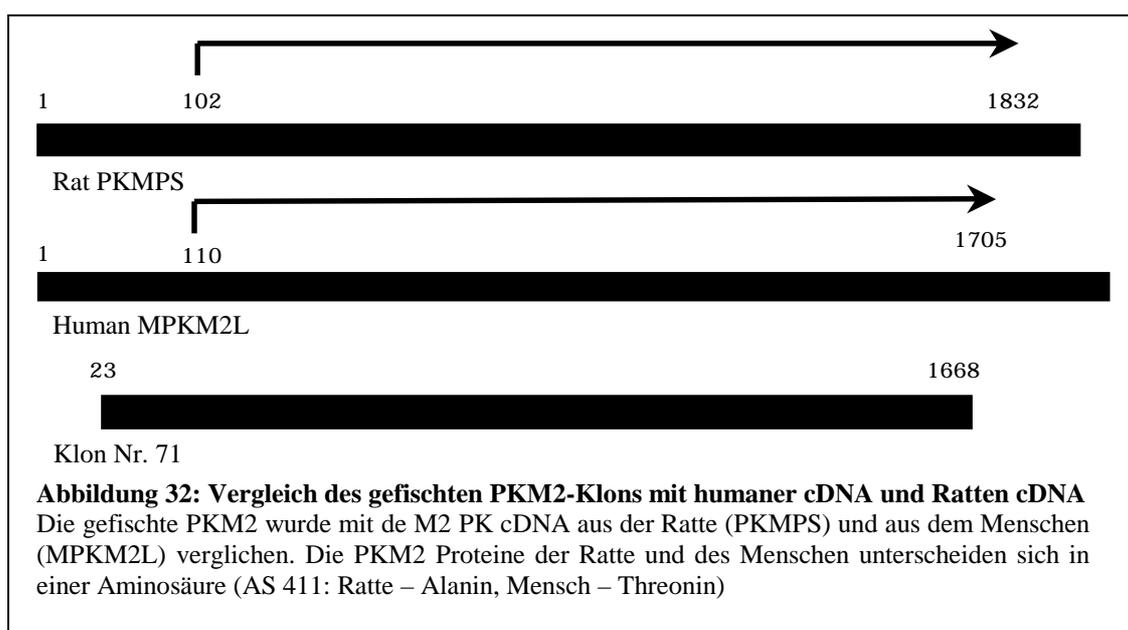
Der gefischte Teil der PH4 α bindet an die Regulatordomäne von A-Raf. Welche Auswirkungen diese Bindung hat und die Reproduktion dieser Interaktion in Co-Immunopräzipitations-Experimenten ist Aufgabe weiterer Untersuchungen.

3.6 Pyruvatkinase Typ M2

Beim A-Raf Screen einer PC12 c-DNA-Bibliothek wurde ein Klon der Pyruvatkinase Typ M2 (PKM2) als neuer A-Raf-Interaktionspartner isoliert. Pyruvatkinase katalysiert den Umsatz von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat im Zuge der Substratkettenphosphorylierung unter ATP-Bildung in der Glykolyse¹¹⁰. Es fungiert dort als Schlüsselenzym, da das entstehende Pyruvat an einer Verzweigungsstelle des Stoffwechsels steht: Es kann entweder zu L-Laktat reduziert werden (anaerobe Glykolyse), oder es wird im

Zitratzyklus oxidiert (aerobe Glykolyse), was eine um ein Vielfaches höhere ATP-Ausbeute zur Folge hat.

3.6.1 Sequenzanalysen der gefischten PKM2



Ein Vergleich des gefischten Klons mit den Genen der PKM2 der Ratte und dem Gen der PKM2 des Menschen ist in Abb. 33 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass der gefischte Klon nicht dem full-length Gen der PKM2 entspricht, sondern dass 37 bp im Bereich des C-Terminus fehlen. Eine mögliche Verschiebung des Leserahmens durch die untranslatierte Region bei der gefischten PKM2 wurde durch Sequenzanalysen ausgeschlossen.

3.6.2 Entfernung der untranslatierten Region der PKM2

Der physiologischerweise untranslatierte Teil der PKM2 vor dem ATG-Startcodon wird in einem künstlichen System, wie es das Two-Hybrid-System darstellt, über die Transaktivierungsdomäne des Plasmids auch translatiert. Um auszuschließen, dass A-Raf möglicherweise innerhalb dieser Region an die PKM2 bindet, wurde dieses Segment zusammen mit dem HA-tag aus dem Vektor ausgeschnitten. Mittels des Quikchange Site Mutagenesis Kits wurde über die Primer PK-M2-Sal-S und PK-M2-Sal-As eine *Sal I* Schnittstelle sechs Basenpaare vor dem Startcodon im pPC86-PKM2 eingefügt. Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzieren kontrolliert und im nächsten Schritt über einen *Sal I* Verdau das untranslatierte Stück aus dem Vektor herausgeschnitten und der Vektor religiert. Der Erfolg der Religation wurde mit Doppelverdau *EcoRI/SalI* kontrolliert.

Es resultierte das Konstrukt pPC86 PK Δ Sal. Nachfolgend wurde die Proteinexpression und Bindungsfähigkeit im Two-Hybrid-Test kontrolliert. Das neue Konstrukt zeigte eine ebenso starke Blaufärbung mit A-Raf im β -Gal-Assay wie die gefischte PKM2 (siehe Tab. 7). Eine Interaktion von A-Raf zur untranslatierten Region der PKM2 konnte somit ausgeschlossen werden.

pPC97 – DNA-Bindedomäne

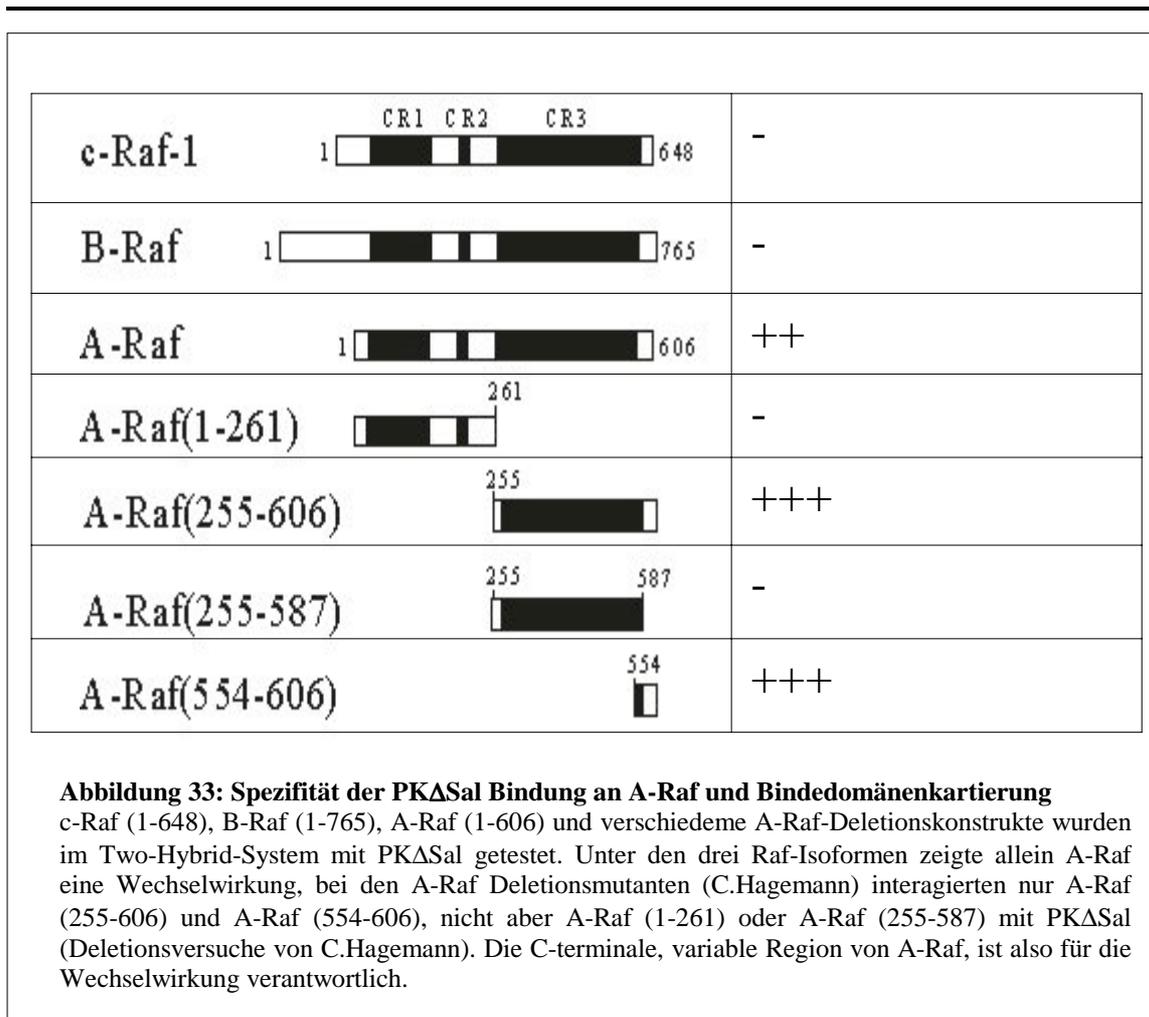
		A-Raf	B-Raf	c-Raf-1
PPC86 – Transaktivie- rungsdomäne	leerer Vektor	-	-	-
	PK Δ Sal	+++	-	-
	PKM2	+++	-	-

Tabelle 6: Two-Hybrid Test

Die β -galactosidase Aktivität (LacZ) bedeutet: +++ blaue Kolonien innerhalb $\frac{1}{2}$ h, ++ blaue Kolonien innerhalb 2 h, + blaue Kolonien innerhalb 4 h, - keine Blaufärbung feststellbar

3.6.3 Kartierung der A-Raf Bindedomänen

Um eine Aussage über eine mögliche Spezifität der A-Raf-PKM2 Wechselwirkung machen zu können, wurden alle drei Raf-Isoformen in direkten Interaktionstests mit PKM2 getestet. Wie erwartet zeigte im direkten Two-Hybrid-Test nur A-Raf mit PKM2 positive β -Galactosidase-Aktivität, da schon bei vorausgegangen PC12 library screens die PKM2 nicht isoliert werden konnte (Abb. 34). Von Interesse war nun, die Region der direkten Interaktion näher zu kartieren. Dies sollte es ermöglichen, mit neu konstruierten Mutanten selektiv die spezifische Wechselwirkung von A-Raf mit PKM2, nicht aber mit anderen Interaktionspartnern zu stören. Zu diesem Zweck führte C. Hagemann direkte Interaktionstests mit verschiedenen A-Raf Deletionsmutanten durch. Hier zeigte sich keine Wechselwirkung bei der regulatorischen, N-terminalen A-Raf-Hälfte (1-261), während die Kinase-Domäne (255-606), und hier insbesondere A-Raf (554-606), starke Blaufärbung zeigten. Da auch die A-Raf-Mutante 255-587 keine Blaufärbung aufwies (dort fehlt der variable C-Terminus), ist dieser Versuch ein starker Hinweis darauf, dass die Bindung von A-Raf an PKM2 in der Region zwischen 587-606 liegt, welche nicht zwischen den verschiedenen Raf-Isoformen konserviert ist. Diese Region der Bindung könnte auch die spezifische Bindung von PKM2 zu A-Raf und nicht zu B- oder c-Raf erklären.



Um die Region der Wechselwirkung genau einzugrenzen und spezifisch A-Raf-PKM2 Bindung zu stören, dabei jedoch keine Auswirkung auf die Wechselwirkung zu anderen A-Raf Interaktionspartnern zu haben, wurden zwei Punktmutationen im A-Raf Gen durchgeführt. Hierbei wurden die Regionen der Mutationen so ausgewählt, dass diese Bereiche keine Ähnlichkeit zu homologen Regionen von B- und c-Raf besitzen durften. Besonders geeignet erschienen die Aminosäuren 602 und 603. Die repräsentativen Basenpaare wurden im Vektor pPC 97/A-Raf mit Hilfe der Primer ArafRPs und Araf RPAs mutiert und gleichzeitig eine neue Schnittstelle geschaffen (*StuI*), die den Erfolg der Mutation zeigen sollte. Die erfolgreiche Mutation wurde durch *Sall/StuI* Verdau kontrolliert und durch Sequenzieren bestätigt. Im folgenden Two-Hybrid-Test wurde das Bindungsverhalten der neuen Mutation getestet. Wie in Tab. 7 ersichtlich bindet das mutierte Protein an die physiologischen Raf-Interaktionspartnern 14-3-3 ζ und MEK 2, jedoch nicht an PKM2 und PK Δ Sal. Mit diesem Versuch ist es also gelungen, eine Mutante zu erzeugen, deren Bindung an PKM2 selektiv gestört ist, ansonsten jedoch höchstwahrscheinlich die A-Raf typischen Eigenschaften beibehält.

pPC97 – DNA-Bindedomäne

		A-Raf	A-Raf AA602/603RP
pPC86 – Transaktivie- rungsdomäne	leerer Vektor	-	-
	PK ΔSal	+++	-
	PKM2	+++	-
	14-3-3ζ	++	+++
	MEK 2	+++	+++

**Tabelle 7: Two-Hybrid-Tests mit A-Raf
AA602/603RP**

Die Mutante bindet an den physiologischen Interaktionspartnern 14-3-3ζ und MEK 2, jedoch nicht an dem neu identifizierten Bindungspartner PKM2

3.6.4 Kartierung der PKM2 Bindedomänen

Die Kartierung der Bindedomänen der PKM2 gestaltete sich als schwieriger, da keine entsprechende Mutanten vorlagen, die für die Testung geeignet waren. Da die PKM2 ein tetrameres Protein ist, besteht die Möglichkeit, dass A-Raf unter physiologischen Konditionen an mehr als eine Untereinheit bindet. Die Zerstörung der Tertiärstruktur durch Mutationen könnte daher weitreichende Folgen für das Bindungsverhalten haben. Trotzdem entschloss man sich zur Konstruktion von Deletionsmutanten der PKM2, wobei die Deletionen größtenteils im C-Terminus angesiedelt waren (Ausnahme: pPC86/PK Δ1100-1550), somit keine Gefahr für einen Frameshift bestand. Folgende Deletionsmutan-

pPC97 – DNA-Bindedomäne

		A-Raf
pPC86 – Transaktivie- rungsdomäne	PK 1-1430	-
	PK 1-700	-
	PK 1-620	-
	PK 1-985	-
	PK Δ1100-1550	-
	PKM2	+++

**Tabelle 8: A-Raf mit PK
Deletionsmutanten**

A-Raf interagiert im Two-Hybrid-Test mit keiner der PK Deletionsmutanten.

ten von PK wurden hergestellt: pPC86/PK 1-1430, pPC86/PK 1-700, pPC86/PK 1-62, pPC86/PK 1-985, pPC86/PK Δ1100-1550. Alle Deletionsmutanten wurden im β-Gal-

Assay mit A-Raf getestet (siehe Tabelle 8). Das Ergebnis des β -Gal-Assays läßt zwei mögliche Schlüsse zu:

1. Die Interaktionsdomäne liegt im Bereich zwischen 1100 und 1550 bp. Dafür spricht die Tatsache, dass dies der einzige Bereich ist, in dem sich die Amniosauresequenzen der Isoenzyme PK M1 und PKM2 unterscheiden¹⁵³.
2. Durch die Deletionsmutanten wurde die Tertiärstruktur der Pyruvatkinase zerstört, es erfolgt keine korrekte Faltung mehr und somit wären die Two-Hybrid-Daten nicht aussagekräftig. Für diese These spricht, dass im Two-Hybrid-Screen nur ein einziger Klon gefischt wurde, und das Gen des gefischten Proteins fast die gesamte PK codiert (es fehlen 12 Aminosäuren). Im Vergleich zu anderen gefischten Klonen, bei denen verschiedene Teilbereiche des Proteins gefischt wurden (CK2 β) deutet dies darauf hin, dass nahezu das gesamte Protein für die Interaktion mit A-Raf notwendig ist.

3.6.5 PKM2 Protein-Expression in pGex-2T System

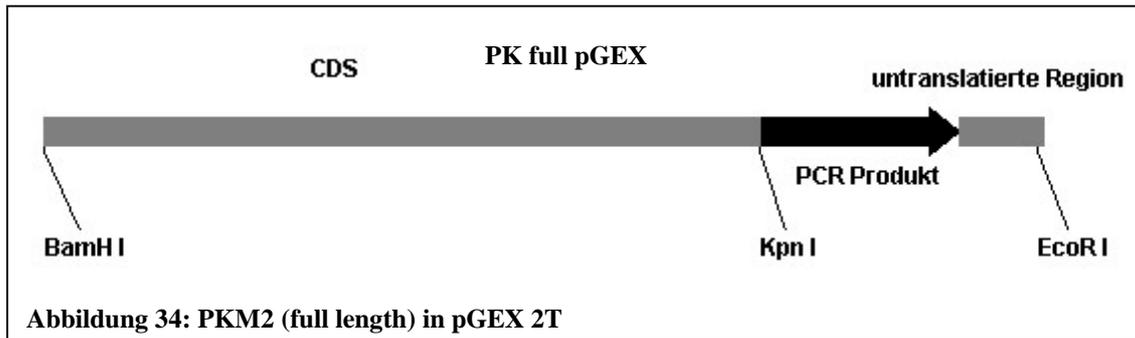
Zur weiteren Untersuchung der Pyruvatkinase M2 wurden GST-Fusionsplasmid-Konstrukte hergestellt. Die Untersuchungen verfolgten folgende Ziele:

1. Nachweis von Proteinexpression der PK „full length“ in Bakterien
2. Aktivitätsbestimmungen der PKM2
3. *in vitro* Phosphorylierungstests

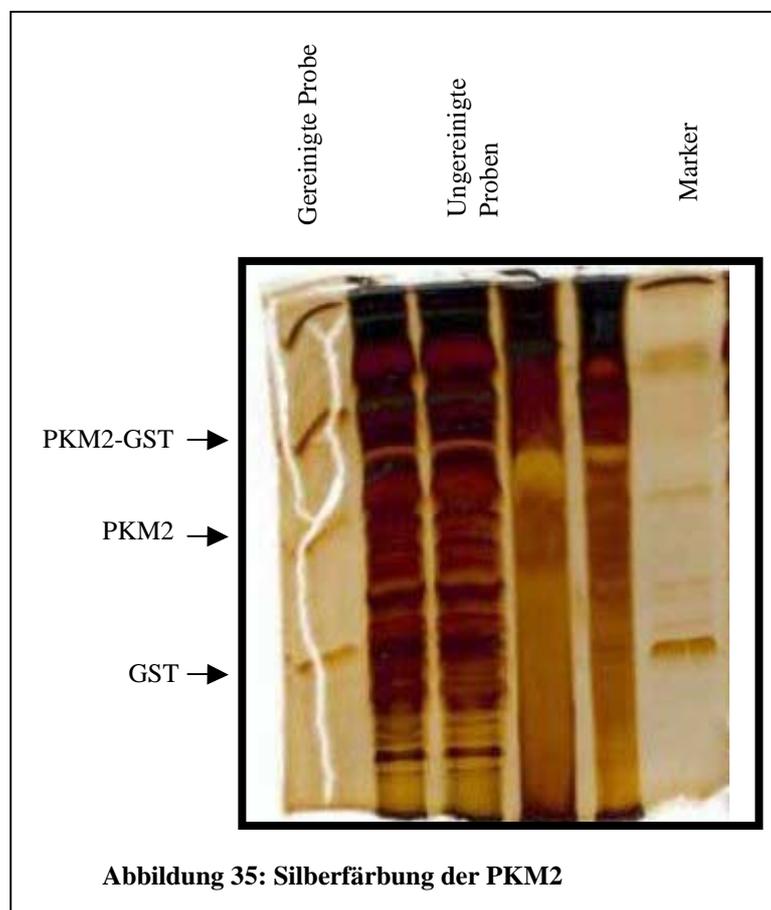
Die PKM2 musste zu diesem Zwecke in voller Länge kloniert werden, damit das Protein in seiner natürlichen Tertiär- und Quartärstruktur vorliegt.

3.6.6 Herstellung eines PKM2-pGEX-Konstruktes

Zur Herstellung eines PKM2-pGEX Konstruktes, welches das PKM2 Gen in voller Länge enthält, wurde zunächst die gefischte PKM2 mit *EcoR I* im pPC86 geschnitten, PKM2 aus dem Gel isoliert und nun in den mit *EcoR I* geschnittenen pGEX 2T Vektor inkloniert. Die korrekte Orientierung des Inserts wurde mit Doppelverdau *BamH I/Bgl II* kontrolliert. Im nächsten Schritt eine *BamH I* Schnittstelle zwei Codons vor dem ATG-Startcodon mit den



Primern PK-pGEX-Bam-S und PK-pGEX-Bam-AS eingefügt. Nach Bestätigung der Mutation durch *BamH I* Kontrollverdau wurde das untranslatierte Segment herausgeschnitten, der Vektor religiert und ein möglicher Frameshift des Konstruktes durch Sequenzierung ausgeschlossen (entstandenes Konstrukt: PK Δ Bam pGEX). Im nächsten Schritt wurde mittels PCR der fehlende C-Terminus der PKM2 aus der PC12-Bibliothek isoliert. Hierfür wurden die Primer PKPC12sense und PKPC12AS benutzt. Der Sense Primer bindet bei BP 1424-1466. In dieser Region findet sich eine Schnittstelle für *Kpn I*, welche für die nachfolgende Klonierung verwendet wurde. Der Antisense Primer bindet an die BP 1978- 1999 im untranslatierten Bereich nach dem Stopcodon (BP 1832). Dort

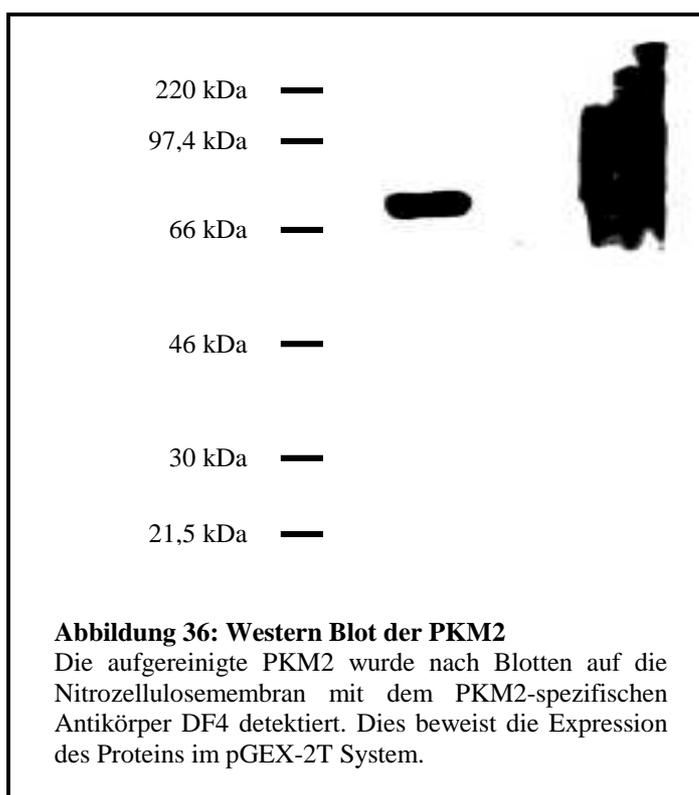


befindet sich eine Schnittstelle für *EcoR* I an Position 1988, die auch für die nachfolgende Klonierung verwendet wurde. Mittels PCR wurde ein DNA-Bereich von 576 bp amplifiziert und aufgereinigt. Es folgte der Restriktionsverdau des Konstrukts PK Δ Bam pGEX und des amplifizierten PCR-Fragments mit *Kpn* I und *EcoR* I im präparativen Maßstab. Nach Isolation aus dem Gel wurde anschließend das PCR-Fragment in den Vektor inkloniert. Der Erfolg wurde durch *BamH* I/*EcoR* I und *BamH* I/*Kpn* I Verdau bestätigt.

3.6.7 Aufreinigung und Nachweis von GST-PKM2

Das PK-full-pGEX-2T Konstrukt wurde zur Aufreinigung und zum Nachweis in Bakterien BL 21 DE 3 transformiert und aufgereinigt (\rightarrow 2.2.3.5.1). Die Proteinkonzentration des eluierten GST-PK-full-Fusionsproteins betrug 0,828 mg/ml im Eluat. Zum Nachweis der PK wurde zunächst eine Silberfärbung durchgeführt (\rightarrow 2.2.3.5.2). Abb. 35 zeigt das Ergebnis dieser Färbung. Die drei sichtbaren Banden entsprechen der PKM2-GST, PKM2 und GST. Die PKM2 hat eine Größe von 58 kd und GST eine Größe von ca. 20 kd.

Als weiterer spezifischer Nachweis wurde ein Western Blot mit dem PKM2 Antikörper DF4 durchgeführt (\rightarrow 2.2.3.4). Die Proteine wurden auf einem 12%igem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitro-zellulose-Membran geblottet. Nach Bindung der Antikörper



wurden die Banden mittels ECL-Reaktion sichtbar gemacht (→ 2.2.3.4.3, Abb. 36).

3.6.8 Messung der enzymatischen Aktivität der PKM2

Nicht nur die Überprüfung der Expression, sondern auch die Messung der enzymatischen Aktivität der klonierten GST-PKM2 sollte den Erfolg der Klonierung bestätigen. Zu diesem Zwecke wurde von Prof. Eigenbrodt (Institut für Veterinärmedizin Giessen) die Aktivität des GST-Fusionsproteins nach Gerbracht bestimmt^{154,155}. Die Aktivitätsbestimmung ergab 11 mU/ml, somit wurden bei der Messung 11 μ mol Phosphoenolpyruvat/ min zu Pyruvat umgesetzt. Dies beweist, dass die PKM2 nicht nur vollständig exprimiert wurde, sondern auch eine hohe enzymatische Aktivität besaß.

3.6.9 Co-Immunopräzipitation von Raf und PKM2

Nach Expression der aufgereinigten rekombinanten PKM2 konnte die Wechselwirkung zu A-Raf in einem anderen Zellsystem überprüft werden. Hierbei bot sich das Sf9-Zellsystem an, da hier mittels Überexpression eine ausreichende Menge der gewünschten Proteine zur

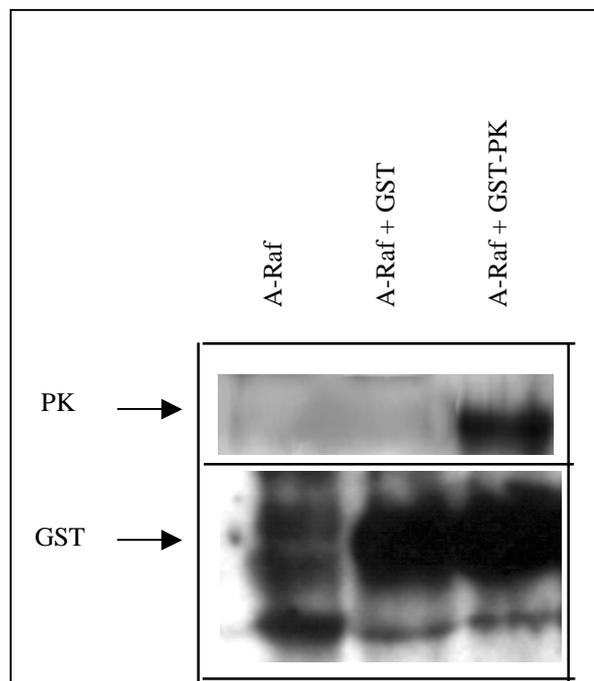
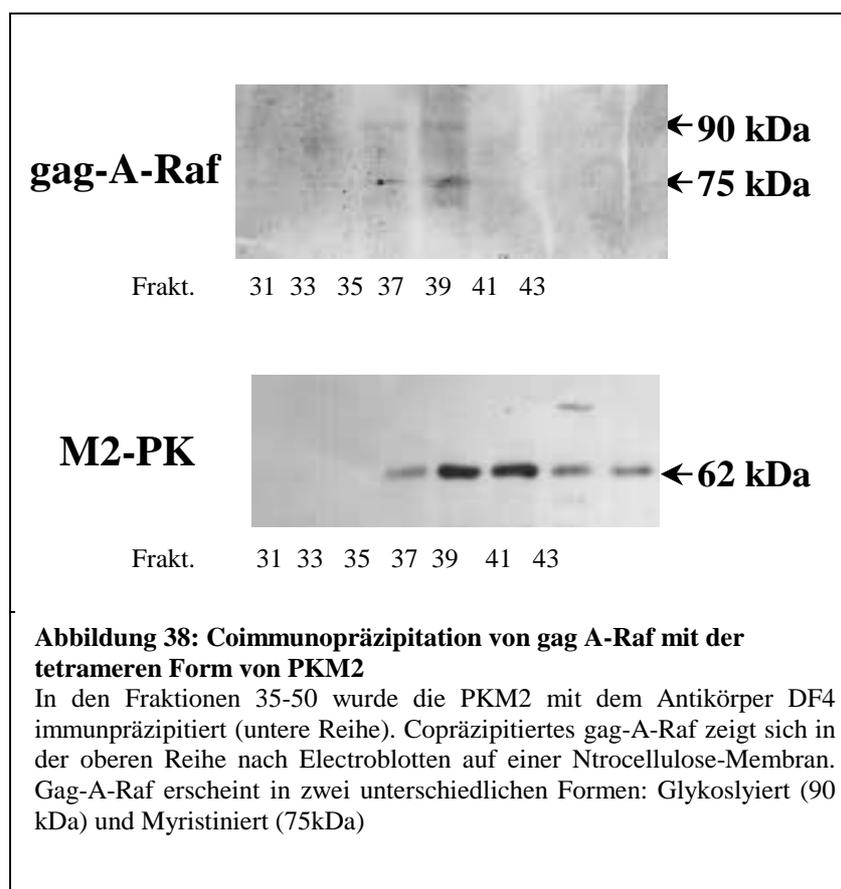


Abbildung 37: Test von A-Raf im Zellysat mit GST-PK

A-Raf aus Sf9 Zellysat wurde zusammen mit GST und GST-PK inkubiert und über SDS-Page aufgetrennt. In der oberen Zeile wurde die PK mit dem DF4 Antikörper immunpräzipitiert, die untere Zeile zeigt den Versuch der Copräzipitation mit dem polyklonalen A-Raf Antikörper. Bei hohem Background zeigte sich die Kreuzreaktion des A-Raf Antikörpers mit GST

Verfügung stehen konnte (→ 2.2.3.6). Für die Co-Immunpräzitations-Versuche wurden A- und c-Raf transfizierte Zellen von C. Weber zur Verfügung gestellt (→ 2.2.3.6). Die GST-PKM2 wurde an Sepharose gebunden und zusammen mit den Zellysaten inkubiert. Auf dem nachfolgenden SDS-Page wurden die Proteine dann auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Mittels PKM2 Antikörper wurde schließlich das Vorhandensein der PKM2 und mit A-Raf Antikörper die Wechselwirkung untersucht. Abb. 37 zeigt das Ergebnis des Versuches: A-Raf+GST-PK wurde mit dem monoklonalen PKM2 Antikörper immunpräzipitiert. Es gelang jedoch nicht, A-Raf mit dem polyklonalen A-Raf Antikörper zu copräzipitieren. Dies mag zum einen daran liegen, dass der A-Raf Antikörper mit GST kreuzreagiert, zum liefert der polyklonale A-Raf Antikörper unspezifische Banden (hoher Background).

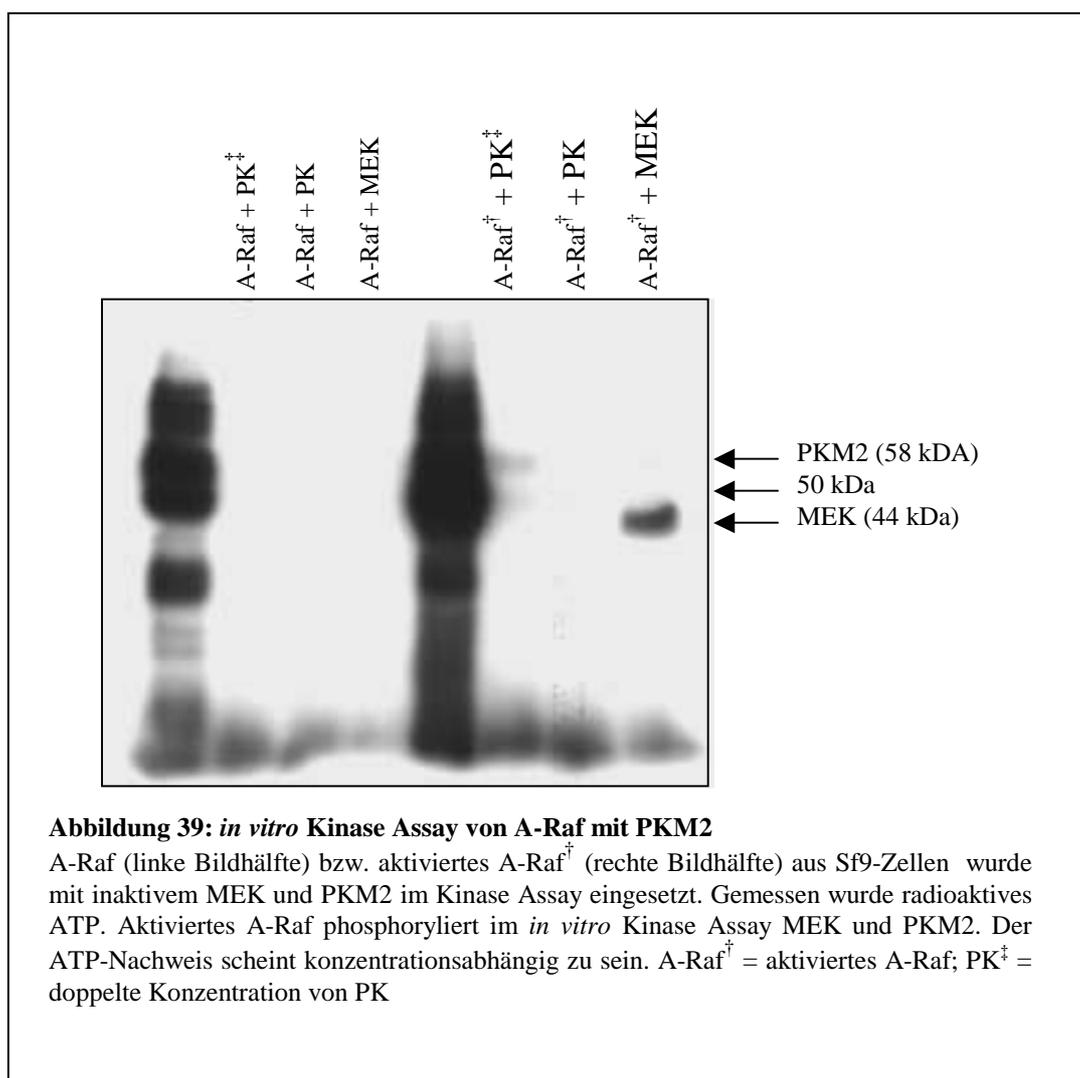


Der Nachweis der Co-Immunpräzitation von A-Raf und PKM2 wurde schließlich von S. Mazurek (Institut für Veterinärmedizin, Giessen) erbracht. Nach isoelektrischer Focussierung, welche unter Bedingungen durchgeführt wird, die den glykolytischen Enzymkomplex konservieren¹⁵⁶, ist es möglich, die metabolische Regulation des glykolytischen Komplexes zu untersuchen. Hierbei wurden die isoelektrisch focussierten Fraktionen 35-50 mit dem PKM2 Antikörper DF4 immunpräzipitiert. Anschließend konnte

gag-A-Raf (A-Raf-Kinasedomäne fusioniert mit dem retroviralen gag-Protein) mit der tetrameren PKM2 in Fraktionen 35-37 copräzipitiert werden (Abb. 38; 90 kDa und 75 kDa). Diese Fraktionen entsprechen der tetrameren Form der PKM2. Dabei konnte keine Immunpräzipitation von gag-A-Raf mit der dimeren Form von PKM2 detektiert werden (Fraktionen 45-50). Die Untersuchungen belegen eine direkte Bindung von A-Raf an die tetramere Form der PKM2.

3.6.10 Kinase Assay mit A-Raf und PKM2

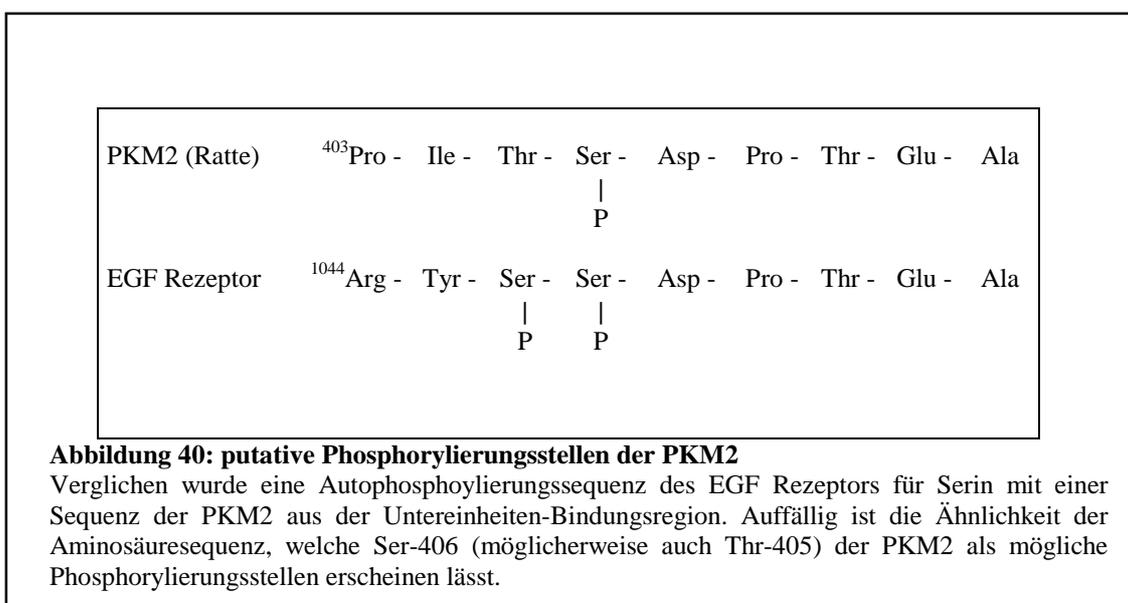
Hier wurde untersucht, ob A-Raf die PKM2 phosphorylieren kann. Für A-Raf als klassische Serin-Threonin Kinase wurde bislang nur MEK1 als Substrat isoliert¹⁴⁴. Allerdings konnte hier bereits eine Interaktion zwischen A-Raf und MEK2 im Two-Hybrid-Test gezeigt werden. Da die tetramere PKM2 an Serinresten phosphoryliert werden kann¹¹⁰, die daraufhin in inaktive Dimere zerfällt, war die Vermutung naheliegend, dass A-Raf diese



Phosphorylierung und nachfolgende Inaktivierung bewirkt. Daher wurden *in vitro* Kinase-Assays mit A-Raf und PKM2 als Substrat durchgeführt um eine mögliche Phosphorylierung direkt nachzuweisen. In der Tat zeigten sich bei den *in vitro* Kinase-Assays mit A-Raf und mit und aktiviertem A-Raf aus Sf9 Zellen, welche mit PKM2 inkubiert waren, bei der Präzipitation mit radioaktiv markierten ATP zwei Banden, wobei eine Bande der Größe der PKM2 entsprach (Abb.39). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass A-Raf eine Rolle bei der Phosphorylierung der PKM2 spielt. In weitergehende Untersuchungen bezüglich der Frage nach der Phosphorylierung der PKM2 an Serin-Resten konnte S. Mazurek zeigen, dass in A-Raf transformierten NIH 3T3 Zellen der Phosphoserinegehalt der PKM2 2.6 mal höher war als in Kontrollzellen. Außerdem stieg die Aktivität der tetrameren Form in diesen Zellen um den Faktor 2.6 an und es kam zu einem höheren Shift von der dimeren Form zur tetrameren Form. Auch diese Ergebnisse belegen eine Beteiligung von A-Raf bei der Phosphorylierung der PKM2 und eine Aktivitätssteigerung in transformierten Zellen.

3.6.11 Mutation putativer Phosphorylierungsstellen der PKM2

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass A-Raf bei der Serin-Phosphorylierung der PKM2 direkt beteiligt ist. Vergleiche der allosterisch regulierten PKM2 mit der nicht regulierbaren PKM1^{153,157} verdeutlichen die Bedeutung der C α 1 und C α 2 Regionen für die Isozymspezifität



und allosterische Regulation, da der Austausch der Aminosäure Ala-398 in Arg-398 die PKM1 in ein allosterisches Enzym umwandelt¹⁵³. Da in diesem Bereich eine bestimmte Aminosäuresequenz starke Ähnlichkeit mit der Serin-Autophosphorylierungssequenz des EGF-Rezeptors aufweist¹⁵⁸, lag die Vermutung nahe, dass dieser Bereich für die Serin-

Phosphorylierung verantwortlich sein könnte (Abb. 40). Es wurden daher die Aminosäuren

pPC97 – DNA-Bindedomäne

		A-Raf
pPC86 – Transaktivie- rungsdomäne	leerer Vektor	-
	PKM2	+++
	PKM2 SR	+++
	MEK 2	+++

Tabelle 11: Two-Hybrid-Test

A-Raf bindet an PKM2 SR mit derselben Intensität wie an PKM2 (Wildtyp). Die Mutation beeinflusst nicht die A-Raf Pk M2 Interaktion.

Thr-405 und Ser-406 in die korrespondierenden Aminosäuren der PK L (Ser-405 und Arg-406) mit

Hilfe der Primer PKM2SRS und PKM2SRAs in den Vektoren pPC86 und pUC19 mutiert um in späteren

Experimenten (Kinase Assays bzw.

Transformationsexperimente) den Effekt dieser Mutation auf die Phosphorylierung bzw. die

Zelltransformation zu untersuchen. Der Erfolg der Mutation wurde durch Doppelverdau *Bgl II* und der

neu entstandenen Schnittstelle *Bsp68 I* mit

nachfolgender Sequenzierung kontrolliert. In

nachfolgenden Two-Hybrid-Experimenten wurde

die Bindungsfähigkeit der neuen Mutante zu A-Raf

untersucht. Wie in Tabelle 9 dargestellt zeigt sich kein Unterschied im Bindungsverhalten im

Vergleich zur Wildtyp PKM2. Somit konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäuren die

PKM2 / A-Raf Interaktion nicht beeinflussen. Künftige Experimente (Kinase Assay und

Zell-Transformationen) sollen klären, ob durch diese Mutation die Serin-Phosphorylierung

verhindert werden kann und weiterhin, ob die Zelltransformation in A-Raf exprimierenden

Zellen durch die PKM2 SR beeinflusst wird.

3.6.12 Grundlage von PKM2 / A-Raf Zell Transformation

Von entscheidenden Interesse war nun die Frage nach der physiologischen Relevanz der A-

Raf-PKM2 Interaktion. Welche Rolle spielt die Kopplung der Glykolyse mit der

„klassischen“ Signaltransduktionskaskade? Zur Beantwortung dieser Frage musste man

postulieren, dass die Interaktion beider Enzyme auch unter physiologischen Bedingungen

stattfindet. Es stellte sich ferner die Frage nach einer möglichen Bedeutung für die Fähigkeit

von A-Raf, Zellen zu transformieren. Huleihel et al. hatten gezeigt, dass retroviral

inkorporiertes A-Raf (gag-A-Raf) *in vitro* Tumoren bei neugeborenen Mäusen zu induzieren

kann. A-Raf ist also in der Lage, Zellen unabhängig von Ras zu transformieren¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Zur

Untersuchung dieser Frage sollte eine „dominant-negative“ Form von PKM2 generiert

werden, die die Kooperation mit A-Raf blockieren sollte. Nach Transfektion in NIH 3T3

Zellen könnte dann die Wirkung auf Transformationseigenschaften untersucht werden. NIH

3T3 Zellen, welche Abkömmlinge von Fibroblasten aus Mäuse-Embryonen sind, bieten sich

für Transformationsstudien besonders gut an, da diese Zellen eine hohe Sensitivität zur Kontaktinhibition besitzen und damit die Zell-Transformation besonders gut beobachtet werden kann.

3.6.12.1 Klonierung von PKM2 und PKM2 K366M in pcDNA3

Voraussetzung für Transformationsexperimente ist die Klonierung der PKM2 in den pcDNA 3 Vektor und die Konstruktion einer „dominant-negativen“ PKM2 Mutante. Der pcDNA 3 Vektor gewährleistet eine konstitutive Transkription der Proteine durch den starken Cytomegalievirus-Promotor in NIH 3T3-Zellen. Für die Subklonierung in den pcDNA 3 Vektor wurde PKM2 aus dem pGEX 2T PK full mit *BamH I* und *EcoR I* isoliert und in die MCS von pcDNA 3, der mittels Doppelverdau *BamH I/EcoR I* linearisiert wurde, ligiert. Der Erfolg der Ligation wurde mit *Hind III/Kpn I* Doppelverdau verifiziert.

Zur Konstruktion einer „dominant negativen“ Form der PKM2 wurde an der mutmaßlichen ATP-Bindungsstelle der PKM2¹⁶²⁻¹⁶⁵ Lysin zu Methionin mit dem Ziel mutiert, eine Kinase-inaktive Form der PKM2 zu generieren, welche die A-Raf-PKM2 Interaktion blockieren könnte. Die Mutation mit den Primern PK-K366M-S und PK-K266M-As durchgeführt. Das Lysin der AS 366 (AAA) wurde zu Methionin (ATG) mutiert, wodurch eine zusätzliche Schnittstelle (*Nco I*) geschaffen wurde. Der Erfolg der Mutation wurde zunächst mit Doppelverdau (*BamH I / Nco I*) kontrolliert und das Konstrukt sequenziert. Diese Klonierungen bildeten die Grundlage für Untersuchungen der A-Raf-PKM2 Wechselwirkungen in NIH 3T3 Zellen und die Auswirkungen der Mutation der PKM2 in Bezug auf die Zelltransformation dieser Zellen.

Kapitel 4

DISKUSSION

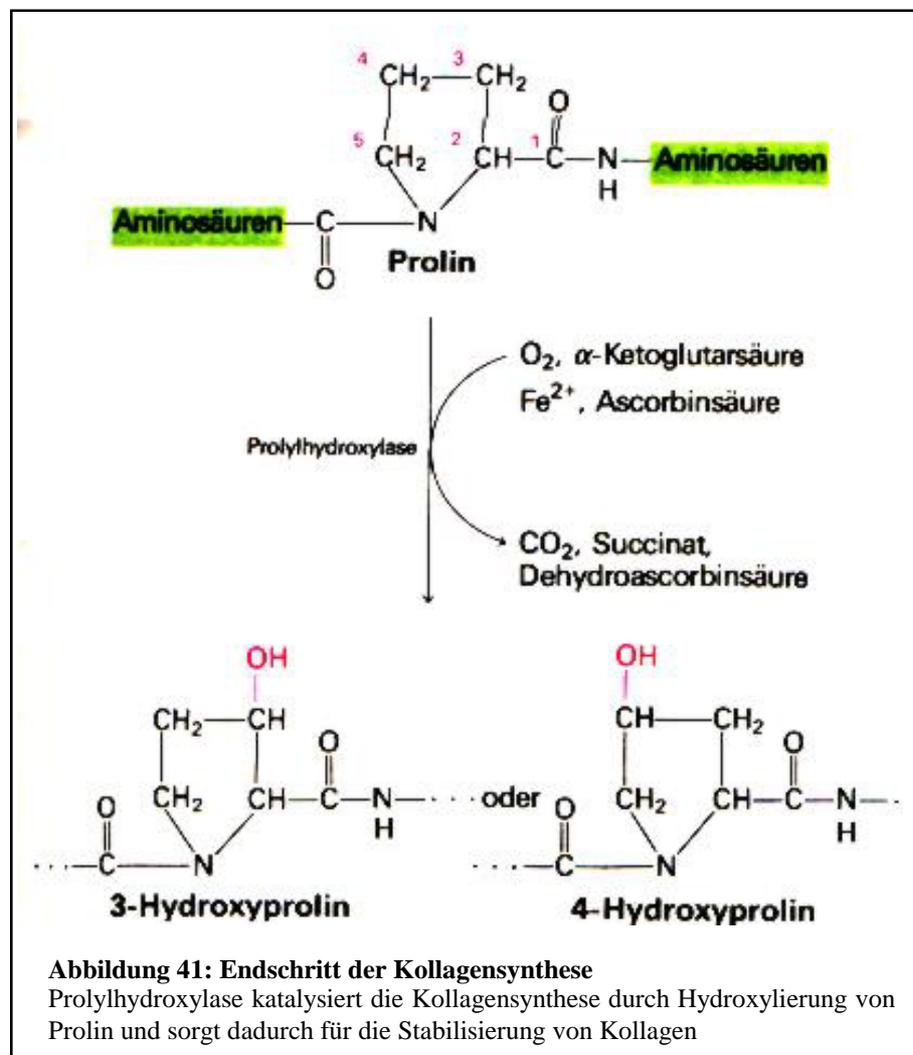
Raf-Proteinkinasen spielen bei der Regulation von Differentiation, Proliferation und Apoptose eine entscheidende Rolle. Diese Proteine fungieren als Proto-Onkogene. Mutationen überführen sie in Onkogene, die an der Krebsentstehung beteiligt sind. Ursprünglich nahm man an, die Mutation eines einzigen Onkogens sei ausreichend, Tumorwachstum zu induzieren. In den vergangenen Jahren konnte jedoch ein immer größer werdendes Netzwerk entdeckt werden, in dem unterschiedliche Signalproteine verschiedener Kompartimente miteinander kommunizieren und die Krebsentstehung schrittweise durch die Mutationen verschiedener Proto-Onkogene fördern. Fehlerhafte Kommunikation und Verhinderung der Apoptose legen damit den Grundstein zum Wachstum von Tumorzellen¹²⁴. Ziel dieser Arbeit war es, einerseits neue Interaktionspartner von Raf zu entdecken, die in den verzweigten Regelkreis der Carcinogenese involviert sind. Zum anderen sollte die Isoformspezifität von Raf weiter untersucht werden, da die Raf-Isoenzyme unterschiedliche Funktionen bei der Signaltransduktion ausüben¹⁴⁷. Daher wurde eine PC12 cDNA-Bibliothek mit A-Raf und c-Raf als Köderproteine untersucht. Diese Bibliothek war ein geeignetes Testsystem, da sie cDNA's einer Tumorzelllinie beinhaltet, die unterschiedliche Onkogene exprimiert. Ferner war eine Raf-Isoform spezifische Steuerung der Zellantwort bei diesen Zellen gezeigt worden¹⁶⁶. Positive Klone repräsentieren zwei Hauptgruppen, von denen eine Gruppe die bereits bekannten Raf-Interaktionspartner H-Ras, MEK und 14-3-3 umfasste, und die zweite Gruppe die bislang unbekanntes Raf-Bindeproteine Pyruvatkinase M2 und Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit kodierte.

4.1 Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit

Der Two-Hybrid Screen einer PC12 Bibliothek mit A-Raf zeigte als neuen Interaktionspartner die Prolyl 4-Hydroxylase α -Untereinheit. Zwei unabhängige Klone konnten isoliert werden (\rightarrow 3.5) und direkte Interaktionstests mit den verschiedenen A-Raf Mutanten und B- und c-Raf-1 konnten folgendes zeigen:

1. Die Bindung ist isozymspezifisch, keine Interaktion mit B-Raf oder c-Raf-1 konnte nachgewiesen werden.

2. Die regulatorische Domäne von A-Raf ist für die Wechselwirkung verantwortlich (→ 3.5).

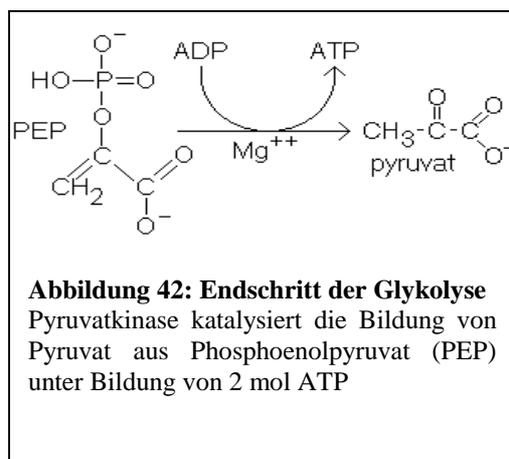


Prolyl 4-Hydroxylase ist ein Schlüsselenzym der Kollagensynthese. Es katalysiert die Bildung von 4-Hydroxyprolin durch Hydroxylierung bestimmter Prolinreste im rauhen endoplasmatischen Retikulum (Abb. 41). Das Reaktionsprodukt, 4-Hydroxyprolin, dient der Stabilisierung der Tripelhelix von Kollagen unter physiologischen Bedingungen. Ohne diese Reaktion können keine stabilen Kollagenfibrillen gebildet werden. Das aktive Enzym ist ein alpha-2-beta-2-Tetramer, wobei die katalytische Region möglicherweise aus alpha- und beta-Untereinheiten besteht, die alpha-Untereinheiten jedoch den größeren Teil der katalytischen Funktionen übernehmen soll¹⁶⁷. Die beta-Untereinheit, welche identisch ist mit der Protein-Disulfidisomerase^{168,169}, besitzt einen COOH-Terminus, welcher für die Retention des Enzyms am rauhen endoplasmatischen Retikulums verantwortlich ist^{168,170-172}, die alpha Untereinheit besitzt diesen COOH-Terminus nicht.

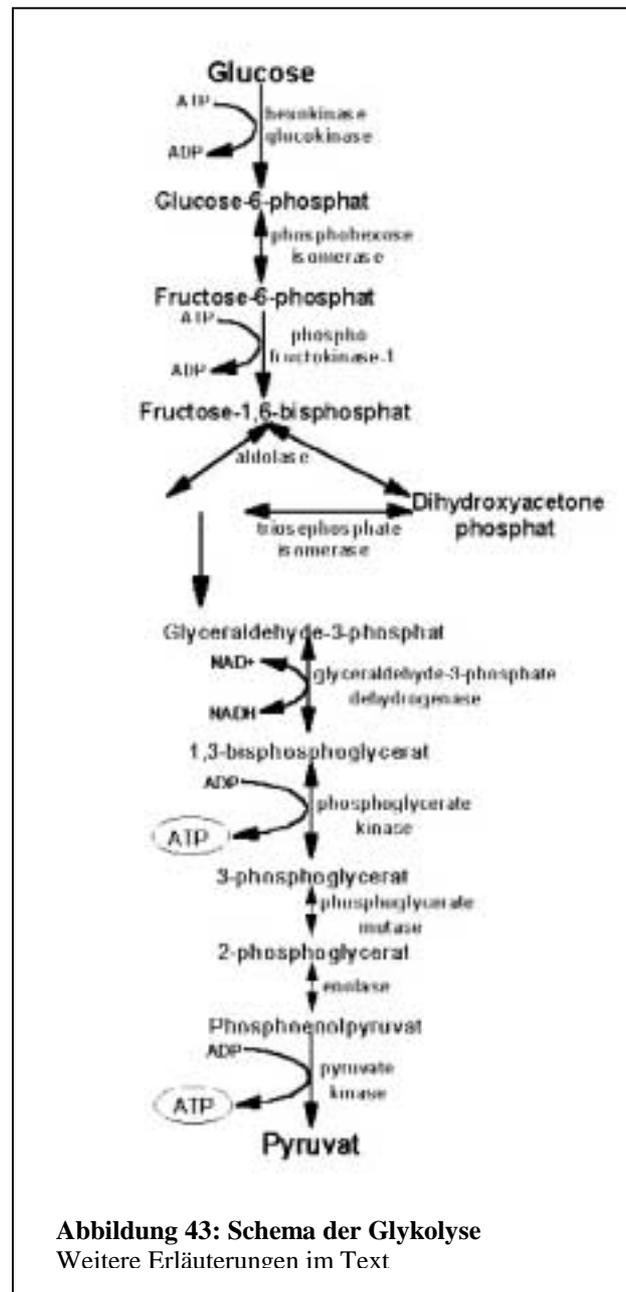
Da die Prolyl 4-Hydroxylase für eine stabile Kollagen-Synthese essentiell ist, mehrere Erkrankungen, wie Leberfibrose und bestimmte Magenkarzinome mit einer vermehrten Kollagensynthese einhergehen^{171,173}, steht dieses Enzym und der Versuch seiner Hemmung seit Jahren im Interesse der Forschung^{171,174,174}. Der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β), der wesentlich an der Steuerung der Entwicklung von Wirbeltieren beteiligt ist und die Bildung von Zelladhäsionsmolekülen, weiteren Wachstumsfaktoren sowie Molekülen der extrazellulären Matrix fördert, erhöht signifikant die PH4 α Produktion in Fibroblasten und ist mit vermehrter Kollagenbildung im szirrhösen Magencarcinom assoziiert^{175,176}. Andererseits aktiviert TGF β die MAPK Kaskade in Lungenfibroblasten und induziert die Transformierung von Kupffer-Sternzellen der Leber in Myofibroblast-ähnliche Zellen über die MAPK Kaskade^{177,178}. A-Raf könnte in diesem Zusammenhang eine regulatorische Aufgabe bei der Kollagensynthese wahrnehmen. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob die A-Raf-PH4 α -Interaktion unter physiologischen Bedingungen eine Bedeutung zukommt und welche Auswirkung die Bindung der beiden Enzyme auf die Zellmatrix hat.

4.2 Pyruvatkinase M2

In dem A-Raf Screen einer PC12 cDNA-Bibliothek konnte die Pyruvatkinase Typ M2 (PKM2) als neuer A-Raf-Interaktionspartner identifiziert werden. Pyruvatkinase katalysiert in der Glykolyse den Umsatz von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat im Zuge der Substratkettenphosphorylierung unter ATP-Bildung (Abb. 42)¹¹⁰. In der Glykolyse wird Glucose über mehrere Zwischenschritte zu Pyruvat umgesetzt (Abb. 43), wobei die meisten



Reaktionen umkehrbar sind. Drei Schritte allerdings bleiben aufgrund der stark exergonischen Reaktionen irreversibel: Hexokinase-, Phosphofruktokinase- und Pyruvatkinasereaktion. Die Rückreaktion, die Phosphorylierung des Pyruvats und Bildung von Phosphoenolpyruvat, ist also nicht direkt möglich, sondern verläuft bei der



Gluconeogenese über einen Zwischenschritt: die biotinabhängige Pyruvatcarboxylase wandelt Pyruvat in Oxalacetat um, in einem zweiten Schritt wird Phosphoenolpyruvat mittels der Phosphoenolpyruvatcarboxylase gebildet. Aus dieser aufwendigen Rückreaktion wird die Irreversibilität der Pyruvatkinase-Reaktion deutlich⁹⁵.

Die Pyruvatkinase ist ein homotetramerer Komplex, dessen vier Untereinheiten die Größe von 58 kD haben und über ihre N-terminalen Domänen (Aminosäuren 10-40) sowie über zwei C-terminale α -Helices ($\alpha 1$ und $\alpha 2$; Aminosäuren 385-425) miteinander verbunden sind^{153,179,180}. Es gibt vier gewebespezifisch exprimierte Isoformen: PK L, PK R, PK M1 und PKM2. Diese Isoenzyme werden mit Ausnahme der PKM1 allosterisch reguliert¹⁸¹⁻¹⁸³. PK L und PK R werden durch das selbe Gen kodiert. Die Transkription wird allerdings von

unterschiedlichen Promotoren initiiert. Dadurch wird PK L in Hepatozyten und proximalen Nierentubuli exprimiert, während PK R ausschließlich in Erythrozyten gefunden wird¹⁸⁴. PKM1 und PKM2 entstehen durch alternatives Spleißen. Es werden 56 Aminosäuren ausgetauscht, von denen 21 Aminosäuren in Helix $\alpha 1$ und $\alpha 2$ unterschiedlich sind¹⁸⁵. Die Regionen sind besonders wichtig für den Kontakt der Untereinheiten untereinander und für die allosterische Regulation der PKM2 (Abb. 44)¹⁵³.

Die PKM1-Isoform findet man überwiegend im Gehirn, Herz- und Skelettmuskel. PKM2 ist die embryonale Pyruvatkinase-Form. In bestimmten fötalen Geweben findet im Laufe der Entwicklung ein Shift von der M2 zur M1 Form statt. Bei adulten Organismen wird die PKM2 nur noch in der Darmmukosa, den distalen Tubuli der Niere, im Fettgewebe, den Gallengängen der Leber und in der Lunge exprimiert¹⁸⁶⁻¹⁹⁵. Außerdem ersetzt sie die anderen



Isoformen in proliferierenden Zellen und in Tumoren¹⁹⁶. Die PKM2 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Syntheseleistungen und Energiebereitstellung bei proliferierenden Zellen. Durch Bildung von Dimeren aus den hoch aktiven tetrameren Komplexen nimmt die Aktivität der PKM2 stark ab und die Phosphometaboliten der Glykolyse stehen Syntheseleistungen zur Verfügung^{108,197}. Zur Energiegewinnung stehen proliferierenden Zellen neben der mitochondrialen Glutaminolyse nur die Pyruvatkinase-Reaktion zur Verfügung^{108,111,197}. Die Regulation des Tetramer/Dimer-Verhältnisses ist deshalb von zentraler Bedeutung und kann über allosterische Regulation (z.B. Fructose-1,6-Bisphosphat) erfolgen^{109,197}. Diese Rolle wird durch die Entdeckung unterstrichen, dass onkogenes E7 Protein des humanen Papillomvirus Typ 16 direkt an PKM2 binden kann und dadurch höhere Fructose-1,6-Bisphosphat Level nötig sind, um die PKM2 in die tetramere (aktive) Form zu überführen¹²⁹. Darüber hinaus erhöht die Expression der pp60^{v-src} Kinase die PKM2 Phosphorylierung von Tyrosin, Serin, und Threonin in Rous Sarkomvirus transformierten Fibroblasten^{109,198}, obwohl die Identität der Serin- und Threoninkinasen bisher unbekannt blieben. Diese Erkenntnisse machten es wahrscheinlich, dass A-Raf durch

die direkte Bindung an PKM2 in dessen Regulation involviert ist und deshalb entschloss man sich, die Wechselwirkung näher zu untersuchen: man kartierte die Bindungsdomänen, untersuchte die Wechselwirkung auf Phosphorylierungsereignisse und schließlich wurden die Auswirkungen dieser Interaktion auf die Transformationseigenschaften von A-Raf transformierten Zellen untersucht^{129,187-199}.

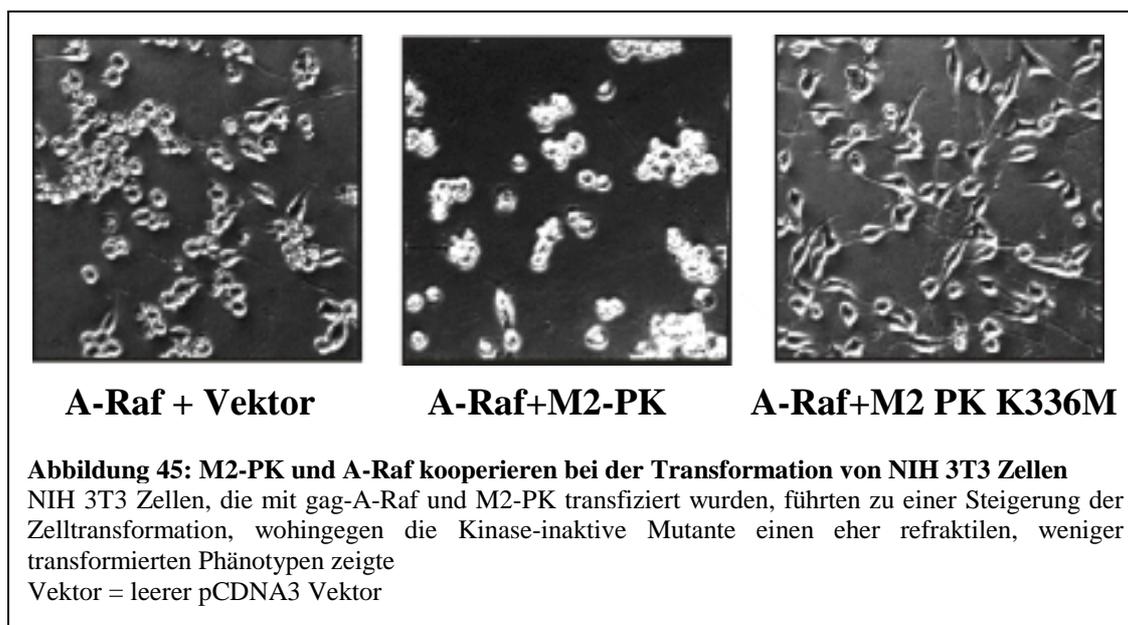
Die A-Raf PKM2 Interaktion ist isozymspezifisch, d.h. es konnte keine Bindung zu B- oder c-Raf detektiert werden. Die Wechselwirkung konnte in Co-Immunopräzipitations-Experimenten bestätigt werden (→ 3.6.9). Two-Hybrid Experimente zeigten, dass PKM2 an den c-Terminus von A-Raf bindet (→ 3.6.3). Die Bindung an die PKM2 ließ sich durch Mutation der A-Raf Aminosäuren 602 und 603 verhindern. Dies zeigt, dass diese variable Region die entscheidenden Bindungsstellen an die PKM2 repräsentiert (→ 3.6.4). Diese Mutante ist ein interessantes Werkzeug für zukünftige Untersuchungen, da die A-Raf Bindung an die physiologischen Interaktionspartner Ras und MEK nicht beeinflusst werden. Die spezifische Ausschaltung der A-Raf PKM2 Interaktion ermöglicht es, zukünftig die Auswirkung auf Proliferation und Differenzierung in unterschiedlichen Zellsystemen zu charakterisieren. Hier konnte eine Phosphorylierung der PKM2 *in vitro* gezeigt werden (→ 3.6.10) und diese Ergebnisse konnten durch den Nachweis einer Phosphorylierung von PKM2 in A-Raf transformierten NIH 3T3 Zellen an Serin bestätigt werden. Darüber hinaus wurde bei den A-Raf transformierten Zellen eine Aktivitätssteigerung der tetrameren PKM2 beobachtet (S. Mazurek, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Daten weisen darauf hin, dass A-Raf einen Regulator der PKM2 ist.

4.2.1 Auswirkungen auf die Zelltransformation

Dass eine Aktivitätssteigerung der PKM2 für die Zelltransformation essentiell ist, konnte in Co-Transfektionsexperimenten gezeigt werden. Mit Hilfe des Plasmids pCDNA3 / PKM2 (→ 3.6.12.1) konnte J. Beigel (MSZ) zeigen, dass NIH 3T3 Zellen nach Co-Transfektion von PKM2 und onkogenem A-Raf (gag-A-Raf) doppelt so viele Foci bildeten wie nach alleiniger A-Raf Expression (unveröffentlichte Ergebnisse). Nach Co-Transfektion von gag-A-Raf und der PKM2 K366M Mutante (→ 3.6.12.1), bei der die mutmaßliche ATP-Bindungsstelle mutiert ist¹⁶²⁻¹⁶⁵ und damit die A-Raf PKM2 Kooperationen blockiert, wurde der kooperative Focus-induzierende Effekt von A-Raf und PKM2 unterdrückt ((Abb. 45).unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Ergebnisse konnte J.Troppmair (MSZ) durch einen „Colony yield assay“²⁰⁰ bestätigen. Er konnte zeigen, dass die PKM2 K366M Mutante die Koloniebildung

von stabilen A-Raf exprimierenden NIH 6A-leuk Zellen reduzieren konnte. Unter G418 Selektion wuchsen nur 156 Kolonien/ μg transfizierte DNA, während bei der PKM2 Wild-Typ Expression 576 Kolonien/ μg DNA aufwuchsen

Der vielfältige Schritte umfassende Weg der Karzinogenese in Leber und Niere beinhaltet unter anderem den frühen Verlust der gewebetypischen Pyruvatkinase Isoenzym L und die Re-Expression der embryonalen Pyruvatkinase Isoenzym M2. In späteren Stadien der Karzinogenese wird die PKM2 sogar überexprimiert^{111,131,191,197}. Die Konzentration von PKM2 im Blut dieser Tumorpatienten ist erhöht und seine Eignung als Tumormarker für das Nierenzellcarcinom ist in Erprobung^{201,202}. Allerdings wird, wie auch bei der Onkogen-getriggerten Karzinogenese, die alleinige Expression der PKM2 für die Entwicklung von Tumoren nicht hinreichend sein.



Transformation von NIH 3T3 Zellen durch A-Raf erhöht die Menge und den Phosphoringehalt der PKM2 (unveröffentlichte Ergebnisse). Auch Tumorzelllinien wie pp60^{v-src}-transformierte NIH 3T3 Zellen und Gliomzelllinien zeigen einen vergleichbaren Anstieg des Phosphorylierungsgrades der PKM2^{198,203,204}. Bei NIH 3T3 Fibroblasten, die mit einer Temperatur-sensitiven Mutante der pp60^{v-src}-Kinase transformiert wurden, führte eine schrittweise Aktivierung der pp60^{v-src}-Kinase zu einer gesteigerten PKM2 Phosphorylierung, die innerhalb von 3 Stunden zur Akkumulation der dimerischen Form führte. Die nachfolgende *de novo* Synthese des hochaktiven, tetrameren Enzyms (innerhalb von 6-16 h) wirkte der Inaktivierung entgegen²⁰⁴. Andere Untersuchungen zeigten, dass bei der Transformation normaler Nierenzellen der Ratte (NRK) ein Zusammenspiel von aktiviertem Ras, welches das PKM2 Protein und dessen Aktivität stark hochregulierte, und der direkte

Effekt von E7 auf das Tetramer/Dimer Verhältnis erforderlich war. Dabei zeigte sich eine Verschiebung des Tetramer/Dimer-Verhältnisses zu Gunsten der Dimere¹²⁹. Eine Verlagerung der PKM2 in Richtung des hochaktiven Tetramers, wie diese bei Co-Transformationsexperimenten von J. Beigel (MSZ) beobachtet wurde, erhöhte die Fokusbildung. Dagegen reduzierte die enzymatisch inaktive, dimere Form der PKM2 die Fokusbildung (unveröffentlichte Ergebnisse). Für die Transformation einer Zelle scheinen somit zwei Ereignisse erforderlich zu sein: Eine Erhöhung von Menge und Aktivität des PKM2 Proteins und die gleichzeitige Veränderung des Tetramer/Dimer Verhältnisses.

4.2.2 Beeinflussung der Energiegewinnung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führten zu weiteren Untersuchungen des Energiestoffwechsels in A-Raf transformierten NIH 3T3 Zellen. S. Mazurek (Institut für Veterinärmedizin, Gießen) konnte zeigen, dass in diesen Zellen A-Raf zusammen mit PKM2 eine signifikant erhöhte Glykolyse und Glutaminolyse induziert (unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei führte die erhöhte Verfügbarkeit von Pyruvat (gesteigerte Glykolyse) für die Glutamattransaminierung zu einer Erhöhung der Glutaminolyse^{197,205}. Unter hypoxischen Bedingungen stellt die Erhöhung der glykolytischen Durchflussrate einen Überlebensvorteil dar, da die anaerobe Energiegewinnung deutlich energieärmer ist als die aerobe (Pasteur-Effekt). Eine noch suffizientere Verwertung von Glukose bei A-Raf transformierten NIH 3T3 Zellen und gesteigerter PKM2 Aktivität macht Tumorzellen voraussichtlich noch widerstandsfähiger gegenüber hypoxischen Bedingungen. Dies könnte zu einer positiven Selektion onkogen transformierter Zellen führen. Für diese Theorie spricht außerdem, dass bei limitiertem Glucoseangebot c-myc transformierte NIH 3T3 Zellen in die Apoptose gehen^{113,125}, nicht transformierte Zellen verbleiben unter Glucosedeprivation jedoch in der G1-Phase. Da Tumorzellen in soliden Tumoren auch bei variierenden Glucose- und Sauerstoffvorkommen überleben müssen, weisen sie einerseits eine hohe glykolytische und glutaminolytische Durchflussrate auf (Warburg-Effekt) und andererseits exprimieren sie eine große Menge der PKM2^{109, 111,206}. Nur so scheint es der Tumorzelle möglich zu sein, das eigene Überleben durch Bereitstellung von Energie zu sichern und außerdem ausreichend Metabolite für die Proliferation und damit das Wachstum des Tumors bereitzustellen, da in proliferierenden Zellen neben der mitochondrialen Glutaminolyse nur die Pyruvatkinase-Reaktion zur ATP-Regeneration zur Verfügung steht^{108,186-195,197,207}. Der „Switch“ zwischen der tetrameren und dimeren Form der PKM2 erlaubt somit eine optimale und schnelle Regulation, je nachdem ob Glucose für Synthesvorgänge oder für Energieproduktion

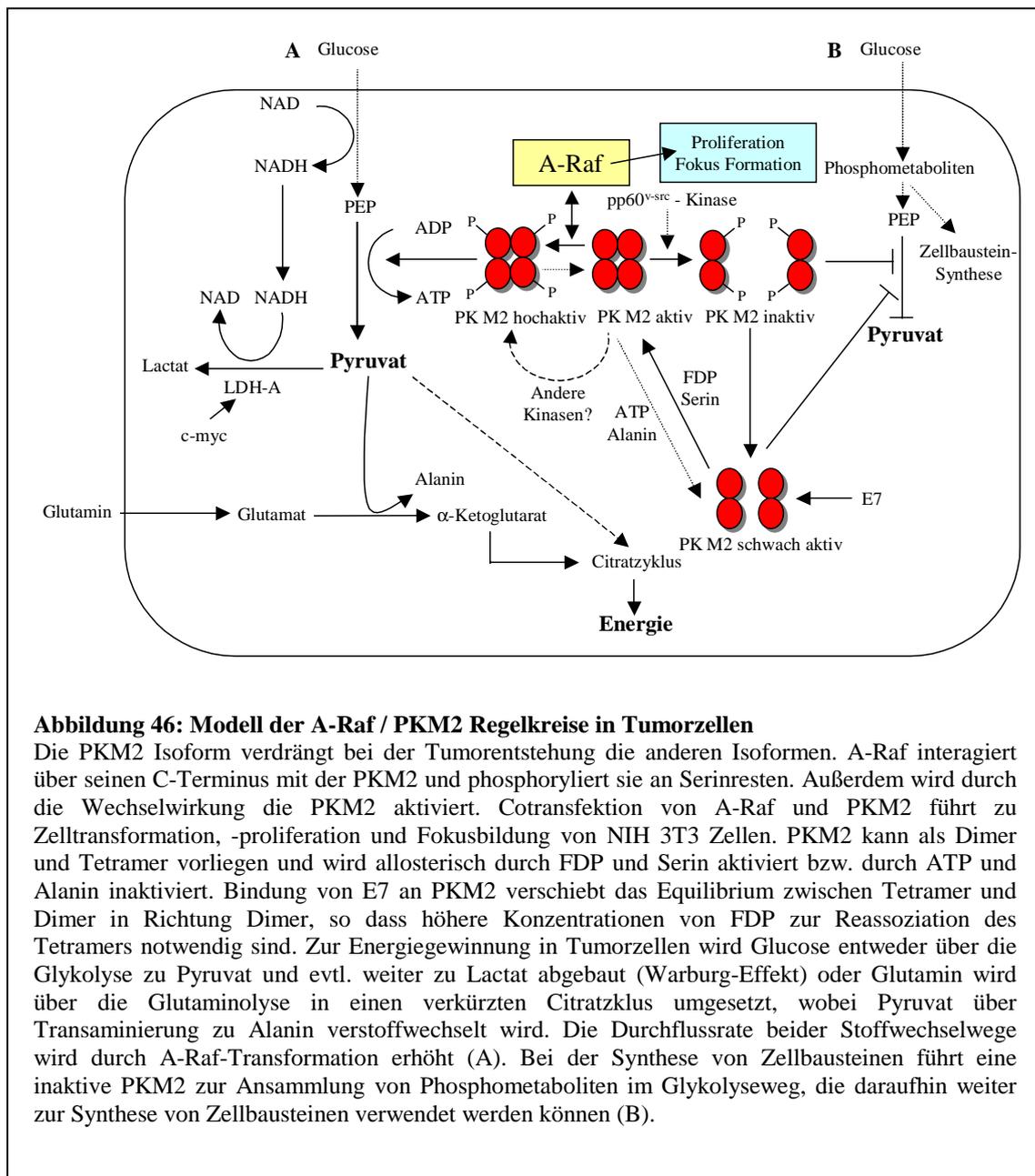


Abbildung 46: Modell der A-Raf / PKM2 Regelkreise in Tumorzellen

Die PKM2 Isoform verdrängt bei der Tumorentstehung die anderen Isoformen. A-Raf interagiert über seinen C-Terminus mit der PKM2 und phosphoryliert sie an Serinresten. Außerdem wird durch die Wechselwirkung die PKM2 aktiviert. Cotransfektion von A-Raf und PKM2 führt zu Zelltransformation, -proliferation und Fokusbildung von NIH 3T3 Zellen. PKM2 kann als Dimer und Tetramer vorliegen und wird allosterisch durch FDP und Serin aktiviert bzw. durch ATP und Alanin inaktiviert. Bindung von E7 an PKM2 verschiebt das Equilibrium zwischen Tetramer und Dimer in Richtung Dimer, so dass höhere Konzentrationen von FDP zur Reassoziierung des Tetramers notwendig sind. Zur Energiegewinnung in Tumorzellen wird Glucose entweder über die Glykolyse zu Pyruvat und evtl. weiter zu Lactat abgebaut (Warburg-Effekt) oder Glutamin wird über die Glutaminolyse in einen verkürzten Citratzyklus umgesetzt, wobei Pyruvat über Transaminierung zu Alanin verstoffwechselt wird. Die Durchflussrate beider Stoffwechselwege wird durch A-Raf-Transformation erhöht (A). Bei der Synthese von Zellbausteinen führt eine inaktive PKM2 zur Ansammlung von Phosphometaboliten im Glykolyseweg, die daraufhin weiter zur Synthese von Zellbausteinen verwendet werden können (B).

benötigt wird. Die relativ träge Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels durch Hemmung bzw. Stimulation der Biosynthese von Schlüsselenzymen, die mehrere Stunden dauern kann, kann so durch posttranslationale Enzymmodifikation erweitert werden.

4.2.3 Mögliche Therapieansätze

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass transformiertes A-Raf die PKM2 nicht nur phosphoryliert, sondern zusätzlich deren Aktivität steigert, indem PKM2 vermehrt in die tetramere Form überführt wird. Die Zelltransformation ist also wesentlich von dieser Interaktion und der Existenz des onkogenen A-Raf abhängig. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse bieten sich neue mögliche Ansatzpunkte zur Entwicklung spezifischer Tumormarker. Analog dem PSA, das spezifisch von Tumorzellen des Prostatakarzinoms

exprimiert wird und daher bei der Frühdiagnose von Prostatakrebs breite Anwendung findet²⁰⁸, könnte durch den spezifischen Nachweis einer PKM2, die an charakteristischen Serinresten phosphoryliert ist, der sensitive Nachweis transformierender Zellen erhöht werden. Bei der Differenzierung der Phosphorylierungsstellen (Tyrosin-Phosphorylierung durch pp60^{v-src}) und des Tetramer/Dimer – Verhältnisses (HPV-16 E7 Bindung an PKM2) läßt sich zukünftig möglicherweise der Aktivierungsgrad der PKM2 quantifizieren. Dies könnte ein Weg hin zur Entwicklung selektiver Tumormarker sein.

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt zur Krebsbekämpfung bietet sich in der selektiven Blockade bestimmter, durch Onkogene aktivierte Signalwege. So konnte erst kürzlich ein selektiver MEK Inhibitor hergestellt werden, der bei Mäusen mit Kolonkarzinomen in 80% der Fälle die Progression des Tumorwachstums stoppen konnte^{209,210}. Geht man im Falle der A-Raf-PKM2 Interaktion davon aus, dass diese Wechselwirkung spezifisch für A-Raf aktivierte und PKM2 exprimierende Zellen ist, könnten selektive Inhibitoren an die jeweiligen Bindungsstellen binden und dadurch die Interaktion hemmen. Die Herstellung einer PKM2 Mutante, deren putative Serin-Phosphorylierungsstellen mutiert sind (→ 3.6.11) kann auf der Suche nach geeigneten Inhibitoren ein wertvolles Werkzeug sein. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob die Mutation solcher Serinreste Auswirkungen auf die Aktivität der PKM2 in A-Raf transformierten Zellen hat. Falls ein Aktivitätsverlust der PKM2 feststellbar ist, könnten möglicherweise niedermolekulare Inhibitoren entwickelt werden. Geht man davon aus, dass erst die Vernetzung zwischen den verschiedenen Signalwegen den vollständigen malignen Phänotyp eines Karzinoms ermöglicht (eine Kondition, die von Weinstein „Gene addiction“ genannt wurde²¹¹), so wäre es in Zukunft auch möglich, die volle Ausprägung eines malignen Tumors durch die Blockade krebsrelevanter Signalwege zu verhindern.

ZUSAMMENFASSUNG

Die klassische Signaltransduktionskaskade, auch MAP Kinase Kaskade genannt, ist wesentlich an der Regulation zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Proteinkinasen der Raf-Familie wirken dort als signalübertragende Elemente, welche Membranrezeptoren nachgeschaltet sind. Diese Proteine fungieren als Proto-Onkogene, eine Veränderung dieser Proteine kann sie in Onkogene überführen und sind wesentlich an der Krebsentstehung beteiligt. Während die Rolle von c-Raf als MEK-Aktivator innerhalb des klassischen Signaltransduktionsweges gut charakterisiert ist, so ist nur wenig über die beiden anderen Isoformen A-Raf und B-Raf bekannt.

Die Existenz von drei verschiedenen Raf-Isoformen bei Säugern, ihre evolutionär konservierten strukturellen Unterschiede und ihre spezifische aber überlappende Gewebeverteilung weisen auf isoformspezifische Funktionen in der Zelle hin. In Versuchen mit PC12 Zellen sowie der Auswertung des Phänotyps von B-Raf und A-Raf knock-out Mäusen ergaben sich Hinweise auf unterschiedliche Regulation und Funktion dieser Isoformen. Dass isoformspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen an diesem Regelmechanismus beteiligt sein können, zeigte die Identifizierung von A- und B-Raf-spezifischen Interaktionspartnern. Eine Isolierung von neuen isoformtypischen Effektoren, die in den weit verzweigten Regelkreis der Karzinogenese involviert sind, könnte einerseits zu einem besseren Verständnis der Krebsentstehung führen und zum anderen die verschiedenen Funktionen der einzelnen Isoformen besser charakterisieren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei PC12 cDNA-Bibliotheken unter Verwendung des Two-Hybrid Systems mit A-Raf und mit c-Raf zur Isolierung neuer Raf-Interaktionspartner untersucht.

Für c-Raf wurden die Wechselwirkungen mit den bekannten Interaktionspartnern bestätigt, es wurden jedoch keine neuen Bindungspartner identifiziert. Im A-Raf Two Hybrid Screen konnte zum einen Prolyl 4-Hydroxylase als Schlüsselenzym der Kollagensynthese isoliert werden. Es wurde keine Wechselwirkung zwischen Prolyl 4-Hydroxylase und c-Raf oder B-Raf beobachtet. Die Prolyl 4-Hydroxylase Bindungsstelle konnte innerhalb der N-terminalen variablen Region von A-Raf lokalisiert werden. Zum anderen wurde die Pyruvatkinase M2 als A-Raf spezifischer Bindungspartner identifiziert. Für diese Wechselwirkung war die c-terminale Region von A-Raf ausreichend. Durch Mutation zweier Aminosäuren im c-terminalen Teil von A-Raf konnte diese Wechselwirkung verhindert werden, wobei die Interaktion zu MEK und Ras dadurch nicht beeinträchtigt

wurde. Ein kooperativer Effekt auf die Zelltransformation wurde durch Co-Transfektion von NIH Zellen mit onkogenem A-Raf und Pyruvatkinase M2 gezeigt. Diese führte zu doppelt so vielen Foci wie die Transfektion mit A-Raf alleine. Die Mutation der mutmaßlichen ATP-Bindungsstelle der Pyruvatkinase M2, welche die A-Raf Pyruvatkinase M2 Kooperation blockieren sollte, verhinderte diesen synergistischen Effekt. Diese Ergebnisse weisen auf eine Regulation der Pyruvatkinase M2 durch A-Raf hin und lassen den Schluss zu, dass die funktionelle Interaktion mit der Pyruvatkinase M2 durch onkogenes A-Raf für die Zelltransformation notwendig ist.

Als zwei neue Raf-Interaktionspartner wurden Prolyl 4-Hydroxylase und Pyruvatkinase M2 identifiziert, welche Raf-Isoform spezifische Bindung zeigen. Auf diese Weise konnte eine direkte Verbindung zwischen der transformierenden MAP Kinase Kaskade und dem Energiestoffwechsel hergestellt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Lodish H & Darnell, J. *Molekulare Zellbiologie* 2. Auflage. *Walter de Gruyter* (1996).
2. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).
3. Hunter, T. A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823-829 (1987).
4. Lemmin, M.A. & Schlessinger, J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TIBS* **19**, 459-463 (1994).
5. Anderson, D. *et al.* Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and src to activated growth factor receptors. *Science* **250**, 979-982 (1990).
6. Cohen, G.B., Ren, R. & Baltimore, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237-248 (1995).
7. Pawson, T. & Gish, G.D. SH2 and SH3 domains: From structure to function. *Cell* **71**, 359-362 (1991).
8. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580 (1995).
9. Buday, L. & Downward, J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, grb2 adaptor protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620 (1993).
10. Chardin, P. *et al.* Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. *Science* **260**, 1338-1343 (1993).
11. Bonfini, L., Karlovich, C.A., Dasgupta, C. & Banerjee, U. The son of sevenless gene product: A putative activator of Ras. *Science* **255**, 603-606 (1992).
12. Katz, M.E. & McCormick, F. Signal transduction from multiple Ras effectors. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 75-79 (1997).
13. Schlessinger, J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 273-275 (1993).
14. Buard, A., Zipfel, P.A., Frey, R.S. & Mulder, K.M. Maintenance of growth factor signaling through Ras in human colon carcinoma cells containing K-ras mutations. *Int. J. Cancer* **67**, 539-546 (1996).
15. Avruch, J., Zhang, X.F. & Kyriakis, J.M. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 279-283 (1994).
16. Hallberg, B., Rayter, S.I. & Downward, J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 3913-3916 (1994).
17. Howe, L.R. *et al.* Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**, 335-342 (1992).
18. Leever, S.J., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414 (1994).
19. Magnuson, N.S. *et al.* The Raf-1 serine/threonine protein kinase. *Semin. Cancer Biol.* **5**, 247-253 (1994).

20. Roy,S., Lane,A., Yan,J., McPherson,R. & Hancock,J.F. Activity of plasma membrane-recruited Raf-1 is regulated by Ras via the Raf zinc finger. *J. Biol. Chem.* **272**, 20139-20145 (1997).
21. Stokoe,D., Macdonald,S.G., Cadwallader,K., Symons,M. & Hancock,J.F. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane [see comments] [published erratum appears in Science 1994 Dec 16;266(5192):1792-3]. *Science* **264**, 1463-1467 (1994).
22. Van Aelst,L., Barr,M., Marcus,S., Polverino,A. & Wigler,M. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 6213-6217 (1993).
23. Vojtek,A.B., Hollenberg,S.M. & Cooper,J.A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214 (1993).
24. Warne,P.H., Viciano,P.R. & Downward,J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* **364**, 352-355 (1993).
25. Zhang,X.F. *et al.* Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**, 308-313 (1993).
26. Daum,G., Eisenmann-Tappe,I., Fries,H.W., Troppmair,J. & Rapp,U.R. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 474-480 (1994).
27. Dent,P., Reardon,D.B., Morrison,D.K. & Sturgill,T.W. Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro [published erratum appears in Mol Cell Biol 1995 Sep;15(9):5203]. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4125-4135 (1995).
28. Hafner,S. *et al.* Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* **14**, 6696-6703 (1994).
29. Dent,P. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro [see comments]. *Science* **257**, 1404-1407 (1992).
30. Huang,W., Alessandrini,A., Crews,C.M. & Erikson,R.L. Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10947-10951 (1993).
31. Jelinek,T. *et al.* RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol. Cell Biol.* **14**, 8212-8218 (1994).
32. Kolch,W., Heidecker,G., Lloyd,P. & Rapp,U.R. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* **349**, 426-428 (1991).
33. Kyriakis,J.M. *et al.* Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421 (1992).
34. Troppmair,J. *et al.* Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J. Biol. Chem.* **269**, 7030-7035 (1994).
35. Boulton,T.G. *et al.* Erks: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675 (1991).
36. Burgering,B.M.T. & Bos,J.L. Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 18-22 (1995).
37. Gómez,N. & Cohen,P. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**, 170-173 (1991).
38. Blenis,J. Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 5889-5892 (1993).

39. Ludwig,S. *et al.* 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6687-6697 (1996).
40. Wood,K.W., Sarnecki,C., Roberts,T.M. & Blenis,J. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal- transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**, 1041-1050 (1992).
41. Ferrell,J.E., Jr. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs [see comments]. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 460-466 (1996).
42. Ferrell,J.E., Jr. How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade [letter; comment]. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 288-289 (1997).
43. Brown,G.C., Hoek,J.B. & Kholodenko,B.N. Why do protein kinase cascades have more than one level? [letter; comment] [see comments]. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 288 (1997).
44. Huang,C.Y. & Ferrell,J.E., Jr. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 10078-10083 (1996).
45. Ferrel Jr.,J.E. Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *TIBS* **21**, 460-466 (1996).
46. Ferrell,J.E., Jr. & Machleder,E.M. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in *Xenopus* oocytes [see comments]. *Science* **280**, 895-898 (1998).
47. Kholodenko,B.N. Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades [In Process Citation]. *Eur. J. Biochem* **267**, 1583-1588 (2000).
48. Force,T. *et al.* Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 1270-1274 (1994).
49. Mark,G.E. & Rapp,U.R. Primary structure of v-raf: relatedness to the src family of oncogenes. *Science* **224**, 285-289 (1984).
50. Moelling,K., Heimann,B., Beimling,P., Rapp,U.R. & Sander,T. Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag-raf proteins. *Nature* **312**, 558-561 (1984).
51. Rapp,U.R. *et al.* Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 4218-4222 (1983).
52. Rapp,U.R. *et al.* Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a raf(mil)/myc recombinant murine retrovirus. *J. Virol.* **55**, 23-33 (1985).
53. Kozak,C., Gunnell,M.A. & Rapp,U.R. A new oncogene, c-raf, is located on mouse chromosome 6. *J. Virol.* **49**, 297-299 (1984).
54. Bonner,T. *et al.* The human homologs of the raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4. *Science* **223**, 71-74 (1984).
55. Cuadrado,A. *et al.* H-ras and raf-1 cooperate in transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **8**, 2443-2448 (1993).
56. Kerkhoff,E. *et al.* Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. *Cell Growth Differ* **11**, 185-190 (2000).
57. Storm,S.M. & Rapp,U.R. Oncogene activation: c-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors. *Toxicol. Lett.* **67**, 201-210 (1993).

-
58. Fukui,M., Yamamoto,T., Kawai,S., Maruo,K. & Toyoshima,K. Detection of a raf-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 5954-5958 (1985).
 59. Shimizu,K. *et al.* Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to v-raf, from primary stomach cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 5641-5645 (1985).
 60. Ishikawa,F. *et al.* Activated c-raf gene in a rat hepatocellular carcinoma induced by 2- amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 186-192 (1985).
 61. Ishikawa,F., Takaku,F., Nagao,M. & Sugimura,T. Rat c-raf oncogene activation by a rearrangement that produces a fused protein. *Mol. Cell Biol.* **7**, 1226-1232 (1987).
 62. Stanton,V.P., Jr. & Cooper,G.M. Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino- terminal coding sequences. *Mol. Cell Biol.* **7**, 1171-1179 (1987).
 63. Avruch,J., Zhang,X.F. & Kyriakis,J.M. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 279-283 (1994).
 64. Bonner,T.I. *et al.* The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1009-1015 (1986).
 65. Sathanandam,G., Kolch,W., Duh,F.M. & Rapp,U.R. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogene* **5**, 1775-1780 (1990).
 66. Stephens,R.M. *et al.* 95-kilodalton B-Raf serine/threonine kinase: identification of the protein and its major autophosphorylation site. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3733-3742 (1992).
 67. Beck,T.W., Huleihel,M., Gunnell,M., Bonner,T.I. & Rapp,U.R. The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Res.* **15**, 595-609 (1987).
 68. Heidecker,G., Kolch,W., Morrison,D.K. & Rapp,U.R. The role of Raf-1 phosphorylation in signal transduction. *Adv. Cancer Res.* **58**, 53-73 (1992).
 69. Morrison,D.K. The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signals. *Cancer Cells* **2**, 377-382 (1990).
 70. Rapp,U.R. Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. *Oncogene* **6**, 495-500 (1991).
 71. Naumann,U., Hoffmeyer,A., Flory,E. & Rapp,U. Raf protein serine/threonine kinases. In: Protein phosphorylation. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim* 203-236 (1996).
 72. Storm,S.M., Cleveland,J.L. & Rapp,U.R. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* **5**, 345-351 (1990).
 73. Ghosh,S. *et al.* 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 (1994).
 74. Fabian,J.R., Daar,I.O. & Morrison,D.K. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol. Cell Biol.* **13**, 7170-7179 (1993).
 75. Morrison,D.K. *et al.* Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF beta-receptor. *Cell* **58**, 649-657 (1989).
 76. Inouye,K., Mizutani,S., Koide,H. & Kaziro,Y. Formation of the ras dimer is essential for raf-1 activation [In Process Citation]. *J. Biol. Chem.* **275**, 3737-3740 (2000).

-
77. Tzivion,G., Luo,Z. & Avruch,J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**, 88-92 (1998).
 78. Rommel,C. *et al.* Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf- 1. *Oncogene* **12**, 609-619 (1996).
 79. Roy,S. *et al.* 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3947-3955 (1998).
 80. Mason,C.S. *et al.* Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* **18**, 2137-2148 (1999).
 81. Weber,C.K. *et al.* Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene* **19**, 169-176 (2000).
 82. Catling,A.D., Reuter,C.W., Cox,M.E., Parsons,S.J. & Weber,M.J. Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 30014-30021 (1994).
 83. Yamamori,B. *et al.* Purification of a Ras-dependent mitogen-activated protein kinase kinase kinase from bovine brain cytosol and its identification as a complex of B-Raf and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 11723-11726 (1995).
 84. Reuter,C.W., Catling,A.D., Jelinek,T. & Weber,M.J. Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *J. Biol. Chem.* **270**, 7644-7655 (1995).
 85. Traverse,S. & Cohen,P. Identification of a latent MAP kinase kinase kinase in PC12 cells as B- raf. *FEBS Lett.* **350**, 13-18 (1994).
 86. Wixler,V., Smola,U., Schuler,M. & Rapp,U. Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett.* **385**, 131-137 (1996).
 87. York,R.D. *et al.* Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**, 622-626 (1998).
 88. Wojnowski,L. *et al.* Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice [see comments]. *Nat. Genet.* **16**, 293-297 (1997).
 89. Bogoyevitch,M.A., Marshall,C.J. & Sugden,P.H. Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c- Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26303-26310 (1995).
 90. Pritchard,C.A., Bolin,L., Slattery,R., Murray,R. & McMahon,M. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr. Biol.* **6**, 614-617 (1996).
 91. Kalmes,A. *et al.* Interaction between the protein kinase B-Raf and the alpha-subunit of the 11S proteasome regulator. *Cancer Res.* **58**, 2986-2990 (1998).
 92. Hagemann,C. *et al.* The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett.* **403**, 200-202 (1997).
 93. Boldyreff,B. & Issinger,O.G. A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett.* **403**, 197-199 (1997).
 94. Warburg,O. *Science* **123**, 309-314 (1956).
 95. Stryer,L. *Biochemistry.* W.H. Freeman, New York (1988).

96. Warburg,O. The metabolism of Tumours. Constable, (1930).
97. Warburg,O. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer Verlag Berlin, (1926).
98. Crabtree,H.D. *Biochem J.* **23**, 536-545 (1929).
99. Pederson,P.L. *Prog. Exp. Tumor Res* **22**, 190-274 (1978).
100. Racker,E. & Spector,M. *Science* **213**, 1313 (1991).
101. Gatenby,R.A. The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction. *Cancer Res* **55**, 4151-4156 (1995).
102. Shim,H. *et al.* c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6658-6663 (1997).
103. Marcu,K.B., Bossone,S.A. & Patel,A.J. myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 809-860 (1992).
104. Dalla-Favera,R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 7824-7827 (1982).
105. Potter,M. & Wiener,F. Plasmacytomagenesis in mice: model of neoplastic development dependent upon chromosomal translocations. *Carcinogenesis* **13**, 1681-1697 (1992).
106. Evan,G.I. & Littlewood,T.D. The role of c-myc in cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 44-49 (1993).
107. Packham,G. & Cleveland,J.L. c-Myc and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1242**, 11-28 (1995).
108. Mazurek,S., Boschek,C.B. & Eigenbrodt,E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 315-330 (1997).
109. Eigenbrodt,E., Kallinowski,F., Ott,M., Mazurek,S. & Vaupel,P. Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors. *Anticancer Res.* **18**, 3267-3274 (1998).
110. Eigenbrodt,E., Reinacher,M., Scheefers-Borchel,U., Scheefers,H. & Friis,R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit Rev. Oncog.* **3**, 91-115 (1992).
111. Mazurek,S., Eigenbrodt,E., Failing,K. & Steinberg,P. Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells. *J. Chromatogr.* **181**, 136-146 (1999).
112. Iyer,N.V. *et al.* Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* **12**, 149-162 (1998).
113. Carmeliet,P. *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis [published erratum appears in Nature 1998 Oct 1;395(6701):525]. *Nature* **394**, 485-490 (1998).
114. Ryan,H.E., Lo,J. & Johnson,R.S. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **17**, 3005-3015 (1998).
115. Semenza,G.L. *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529-32537 (1996).

116. Firth,J.D., Ebert,B.L. & Ratcliffe,P.J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* **270**, 21021-21027 (1995).
117. Fields,S. & Song,O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
118. Estojak,J., Brent,R. & Golemis,E.A. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5820-5829 (1995).
119. Fields,S. & Sternglanz,R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *TIG* **10**, 286-292 (1994).
120. Licitra,E.J. & Liu,J.O. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 12817-12821 (1996).
121. Leanna,C.A. & Hannink,M. The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res* **24**, 3341-3347 (1996).
122. Vidal,M., Brachmann,R.K., Fattaey,A., Harlow,E. & Boeke,J.D. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociations of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 10321-10326 (1996).
123. Aronheim,A. The sos-recruitment assay - a new type of two-hybrid system. *Trends in Cell Biology* **7**, 211 (1997).
124. McCormick,F. Signalling networks that cause cancer. *Trends in Cell Biology* **9**, 53-56 (1999).
125. Dang,C.V. & Semenza,G.L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68-72 (1999).
126. Papas,K.K. *et al.* Change in lactate production in Myc-transformed cells precedes apoptosis and can be inhibited by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett.* **446**, 338-342 (1999).
127. Shimizu,K., Nakatsu,Y., Oh-uchida,M., Nomoto,S. & Sekiguchi,M. [Activated c-raf-1 gene from human stomach cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* **14**, 2140-2146 (1987).
128. Shim,H., Chun,Y.S., Lewis,B.C. & Dang,C.V. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 1511-1516 (1998).
129. Zwerschke,W. *et al.* Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1291-1296 (1999).
130. Wilson,I.A. *et al.* The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* **37**, 767-778 (1984).
131. Brinck,U., Eigenbrodt,E., Oehmke,M., Mazurek,S. & Fischer,G. L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases. *Virchows Arch.* **424**, 177-185 (1994).
132. Chevray,P.M. & Nathans,D. Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5789-5793 (1989).
133. Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989).
134. Ausubel,F.M. *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, New York, (1987).
135. Inoue,H., Nojima,H. & Okayama,H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).

-
136. Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
 137. Gruenwald,S. & Heitz,J. Baculovirus expression vector system: Procedures & methods manual. *Pharming* (1993).
 138. King,L.A. & Possee,R.D. The baculovirus expression system: A Laboratory guide. *Chapman & Hall* (1992).
 139. O'Reilly,D.R., Miller,L.K. & Luckow,V.A. Baculovirus expression vectors. *Oxford University Press* (1994).
 140. Elble,R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-20 (1992).
 141. Schiestl,R.H. & Gietz,R.D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346 (1989).
 142. Kaiser,C., Michaelis,S. & Mitchell,A. Methods in yeast genetics. A Cold spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1994).
 143. Petit,J., Boisseau,P. & Arveiler,B. Glucanex: a cost-effective yeast lytic enzyme. *TIG* **19**, 377-382 (1994).
 144. Wu,X., Noh,S.J., Zhou,G., Dixon,J.E. & Guan,K.L. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 3265-3271 (1996).
 145. Zhou,G., Bao,Z.Q. & Dixon,J.E. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 12665-12669 (1995).
 146. Pritchard,C.A., Samuels,M.L., Bosch,E. & McMahon,M. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **15**, 6430-6442 (1995).
 147. Hagemann,C. & Rapp,U.R. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 34-46 (1999).
 148. Wang,H.G., Takayama,S., Rapp,U.R. & Reed,J.C. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf- 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 7063-7068 (1996).
 149. Hagemann,D., Troppmair,J. & Rapp,U.R. Cot protooncprotein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells. *Oncogene* **18**, 1391-1400 (1999).
 150. Fang,X. *et al.* Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen- activated protein kinase pathway. *Oncogene* **18**, 6635-6640 (1999).
 151. Miller,R.A. Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine* **18**, 1654-1660 (2000).
 152. Hopkinson,I. *et al.* The complete cDNA derived sequence of the rat prolyl 4-hydroxylase alpha subunit. *Gene* **149**, 391-392 (1994).
 153. Ikeda,Y., Tanaka,T. & Noguchi,T. Conversion of non-allosteric pyruvate kinase isozyme into an allosteric enzyme by a single amino acid substitution. *J. Biol. Chem.* **272**, 20495-20501 (1997).
 154. Gerbracht,U., Roth,E., Becker,K., Reinacher,M. & Eigenbrodt,E. A study of the activities of carbohydrate-metabolizing enzymes and the levels of carbohydrate metabolites and amino acids in normal liver and in hepatocellular carcinoma. *Experimental hepatocarcinogenesis* 163-174 (1988).

155. Hugo,F., Mazurek,S., Zander,U. & Eigenbrodt,E. In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: inhibition of glycolysis and cell proliferation. *Cell Physiol.* **153**, 539-549 (1992).
156. Mazurek,S., Hugo,F., Failing,K. & Eigenbrodt,E. Studies on associations of glycolytic and glutaminolytic enzymes in MCF- 7 cells: role of P36. *J. Cell Physiol* **167**, 238-250 (1996).
157. Ikeda,Y. & Noguchi,T. Allosteric regulation of pyruvate kinase M2 isozyme involves a cysteine residue in the intersubunit contact. *J. Biol. Chem.* **273**, 12227-12233 (1998).
158. Heisermann,G.J. & Gill,G.N. Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo. *J. Biol. Chem.* **263**, 13152-13158 (1988).
159. Beck,T.W., Huleihel,M., Gunnell,M., Bonner,T.I. & Rapp,U.R. The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Res.* **15**, 595-609 (1987).
160. Huleihel,M. *et al.* Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2655-2662 (1986).
161. Rapp,U.R., Cleveland,J.L., Storm,S.M., Beck,T.W. & Huleihel,M. Transformation by raf and myc oncogenes. *Princess Takamatsu Symp.* **17**, 55-74 (1986).
162. Eyzaguirre,J. *et al.* Pyruvate kinase: studies on affinity labeling and active-site structure using the rabbit muscle enzyme. *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago.)* **18**, 317-323 (1985).
163. Speranza,M.L. *et al.* Primary structure of three peptides at the catalytic and allosteric sites of the fructose-1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinase from Escherichia coli. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 211-216 (1989).
164. Murcott,T.H., McNally,T., Allen,S.C., Fothergill-Gilmore,L.A. & Muirhead,H. Purification, characterisation and mutagenesis of highly expressed recombinant yeast pyruvate kinase. *Eur. J. Biochem.* **198**, 513-519 (1991).
165. Vollmer,S.H., Walner,M.B., Tarbell,K.V. & Colman,R.F. Guanosine 5'-O-[S-(4-bromo-2,3-dioxobutyl)]thiophosphate and adenosine 5'-O-[S-(4-bromo-2,3-dioxobutyl)]thiophosphate. New nucleotide affinity labels which react with rabbit muscle pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 8082-8090 (1994).
166. Erhardt,P., Troppmair,J., Rapp,U.R. & Cooper,G.M. Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5524-5530 (1995).
167. Gelman,I.H., XI,Q. & Kumar,C.C. Reexpression of the major PKC substrate, SSeCKS, correlates with the tumor-suppressive effects of SCH51344 on rat-6/src and rat-6/ras fibroblasts but not on rat-6/raf fibroblasts [In Process Citation]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **886**, 221-224 (1999).
168. Pihlajaniemi,T. *et al.* Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J.* **6**, 643-649 (1987).
169. Koivu,J. *et al.* A single polypeptide acts both as the beta subunit of prolyl 4- hydroxylase and as a protein disulfide-isomerase. *J. Biol. Chem.* **262**, 6447-6449 (1987).
170. Pihlajaniemi,T., Myllyla,R. & Kivirikko,K.I. Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *J. Hepatol.* **13 Suppl 3**, S2-S7 (1991).
171. Matsui,H. *et al.* Collagen biosynthesis in gastric cancer: immunohistochemical analysis of prolyl 4-hydroxylase. *J. Surg. Oncol.* **70**, 239-246 (1999).

-
172. Annunen,P., Koivunen,P. & Kivirikko,K.I. Cloning of the alpha subunit of prolyl 4-hydroxylase from *Drosophila* and expression and characterization of the corresponding enzyme tetramer with some unique properties. *J. Biol. Chem.* **274**, 6790-6796 (1999).
 173. van Gool,J., de,N., I, Smit,J. & Zuyderhoudt,F.M. Mechanisms by which acute phase proteins enhance development of liver fibrosis: effects on collagenase and prolyl-4-hydroxylase activity in the rat liver. *Exp. Mol. Pathol.* **45**, 160-170 (1986).
 174. Sakaida,I., Uchida,K., Hironaka,K. & Okita,K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J. Gastroenterol.* **34**, 376-377 (1999).
 175. Kawaguchi,Y. *et al.* Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis: contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J. Rheumatol.* **19**, 1195-1201 (1992).
 176. Mahara,K. *et al.* Transforming growth factor beta 1 secreted from scirrhous gastric cancer cells is associated with excess collagen deposition in the tissue. *Br. J. Cancer* **69**, 777-783 (1994).
 177. Axmann,A., Seidel,D., Reimann,T., Hempel,U. & Wenzel,K.W. Transforming growth factor-beta1-induced activation of the Raf-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 456-460 (1998).
 178. Reimann,T. *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells. *FEBS Lett.* **403**, 57-60 (1997).
 179. Consler,T.G., Woodard,S.H. & Lee,J.C. Effects of primary sequence differences on the global structure and function of an enzyme: a study of pyruvate kinase isozymes. *Biochemistry* **28**, 8756-8764 (1989).
 180. Imamure,K. Pyruvate kinase isoenzymes from rat. Tanaka, T. 90, 150-162. 1982. *Methods of Enzymology*, Academic Press.
Ref Type: Generic
 181. Imamura,K. & Tanaka,T. Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods Enzymol.* **90 Pt E**, 150-165 (1982).
 182. Noguchi,T., Yamada,K., Inoue,H., Matsuda,T. & Tanaka,T. *J. Biol. Chem.* **262**, 14366-14371 (1987).
 183. Noguchi,T., Inoue,H. & Tanaka,T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807-13812 (1986).
 184. Noguchi,T., Yamada,K., Inoue,H., Matsuda,T. & Tanaka,T. The L- and R-type isoenzyme of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by using different promoters. *J. Biol. Chem.* **262**, 14366-14371 (1987).
 185. Noguchi,T., Yamada,K., Inoue,H., Matsuda,T. & Tanaka,T. The M1 and M2 type Isozymes of Rat Pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807-13812 (1986).
 186. Gali,P. & Bourdin,M. Oncogenesis of pyruvate kinase in brain and liver tissue of the rat. *Biochem.* **60**, 1253-1260 (1978).
 187. Klingelhöffer,A. Veränderungen der Pyruvatkinase-Isoenzyme Typ L and M2 in frühen Stadien der chemisch induzierten Hepatokarzinogenese sowie die Beurteilung dieser Enzyme als Tumormarker. *Dissertation Giessen* (1997).
 188. Ostermann,J., Fritz,P.J. & Wuntch,T. Pyruvate kinase isoenzymes from rat tissues: development studies. *J. Biol. Chem.* **248**, 1011-1018 (1973).

189. Reinacher,M., Eigenbrodt,E., Schering,B. & Schoner,W. Immunohistochemical localization of pyruvate kinase isoenzymes in chicken tissues. *Histochemistry* **64**, 145-161 (1979).
190. Schering,B., Reinacher,M. & Schoner,W. Localization and role of pyruvate kinase isoenzyme in the regulation of carbohydrate metabolism and pyruvate recycling in rat kidney cortex. *Biochem. Biophys. Acta* **881**, 62-71 (1986).
191. Steinberg,P. *et al.* Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats. *Virchows Arch.* **434**, 213-220 (1999).
192. Hacker,H.J., Steinberg,P. & Bannasch,P. Pyruvate kinase isoenzyme shift from L-type to M2-type is a late event in hepatocarcinogenesis induced in rats by a choline-deficient/DL-ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* **19**, 99-107 (1998).
193. Van Berkel,Th.J.C., de Jonge,H.R., Koster,J.F. & Hülsman,W.C. Kinetic evidence for the presence of two forms of M2-type pyruvatekinase in rat small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 398-404 (1984).
194. Hance,A.J., Lee,J. & Feitelson,M. The M1 and M2 isozymes of pyruvate kinase are the products of the same gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 492-499 (1982).
195. Levin,M.J., Daegelen,D., Meienhofer,M.C., Dreyfus,J.C. & Kahn,A. Two different species of messenger RNAs specify synthesis of M1 and M2 pyruvate kinase subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **699**, 77-83 (1982).
196. Berglund,L., Ljungström,O. & Engström,L. Purification and characterization of pig kidney pyruvate kinase (type A). *J. Biol. Chem.* **252**, 6108-6111 (1977).
197. Eigenbrodt,E., Gerbracht,U., Mazurek,S., Presek,P. & Friis,R. Carbohydrate metabolism and neoplasia: New perspectives for diagnosis and therapy. *Biochemical and Molecular Aspects of Selected cancers 2* 311-385 (1994).
198. Presek,P., Reinacher,M. & Eigenbrodt,E. Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus. *FEBS Lett.* **242**, 194-198 (1988).
199. Hacker,H.J., Steinberg,P. & Bannasch,P. Pyruvate kinase isoenzyme shift from L-type to M2-type is a late event in hepatocarcinogenesis induced in rats by a choline-deficient/DL-ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* **19**, 99-107 (1998).
200. Rapp,U.R., Troppmair,J., Beck,T. & Birrer,M.J. Transformation by Raf and other oncogenes renders cells differentially sensitive to growth inhibition by a dominant negative c-jun mutant. *Oncogene* **9**, 3493-3498 (1994).
201. Oremek,G.M., Teigelkamp,S., Kramer,W., Eigenbrodt,E. & Usadel,K.H. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer Res.* **19**, 2599-2601 (1999).
202. Wechsel,H.W., Petri,E., Feil,G., Nelde,H. & Bichler,K. [Renal cell carcinoma. Immunohistological study to the expression of the inactive form of the pyruvate kinase]. *Urologe A* **38**, 583-585 (1999).
203. Oude Weernink,P.A., Rijksen,G. & Staal,G.E. Phosphorylation of pyruvate kinase and glycolytic metabolism in three human glioma cell lines. *Tumour. Biol.* **12**, 339-352 (1991).
204. Eigenbrodt,E., Mazurek,S. & Friis,R. Double role of pyruvate kinase type M2 in the regulation of phosphometabolite pools. Birkhäuser Verlag, Basel (1998).
205. Groelke,J. & Amos,H. Transaminase inhibitors block glycolysis and G1 to S phase progression in chick embryo fibroblasts: Reversal by alpha-keot acids. *J. Cell Physiol* **119**, 133-136 (1984).
206. Mazurek,S., Grimm,H., Wilker,S., Leib,S. & Eigenbrodt,E. Metabolic characteristics of different malignant cancer cell lines. *Anticancer Res* **18**, 3275-3282 (1998).

207. Dyson,R.D., Cardenas,J.M., Richards,T.C. & Garnett,M.E. Pyruvate kinase isoenzymes isolated from fetal and regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* **481**, 115-126 (1977).
208. Otori,M., Wheeler,T., Dunn,J., Stamey,T. & Scardino,P. The pathological features and prognosis of prostate cancers detectable with current diagnostic tests. *J. Urol.* **152**, 1714-1720 (1994).
209. Sebolt-Leopold,J.S. *et al.* Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo [see comments]. *Nat. Med.* **5**, 810-816 (1999).
210. Alessi,D.R., Cuenda,A., Cohen,P., Dudley,D.T. & Saltiel,A.R. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen- activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489-27494 (1995).
211. Weinstein,I.B. Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2696-2702 (1997).

ANHANG

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster-Abstracts:

Hagemann, C.; Frey, U.; Kalmes, A.; Weber, C.; Wixler, V.; Schuster, T.; Rapp, U.R.: CK2 β and 14-3-3 proteins bind to and regulate A-Raf protein kinase.
Thirteenth Annual Meeting on Oncogenes. June 18-21, 1997

Hagemann, C.; Kalmes, A.; Frey, U.; Weber, C.; Wixler, V.; Schuster, T.; Rapp, U.R.:
Detection of Raf-Isoform specific protein.protein interactions.
XIII. Wilsede Meeting. Modern Trends in Human Leukemia, June 20-23, 1998

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Ulf Rapp für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herr PD Dr. Tillmann Schuster und Herr Dr. Andreas Kalmes nahmen mich in ihre Arbeitsgruppe auf. Sie führten mich in die Arbeitstechniken der Molekularbiologie ein und waren bei Fragen und Problemen stets geduldige Gesprächspartner. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Christoph Weber. Er vermittelte mir die Faszination der Grundlagenforschung und ist wesentlich an der Fortführung der Experimente beteiligt.

Frau Ludmilla Wixler, Frau Barbara Schuler und Herrn Reinhold Krug danke ich für ihre technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Erich Eigenbrodt möchte ich für die Diskussionsbereitschaft und die Fortführung der Experimente bezüglich der Pyruvatkinase danken.

Prof. Dr. Winfried Siffert danke ich für anregende Gespräche und Diskussionen. Er machte viele konstruktive Verbesserungsvorschläge, die ich dankbar aufnahm.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Nur durch ihre finanzielle Unterstützung war das zeitaufwendige Projekt durchführbar.

Ulrich Frey

LEBENS LAUF

Name: Frey
Vorname: Ulrich
Geburtsdatum: 30.06.1972
Geburtsort: Stuttgart
Nationalität: deutsch

Eltern: Diplom-Betriebswirt Erwin Frey
Medizinisch technische Assistentin Gerlinde Siffert, geb. Klimberg

Wohnort: Von-Seeckt-Str. 23
45130 Essen
email: ulrich.frey@uni-essen.de

tabellarischer Lebenslauf

1983 – 1989	Bischöfliches Gymnasium Essen Stoppenberg
1989 – 1992	Musterschule Frankfurt am Main, Abschluß Abitur
1992 – 1993	Zivildienst
1993 – 1995	Studium der Humanmedizin an der Charité Berlin
1995 – 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Essen, 14. Dezember 2001