Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie

(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Posttranskriptionale Veränderungen der E3-Ubiquitin-Ligase IMP (impedes mitogenic signal propagation)

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christian Böcker

aus Andernach

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T. Seidler

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 7

Tabellenverzeichnis 8

Abkürzungsverzeichnis 9

1. Einleitung 12

1.1 Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz 12

1.2 Signalwege bei der Entstehung der Herzhypertrophie 13

1.3 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen 15

1.4 Die ERK1/2-Kaskade 18

1.5 *IMP*, ein Regulator der ERK1/2-Kaskade 23

1.6 Mutagenese 27

1.7 Ziele der Arbeit 28

2. Material und Methoden 29

2.1. Material 29

2.1.1. Chemikalien 29

2.1.2. Enzyme 33

2.1.3. Verbrauchsmaterial 34

2.1.4. Gebrauchsfertige Reaktionssyteme 34

2.1.5. Geräte 35

2.1.6. Lösungen und Puffer 36

2.1.7. Medien für Bakterien 38

2.1.8. Längenstandards 39

2.1.9. Verwendete Oligonukleotide 39

2.1.10. Datenbanken und Analyse-Software 41

2.2 Methoden 41

2.2.1 Mutagenese 41

2.2.2 Transformation 44

2.2.3 Minipräparation von Plasmid-DNS 45

2.2.4 Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks 46

2.2.5 Midipräparation von Plasmid-DNS 46

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 46

2.2.7 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen 47

2.2.8 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen 48

2.2.9 Ligation von DNS-Fragmenten 48

2.2.10 Agarose – Gel – Elektrophorese 49

2.2.11 Zellkultur 49

2.2.12 Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryontischen Zellen 50

2.2.13 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen 50

2.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 51

2.2.15 Western Blot 52

2.2.16 Immundetektion von membrangebundenen Proteinen 52

2.2.17 *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* und *Dual-Luciferase Reporter Assay System* 53

2.2.18 Transfektion von COS-7-Zellen 55

2.2.19 Erstellung der Fusionskonstrukte 60

2.2.20 Messung der Luciferase-Aktivität 62

3. Ergebnisse 64

3.1 Die Mutation potentieller Phosphorylierungsstellen der Ubiquitin- Ligase *IMP* 64

3.1.1 Die Erstellung von Mutanten der Ubiquitin-Ligase *IMP* 65

3.2 *Mammalian Two-Hybrid* 72

3.2.1 Der Einfluss von *IMP* auf die Interaktion von B-*RAF* und *MEK* im Vergleich zum Einfluss von *IMP* auf die Interaktion von c-RAF^{BXB} und *MEK* 72

3.2.2 Die Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die IMP^{C264A} -Mutante im Vergleich zu Wildtyp-*IMP* 75

3.2.3 Die Inhibition der IMP^{C264A}-Mutante auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion im Vergleich zu Wildtyp-*IMP* unter dem konstantem Einfluss von *RAS* 78

3.2.4 Untersuchung der Phosphorylierungsmutanten anhand der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion 82

3.3 Vergleichende Untersuchung der Expression verschiedener *IMP*-Mutanten 85

4. Diskussion 87

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 87

4.2. Diskussion der Methoden 88

4.2.1 Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren 88

4.2.2 Mutagenese 89

4.2.3 *Mammalian Two-Hybrid* 90

4.2.4 Western Blot 91

4.3. Fragestellungen und Bewertung der Ergebnisse 92

4.3.1 Gibt es Unterschiede hinsichtlich des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* im Vergleich zu dem Einfluss von *IMP* auf die Interaktion zwischen c-*RAF* und *MEK*? 92

4.3.2 Unterscheidet sich eine nicht ubiquitinylierbare *IMP*-Mutante von Wildtyp-*IMP* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* im Luciferase-Assay? 93

4.3.3 Gibt es Phosphorylierungsstellen der E3-Ubiquitin-Ligase *IMP*, die in der Lage sind, die Aktivität zu beeinflussen, mit der *IMP* die Signalfortleitung innerhalb der ERK1/2-Kaskade hemmt? 93

4.4. Perspektiven 94

5. Zusammenfassung 96

6. Anhang 97

6.1 Relativ Light Units zu 3.2.3 97

6.2 Auswertung durch Phosida und NetPhosK 1.0 98

6.3 Untersuchung der Phosphorylierungsmutanten anhand der c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion 100

7. Literaturverzeichnis 101

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1 Ätiologie der Herzinsuffizienz 13
Abb. 1. 2 Zentrale intrazelluläre Signal - und Transduktionswege der kardialen Hypertrophie .. 15
Abb. 1. 3 Vereinfachte Darstellung der MAPK-Kaskaden 17
Abb. 1. 4 Einfluss der ERK1/2-Kaskade auf den Zellzyklus 20
Abb. 1. 5 Übersicht über wichtige Domänen der Ubiquitin-Ligase *IMP* anhand der DNS-Sequenz 24
Abb. 1. 6 Übersicht zur *MEK*-Aktivierung 26

Abb. 2.2. 1 Schematische Darstellung der Mutagenese 43
Abb. 2.2. 2 Schematische Darstellung der Fireflyexpression. 54
Abb. 2.2. 3 Schematische Darstellung der Luciferase-Expression des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* 55
Abb. 2.2. 4 Schematische Darstellung eines 24-Wells und der Auftragung der Transfektionsansätze 56
Abb. 2.2. 5 Übersicht über die für das *Dual-Luciferase Reporter Assay System* notwendigen Klonierungen 62

Abb. 3.1. 1 Übersicht über die Konservierung der Ubiquitin-Ligase *IMP* anhand der Primärstruktur 66
Abb. 3.1. 2 Übersicht zur Lokalisation der durchgeführten Mutationen in der Primärstruktur und der DNS-Sequenz von *IMP* 67
Abb. 3.1. 3 Übersicht zu den erstellten Mutationen von *IMP* 71

Abb. 3.2. 1 Untersuchung des Einflusses von *IMP* auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion im Vergleich zum Einfluss auf die c-RAF^{BXB}/*MEK*-Interaktion 74
Abb. 3.2. 2 Untersuchung des Einflusses von pDC-516-IMP^{C264A} auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion 77
Abb. 3.2. 3 Untersuchung des Einflusses von pDC-516-C264A auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion unter der Stimulation von RAS^{V12} 81
Abb. 3.2. 4 Untersuchung des Einflusses der erstellten Mutationen von *IMP* auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion 84

Abb. 3.3. 1 Western Blot zum Vergleich der Expression von IMP mit der Expression der erstellten Mutanten 85

Abb. 6.3. 1 Untersuchung des Einflusses der erstellten Mutationen von *IMP* auf die c-RAF^{BXB}/*MEK*-Interaktion 100

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.2. 1 Übersicht über die Mutations-/Amplifikationsreaktionen 42
Tab. 2.2. 2 Verwendete Antikörper zur Immundetektion 53
Tab. 2.2. 3 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Bestimmung des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion von B-RAF und MEK im Vergleich zu der Interaktion von c-RAF^{BXB} und MEK 57
Tab. 2.2. 4 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Messung der Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP* 58
Tab. 2.2. 5 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Messung der Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP* unter dem konstantem Einfluss von *RAS* 58
Tab. 2.2. 6 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Untersuchung der erstellten Phosphorylierungsmutanten 59
Tab. 2.2. 7 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze für den Western Blot 60

Tab. 3.1. 1 Übersicht über die identifizierten phosphorylierbaren Peptide der E3-Ubiquitin-Ligase *IMP* 64

Tab. 3.2. 1 Spezifische interaktionsabhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* 73
Tab. 3.2. 2 Spezifische interaktions-abhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* bzw. *IMP*^{C264A} 75
Tab. 3.2. 3 Übersicht über die aus Tab. 3.2.2 normalisierten Messwerte. 76
Tab. 3.2. 4 Spezifische interaktions-abhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* bzw. *IMP*^{C264A} unter dem Einfluss von *RAS*^{V12} 79
Tab. 3.2. 5 Übersicht über die aus Tab. 3.2.4 normalisierten Messwerte 80
Tab. 3.2. 6 Spezifische interaktionsabhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* bzw. der erstellten Mutationen von *IMP* 82
Tab. 3.2. 7 Übersicht über die aus Tab. 3.2.7 normalisierten Messwerte 83

Tab. 6.1. 1 Gemessene RLU in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* 97

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ANF	atrialer natriuretischer Faktors
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
Bad	*Bcl*-2-*antagonist of cell death*
Bcl	*B-cell lymphoma 2*
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
[C]	Konzentration
°C	Grad Celsius
CDK	*cyclin-dependent kinase*
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EF	Ejektionsfraktion
ERK	extrazellulär Signal regulierte Kinase
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
$G_{(0,1,2)}$-Phase	Gap-Phase
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I

Abkürzung	Bedeutung
IMP	impedes mitogenic signal propagation
JNK	c-jun N-terminale Kinase JNK
k	kilo = 10^3
KSR	*Kinase supressor of RAS*
l	Liter
m	milli, Meter
M	Molar
µ	mikro = 10^{-6}
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK	*mitogen activated protein kinase extracellular signal-related kinase kinase*
min	Minute
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
RAF	*rapidly growing fibrosarcoma*
RAS	*Rat sarcoma*
RLU	Relative Lichteinheiten
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	*receptor tyrosine kinase*
s	Sekunde
SNP	*single nucleotide polymorphism*
Tab.	Tabelle
TIF-1	*transcriptional intermediary factor 1*

Abkürzung	Bedeutung
U	Unit
V	Volt, Volumen
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz

In den westlichen Industrienationen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursache in der Erwachsenenbevölkerung. Im Verlauf der letzten 10 Jahre hat die Herzinsuffizienz innerhalb dieser Bevölkerungsgruppe die größte Häufigkeitszunahme unter den kardiovaskulären Todesursachen erfahren, und sie wird daher heute als die wesentliche prognosebelastende Herzerkrankung angesehen (Erdmann, 2011). Dabei nimmt die Inzidenz der Herzinsuffizienz mit dem Alter stetig zu. So liegt die Inzidenz in der Bevölkerungsgruppe der 45- bis 55-Jährigen bei 1 auf 1000 Einwohner, bei den 85- bis 94-Jährigen bei 70 auf 1000 Einwohner (Kannel and Cupples 1988). In Europa leiden mehr als 10 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz und den damit verbundenen Folgen für die Lebensqualität und die Lebenserwartung. Die mittlere Überlebenszeit bei bedeutsamem hämodynamischen Schweregrad (EF < 40 %) der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt gleicht sich dem Verlauf einer malignen Tumorerkrankung an und wird im Mittel mit sechs Jahren angegeben (Erdmann, 2011; White et al., 1987).

Die Herzinsuffizienz wird pathophysiologisch definiert als ein Zustand mit herzbedingter Mangelperfusion lebenswichtiger Organe und sekundärer neurohumoraler Aktivierung und Organschädigung (Classen et al., 2004).

Makroskopisch können eine regionale Pumpfunktionsstörung, z.B. nach einem Infarkt oder Trauma, und eine globale Kontraktionsstörung, z.B. bei dilatativer Kardiomyopathie oder langjähriger arterieller Hypertonie, voneinander unterschieden werden.

Pathomorphologisch finden sich trotz zahlreicher möglicher Entstehungsursachen typischerweise relativ uniform eine Gewichtszunahme des Herzens, eine Dilatation der Herzhöhlen, eine myozytäre Hypertrophie und eine vermehrte Einlagerung von Kollagen.

Bluthochdruckkrankheit und koronare Herzkrankheit (KHK) sind die wichtigsten pathogenetischen Ursachenfaktoren und in 80% der Fälle verantwortlich für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz (Remes et al., 1992) (siehe Abb. 1.1 Seite 13). Offenbar werden durch eine vermehrte chronische Druckbelastung oder durch den Verlust an kontraktiler Substanz nach einem Myokardinfarkt Wandumbau und Wachstumsprozesse angestoßen. Bei weiter einwirkenden schädigenden Ursachenfaktoren, ungenügender Hypertrophiereaktion und übermäßiger Wandspannungszunahme resultiert schließlich eine fortschreitende systolische und diastolische Dysfunktion.

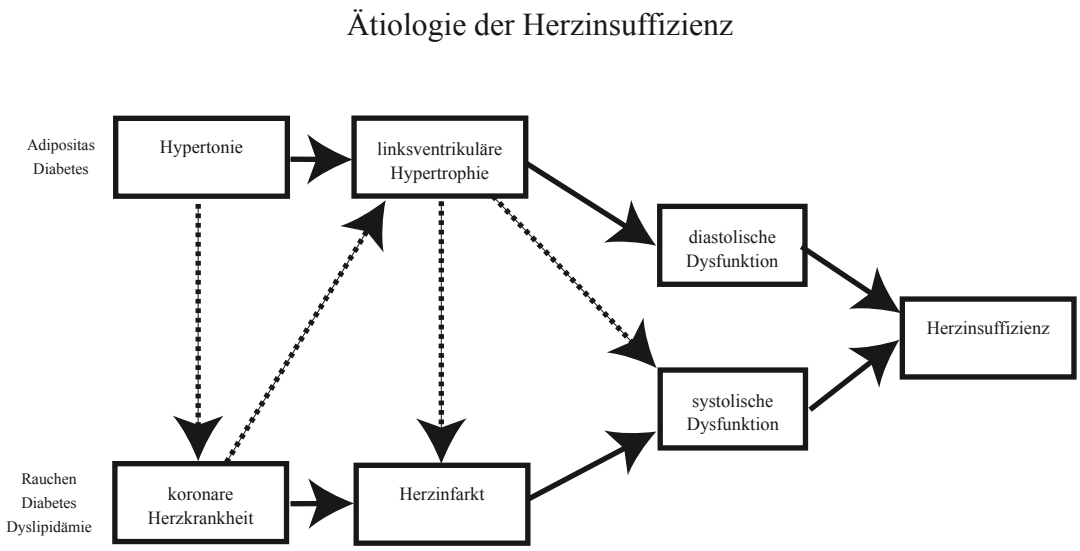


Abb. 1. 1 Ätiologie der Herzinsuffizienz
(In Anlehnung an Classen et al., 2004, S. 212).

Neben den erheblichen persönlichen Belastungen im alltäglichen Leben ergeben sich auch ganz wesentliche wirtschaftliche und soziale Folgen für den Patienten. Eine Verbesserung des Verständnisses der pathophysiologischen Abläufe ist deshalb unbedingt wünschenswert.

1.2 Signalwege bei der Entstehung der Herzhypertrophie

Beim Herzmuskel handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein sogenanntes zellkonstantes Organ. Bereits kurz nach der Geburt wird die endgültige Zahl der Kardiomyozyten erreicht. Eine Teilung der Zellkerne findet zwar auch nach der Geburt statt, es kommt aber zu keiner weiteren Zellvermehrung. Nach der Geburt erfolgt ein Wachstum des Herzens allein durch eine Verbreiterung und Verlängerung der einzelnen Herzmuskelfasern. Derzeit wird untersucht, inwieweit eine gleichsam physiologische, adaptive Wachstumsreaktion, z.B. als Folge einer erhöhten Herz-Kreislauf-Belastung durch schwere körperlicher Aktivität, von einer pathologischen Hypertrophie im Rahmen einer chronisch vermehrten Druckbelastung unterscheidbar ist. In beiden Fällen kommt es mit zunehmender Hypertrophie zu einer gesteigerten Proteinsynthese in den Kardiomyozyten (Yamazaki et al., 1998). Die pathologische Hypertrophie des Herzens ist durch eine vermehrte Expression fetaler Gene und durch interstitielle Fibrosierung gekennzeichnet. Sie geht einher mit einer fortschreitenden Funktionsstörung des Herzens und mit einer erhöhten Mortalität. Dagegen ist bei einer physiologischen Hypertrophie ein anderes

Expressionsprofil vorhanden und das Myokard bleibt strukturell und funktionell intakt.

Die ersten Signale bei der Entwicklung einer Herzmuskel-Hypertrophie entstehen durch dehnungsabhängige, biomechanische oder neurohumorale Faktoren, die eine Freisetzung von Hormonen, Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren induzieren. Diese Liganden können durch spezielle an der Außenseite der Myozytenmembran lokalisierte Rezeptoren ihr Signal nach intrazellulär an eine begrenzte Anzahl von Signalkreisläufen weiterleiten, die die Größenzunahme der Zelle beeinflussen. Diese Signalkreisläufe steuern die Hypertrophie über eine Modulation der Genexpression durch eine Steigerung der Translation und über eine Reduktion der proteasomabhängigen Proteindegradation (Heineke and Molkentin, 2006). Zu diesen zentralen Signalwegen und Effektoren (siehe Abb. 1.2 Seite: 15) mit entscheidender Bedeutung für die Hypertrophiereaktion des Herzens gehören: Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), Calcineurin, nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten (NFAT), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (*IGF*-I), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (PKB) und Cyclin-abhängige Kinasen 7 und 9 (*CDK*-7/-9) (Heineke and Molkentin, 2006).

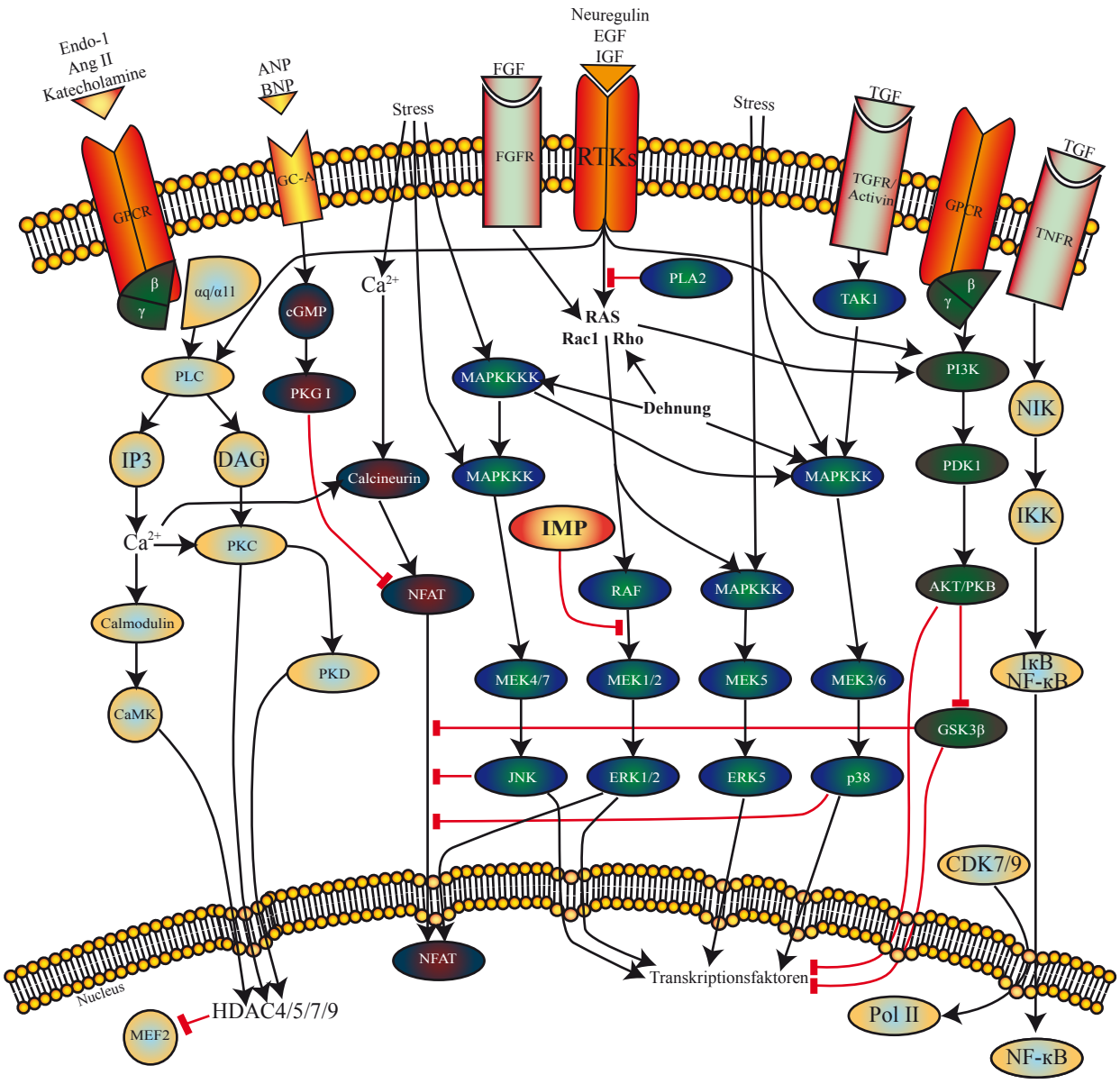


Abb. 1. 2 Zentrale intrazelluläre Signal - und Transduktionswege der kardialen Hypertrophie
(In Anlehnung an Heinecke und Molkentin, 2006)

1.3 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Die MAPK-Signalwege sind kaskadenartig funktionierende Serin/Threonin-Proteinkinasen mit einer Molekülmasse von 36-44 kDa, und sie sind Bestandteil eines Signalstransduktionsweges, der zu einer Aktivierung und Regulation von zahlreichen Zielproteinen führt. Darunter befinden sich einige Transkriptionsfaktoren, über die MAPK eine Modulation der Genexpression bewirken (Hipskind and Bilbe, 1998). In Säugetierzellen sind drei verschiedene MAPK-Kaskaden bekannt:

- die extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK1/2)-Kaskade
- die c-jun N-terminale Kinase (JNK)-Kaskade
- die p38MAPK/RK/HOG-Kaskade.

MAPK sind an der Regulation zahlreicher und sehr verschiedener Zellreaktionen beteiligt. Dazu gehören die Weitergabe von Stress und von Signalen für Wachstum, Differenzierung und programmierten Zelltod an den Zellkern sowie die embryonale Entwicklung. Der Aufbau dieser Kaskaden umfasst mindestens drei sequentiell geschaltete Proteinkinasen, mit denen Signale verstärkt und auf jeder Stufe in ihrer Aktivität moduliert werden können (Pearson et al., 2001). Zunächst wird die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert, die ihrerseits durch Phosphorylierung die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) aktiviert, die dann zu der Aktivierung der MAP-Kinase (MAPK) führt (siehe Abb 1.3 Seite: 17). Die MAPK wirkt dann im Zytosol oder im Nukleus und über eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren auf die Expression einer Vielzahl von Zielgenen ein (Garrington and Johnson, 1999). Über eine Dephosphorylierung werden die MAPK inaktiviert und stehen für weitere Aktivierungszyklen zur Verfügung. Abhängig von Hintergrund und Zelltyp nimmt jede dieser Kaskaden verschiedene Rollen ein. In Kardiomyozyten werden die MAPK-Signalkaskaden insbesondere über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und Stress-abhängige Faktoren wie zum Beispiel Dehnung aktiviert (Sugden and Clerk, 1998).

Die p38MAPK/RK/HOG–Kaskade wird durch die MAPK-Kinasen MKK3 und MKK6 aktiviert, die letztlich zu einer Aktivierung von p38 führen. Bei transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass sowohl die herzspezifische Überexpression von aktiviertem MKK3 als auch von aktiviertem MKK6 die Ausbildung einer Herzinsuffizienz bewirkte, die zu einem vorzeitigen Versterben der Tiere führte (Liao P et al., 2002). In für das Herz spezifischen p38α–*knockout*-Mäusen kam es dagegen nach transversaler Konstriktion der Aorta (*TAC*, engl. *trans aortic constriction*) zunächst zu einer normalen Hypertrophieantwort. Im weiteren Verlauf entwickelten die Mäuse dann eine Dilatation des Herzens mit kardialer Dysfunktion (Nishida et al., 2004).

Die c-Jun N-terminale Kinase wird durch MKK4 und MKK7 phosphoryliert. Für die JNK-Kasakde konnte in transgenen Mäusen, die eine aktive MKK7-Mutante herzspezifisch überexprimierten, die Entwicklung einer letalen Kardiomyopathie ohne Tendenz zur Hypertrophie gezeigt werden (Petrich et al., 2003). Dagegen bewirkte ein Fehlen von JNK1 oder JNK2 im Herzen spontan oder über die Stimulation durch eine TAC-Operation ein vermehrtes kardiales Wachstum (Liang et al., 2003).

Insgesamt scheint die kardiale Hypertrophieantwort über die Proteinkinasen JNK und p38 gehemmt zu werden. Man geht jedoch davon aus, dass eine Überexpression von JNK oder p38 einhergeht mit nachteiligen Effekten im Sinne der Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie (Molkentin, 2004).

Die ERK1/2-Kaskade ist sehr wahrscheinlich ein zentraler Regulator von Wachstumsprozessen des Herzens. Dies konnte unter anderem durch die Untersuchung transgener Mäuse gezeigt werden, die die konstitutiv aktive MAPKK *MEK* 1 unter der transkriptorischen Kontrolle eines kardial spezifischen Promoters exprimieren, was zu einer spezifischen Aktivierung der MAPK ERK1/2 und phänotypisch zu einer konzentrischen Hypertrophie führt (Bueno et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der ERK1/2-Kaskade mittels Crocetin eine durch *TAC* induzierte Myokard-Hypertrophie bei Mäusen verhindern bzw. rückgängig machen kann (Cai et al., 2009).

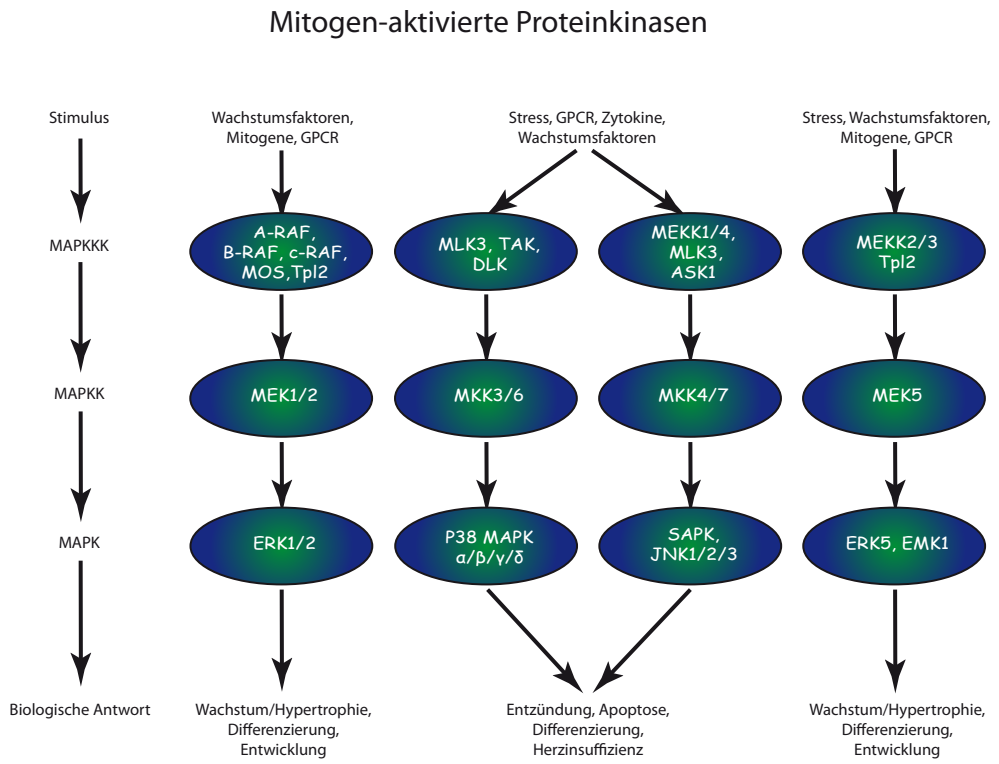


Abb. 1. 3 Vereinfachte Darstellung der MAPK-Kaskaden
Neben Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen erfolgt eine Aktivierung dieser Signalkaskaden insbesondere über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). (In Anlehnung an Cell Signaling Technology, Inc.: http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp) (Pearson et al., 2001)

1.4 Die ERK1/2-Kaskade

Die ERK1/2-Kaskade ist ein fundamentaler Bestandteil sowohl physiologischer Zellvorgänge wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, der Zellteilung und des Zelltods (Lewis et al., 1998; Schaeffer and Weber 1999) als auch pathologischer Zellvorgänge wie der Entwicklung von Hypertrophie und der Entstehung von Tumoren (Molkentin, 2004; Grund et al., 2008; Gao et al., 2009). Die Aktivierung von ERK führt zwangsläufig zu einer Modulation der Transkription von Genen (Matheny and White 2009).

Erstaunlicherweise kann durch die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade sowohl eine Hemmung als auch eine Steigerung der zellulären Proliferation bewirkt werden (Sewing et al., 1997; Pages et al., 1993; DeSilva et al., 1998). Dabei scheinen die Stärke sowie die Dauer der Aktivierung zusammen mit der intrazellulären Lokalisation von ERK die biologische Antwort zu bestimmen (Marshall 1995; Pouyssegur et al., 2002; Whitehurst et al., 2004; Raman et al., 2007). In Abwesenheit eines Stimulus scheint ERK sowohl im Zellkern als auch Zytoplasma lokalisiert zu sein. Nach einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren kommt es jedoch kurzzeitig zu einer Akkumulation von aktiviertem ERK1/2 im Zellkern (Pouyssegur et al., 2002), was zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 (Sharrocks, 2001), Proteinkinasen wie der 90 kDa ribosomal protein S6 Kinase (Frödin and Gammeltoft, 1999) und Signalproteinen wie der Phospholipase A_2 (Gijon and Leslie, 1999) führt. Dabei scheint die über die ERK1/2-Kaskade vermittelte Herzhypertrophie zumindest zum Teil über den Transkriptionsfaktor NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten) vermittelt zu werden (Sanna et al., 2005).

2009 konnte gezeigt werden, dass posttranskriptionale Veränderungen von ERK1/2 eine wesentliche Rolle bei der Akkumulation von aktiviertem ERK1/2 im Zellkern spielen. Durch die Interaktion von ERK1/2 mit der βγ Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen (Gβγ) kommt es zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 (Thr188) und in der Folge zu einer Translokation von ERK1/2 in den Zellkern (Lorenz et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von ERK1/2 über Phosphorylierung (Thr183, Thr185) beeinflusst wird (Lorenz et al., 2009). Posttranskriptionale Veränderungen sind also für die Konzentration von ERK1/2 im Zellkern als auch für die Kinase-Aktivität von ERK1/2 von Bedeutung, und sie scheinen damit maßgeblich an der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beteiligt zu sein.

Darüber hinaus ist die ERK1/2-Kaskade auch in Bezug auf den Zellzyklus von Bedeutung.

Ein Durchlaufen der G_1-Phase ist abhängig von extrazellulären Wachstumsfaktoren

und der extrazellulären Matrix sowie deren Assoziation zu Tyrosinkinaserezeptoren (*RTKs* engl. *receptor tyrosine kinases*) (Bottazzi et al., 1999). Dabei führt die Aktivierung der RTKs zu intrazellulären Reaktionsabläufen, an denen Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (*CDK* engl. *Cycline dependent kinases*) und Hemmer der *CDK* (*CKI* engl. *CDK Inhibitor*) beteiligt sind. Von besonderer Bedeutung sind Cyclin D und in der Folge *CDK*-4/-6, sowie Cyclin E und in der Folge *CDK*-2, weil über diese *CDK*s das Retinoblastom–Protein (RB) phosphoryliert werden kann (Hunter T und Pines, 1994; Sherr, 1994; Sherr and Roberts, 1995). Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und führt unter anderem zu einer Expression von Cyclin A, was als Beginn der S-Phase angesehen wird (Weinberg, 1995).

In Fibroblasten des chinesischen Hamsters (IIC9-Zellen) konnte gezeigt werden, dass die Ras-stimulierte anhaltende ERK-Aktivierung essentiell für die Expression von Cyclin D1 in der G1-Phase ist, und dass es durch eine Unterdrückung der ERK1/2-Aktivität zu einem Zellzyklusarrest in der G_1-Phase kommen kann (Weber et al., 1997a; Weber et al., 1997b). Eine anhaltende starke Aktivitätssteigerung von *RAF* führt unabhängig von P53 über eine Induktion von CKI 1 (p21) ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Sewing et al., 1997; Pumiglia and Decker, 1997). Eine kurzfristige starke Aktivierung der ERK1/2-Kaskade kann aufgrund der Expression von p21 und der fehlenden Cyclin D1-Induktion zu keiner zellulären Proliferation führen (Alessi and Cohen, 1998; Roovers and Assoian, 2000). Über die Induktion von p21 in der frühen G1-Phase kommt es zu einer Bindung und Hemmung von Cyclin-*CDK*-2-Komplexen, sie unterstützt jedoch auch eine Zunahme der Konzentration von funktionellen Cyclin D–*CDK*-4/-6-Komplexen (La-Baer et al., 1997; Cheng et al., 1999). Für ein Fortschreiten des Zellzyklus scheint neben einer kontinuierlichen, jedoch nicht übermäßigen Aktivierung der ERK1/2-Kaskade, eine Verringerung des p21–Spiegels notwendig zu sein (siehe Abb. 1.4 Seite: 20) (Roovers and Assoian, 2000). In der Mitte der G1-Phase kommt es Integrin-vermittelt zu einem Absinken der P21-Konzentration (Bottazzi et al., 1999).

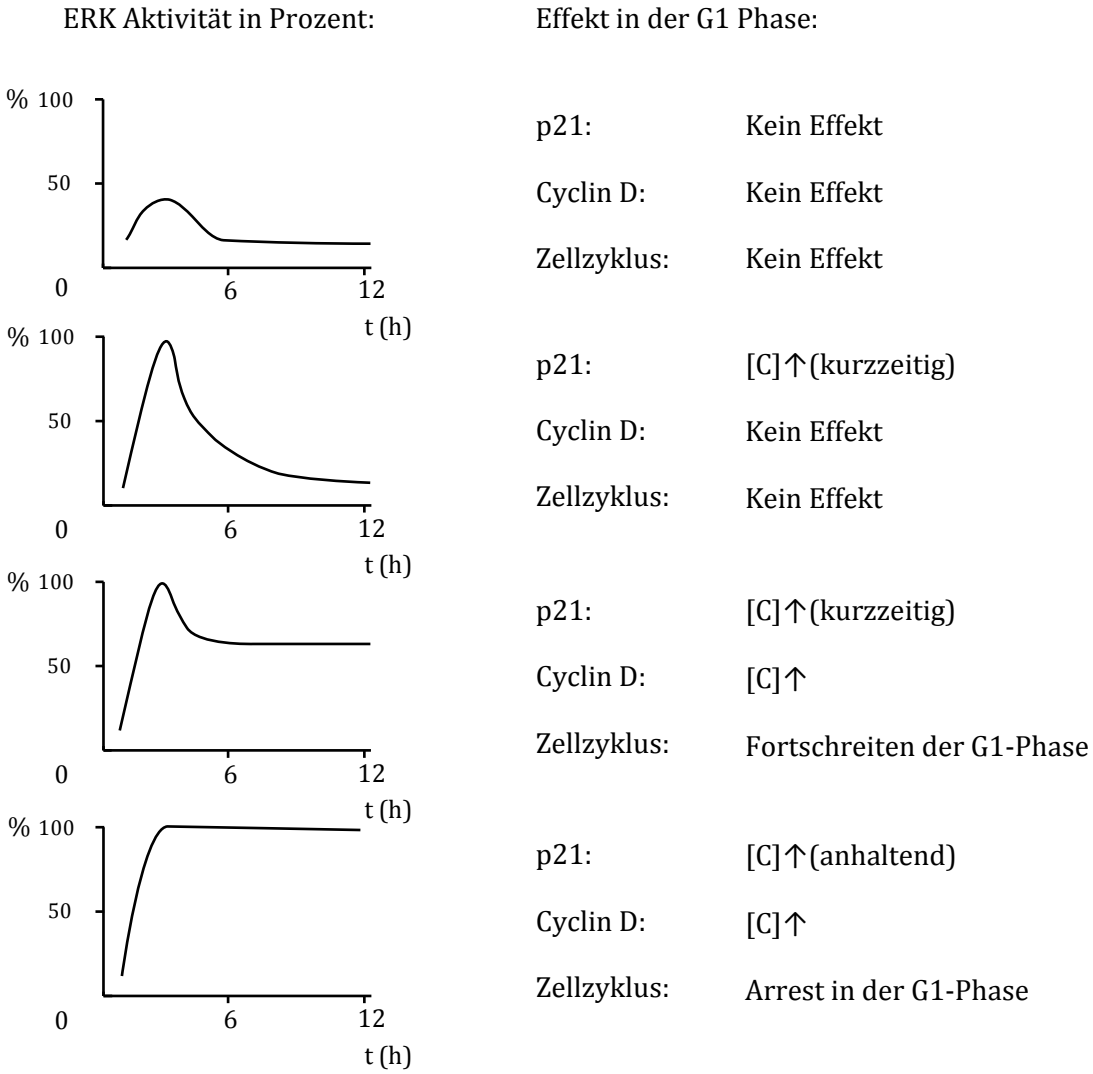


Abb. 1. 4 Einfluss der ERK1/2-Kaskade auf den Zellzyklus
In Abhängigkeit von der Stärke und Dauer der ERK1/2-Aktivität kommt es zu unterschiedlichen Expressionen von Cyclin D und p21 in der G1-Phase (Aus Roovers and Assoian, 2000, S. 821).

Die ERK1/2-Kaskade besteht aus der *RAF*-Kinase (*rapidly growing fibrosarcoma)*, *MEK*-Kinase (*mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase kinase)* und ERK-Kinase (*extracellular signal-regulated kinase*) (siehe Abb. 1.3 Seite: 17). Dabei führt die Aktivierung der MAPKKK *RAF* zur Aktivierung der MAPKK *MEK*, welche direkt die MAPK ERK aktiviert. Daher ist die ERK1/2-Kaskade auch als *RAF*/*MEK*/ERK-Kaskade bekannt.

Die *RAF*-Kinase-Familie besteht bei Säugetieren aus den drei Isoformen A-*RAF*, B-*RAF* und c-*RAF*. Die *RAF*-Isoformen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Fähigkeit, *MEK* zu aktivieren (Marais et al., 1997). Dabei besitzt B-*RAF* in NIH 3T3 Zellen die höhere *MEK*-Kinase-Aktivität, gefolgt von c-*RAF* (Pritchard et al., 1995). Bei der Untersuchung von A-*RAF*-defizienten (engl. *knockout*) Mäusen konnten neuronale und intestinale Defekte nachgewiesen werden (Pritchard et al., 1996). Dagegen führte der Verlust des B-*RAF*- oder c-*RAF*-Gens bei Mäusen intrauterin zum vorzeitigen Tod

(Wojnowski et al., 1997; Mikula et al., 2001). Dies zeigt, dass die *RAF*-Isoformen entscheidende Aufgaben haben und im Organismus nicht dieselbe Funktion erfüllen bzw. eine Funktion teilen.

Eine herzspezifische Deletion des c-*RAF*-Gens führt über Apoptose zu einer Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion (Yamaguchi et al., 2004). Diese Untersuchung zeigt eine von der ERK1/2-Aktivierung unabhängige, anti-apoptotische Funktion von c-*RAF*. Auch in anderen in-vivo- und in-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass c-*RAF* in der Lage ist, den programmierten Zelltod zu verhindern (Mikula et al., 2001; Hüser et al., 2001). Dabei sind mehrere Mechanismen der antiapoptotischen Wirkung von c-*RAF* bekannt:

Über einen noch nicht näher definierten Effekt, jedoch unabhängig von der Kinase-Aktivität von c-*RAF*, kommt es zu einer Inhibition der proapoptotischen Kinase *apoptosis signal-regulating kinase* 1 (*ASK*1) (Chen J et al., 2001).

Darüber hinaus ist die p21-aktivierte Kinase 1 (Pak1) in der Lage, c-*RAF* zu phosphorylieren, was zu einer Translokation von c-*RAF* an die Mitochondrienmembran und in der Folge zu einer Phosphorylierung von *Bcl*-2-*antagonist of cell death* (*Bad*) führt (Jin et al., 2005, Wang et al., 1996). Dadurch kommt es zu einer Polyubiquitinierung von *Bad* und zu einem Proteasom-gesteuerten Abbau des Proteins (Fueller et al., 2008), was die Bildung von proapoptotischen *Bcl*-2-*Bad*-Komplexen reduziert.

Außerdem ist c-*RAF* in der Lage, an das an der Mitochondrienmembran lokalisierte antiapoptotische Protein *Bcl*-2 (Wang et al., 1996) zu binden, was ebenfalls zu einer reduzierten Interaktion zwischen *Bcl*-2 und *Bad* führt. *Bcl*-2 reduziert eine Freisetzung von Cytochrom C, indem es die Bindung von Bax an die äußere Mitochondrienmembran verhindert und dadurch die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran stabilisiert (Teijido and Dejean 2010).

Auch für *MEK* konnte eine antiapoptotische Funktion nachgewiesen werden. So kann über eine Aktivierung von *MEK* eine Fortleitung des Apoptosesignals über Cytochrom C an die Caspase 9 verhindert werden (Erhardt et al., 1999).

RAF ist ein Effektor von *Rat sarcoma* (*RAS*). Aktiviertes *RAS* bindet *RAF* und bewirkt eine Translokation von *RAF* an die Plasmamembran. Dabei wird *RAF* über noch nicht gänzlich geklärte Wege im Rahmen dieser Interaktion phosphoryliert, was eine Steigerung der Aktivität von *RAF* zur Folge hat (Avruch et al., 2001).

Zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien konnten die Bedeutung von *RAS* für die Regulation der kardialen Hypertrophie belegen. So konnte durch die Mikroinjektion von aktiviertem H-*RAS*-Protein in kultivierten, neonatalen Kardiomyozyten der Ratte eine gesteigerte Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) und von c-Fos nachgewiesen werden (Thorburn et al., 1993). Die Expression beider Gene ist mit der

Entwicklung einer Hypertrophie in ventrikulären Kardiomyozyten assoziiert. Darüber hinaus konnten eine Größenzunahme der Zellen und morphologische Veränderungen in der Struktur der Myofibrillen, die charakteristisch für eine Hypertrophie sind, nachgewiesen werden (Thorburn et al., 1993). Eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von konstitutiv aktivem *RAS* in transgenen Mäusen führte zu kardialer Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion (Hunter J et al., 1995).

RAS gehört zu den Guanin-Nukleotid-bindenden Proteinen und wechselt stimulationsabhängig zwischen einem aktiven Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenen und einem inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Zustand (Downward, 1996). Die *RAS*-Familie umfasst bei Säugetieren vier Proteine: H-*RAS*, N-*RAS*, K(A)-*RAS* und K(B)-*RAS* (Barbacid, 1987). In Mäusen konnten deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der *RAS*-Gene in den einzelnen Organen und während der Entwicklung gezeigt werden. So wird H-*RAS* insbesondere in Gehirn, Muskel und Haut exprimiert. Die Expression von K-*RAS* erfolgt vor allem in der Lunge, im Darm und im Thymus. N-*RAS* wird hauptsachlich in Hoden und Thymus exprimiert (Leon et al., 1987). Es ist daher anzunehmen, dass die einzelnen *RAS*-Isoformen in der Zelle sehr spezifische und unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Eine Deletion des K-*RAS* Gens bei Mäusen führt zu einem vorzeitigen Versterben der Tiere zwischen dem 12. und dem 14. Tag der Embryonalentwicklung (Johnson et al., 1997). Dagegen sind weder H-*RAS* noch N-*RAS* für die Embryonalentwicklung essentiell (Koera et al., 1997). Selbst ein gleichzeitiges Fehlen von H-*RAS* und N-*RAS* bewirkt keinen Entwicklungsdefekt und keine offensichtliche Veränderung des Phänotyps (Esteban et al., 2001). Zu den Effektoren von *RAS* zählen PI3K (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000), Ral-GDS/Rac (Takai et al., 2001), die Proteinkinase *RAF* (Avruch et al., 2001) und die Ubiquitin-Ligase *IMP* (Matheny et al., 2004).

Kinase suppressor of RAS (*KSR*), ein sogenanntes *Scaffolding*-Protein, ist in der Lage, alle Kinasen der ERK1/2-Kaskade zu binden. *Scaffold*-Proteine sind Proteine ohne eine eigene katalytische Funktion. Sie sind in der Lage, verschiedene Proteine, unter anderem auch sich selbst, zu binden und so die Interaktion der gebundenen Proteine untereinander zu beeinflussen. Über die so vermittelte molekulare Organisation können das Zusammentreffen, die Aktivierung und die Lokalisation von einzelnen Proteinkinasen einer MAPK-Kaskade modifiziert werden (Bumeister et al., 2004, Morrison and Davis 2003). Dabei wird die Spezifität sowohl durch die Bildung dieser Proteinkomplexe als auch durch die Zuweisung dieser Komplexe an spezielle Rezeptoren erreicht. *KSR* scheint so über die ERK1/2-Kaskade an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt zu sein (Kolch, 2005).

In Mäusen führt eine Defizienz von *KSR*-1 zu einer reduzierten ERK-Kinase Aktivität,

wodurch die T-Zell Aktivierung verhindert und ein Polyomavirus vermitteltes Tumorwachstum inhibiert werden kann (Nguyen et al., 2002). Eine Reexpression von *KSR* in *KSR*-defizienten Fibroblasten der Maus führt zu einer gesteigerten Aktivierung von ERK und zu einem Anstieg der Zellproliferationsrate auf das dreifache (Kortum and Lewis, 2004). Eine Fortleitung der Aktivität innerhalb der ERK1/2-Kaskade ist also zumindest teilweise abhängig von der Anwesenheit von *KSR* (Therrien et al., 1996). Die kombinierte Deletion des *KSR*-1- und *KSR*-2-Gens in Caenorhabditis elegans führte zu einem vorzeitigen Versterben in der embryonalen Entwicklung der Tiere (Ohmachi et al., 2002). Die Interaktion zwischen *KSR* und *MEK* wurde als konstitutiv, also ohne die Notwendigkeit einer vorausgehenden Aktivierung, beschrieben. Dagegen scheint die Interaktion von *KSR* zu c-*RAF* und ERK stimulationsabhängig zu sein (Morrison, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die katalytische Funktion von *RAF* abhängig ist von einer speziellen Art der Dimerisation seiner Kinase-Domäne, einem sogenannten „side-to-side dimer". Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *KSR* daran über die Bildung von „side-to-side" Heterodimeren beteiligt ist und dadurch die *RAF*-Aktivierung einleiten kann (Rajakulendran et al., 2009). Dabei stellt *KSR* einen essentiellen Mediator bei der Bildung funktioneller *RAF*-*MEK*-Komplexe dar (Clapéron and Therrien., 2007). In *KSR*-1-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass unter EGF Stimulation B-*RAF*-c-*RAF*-Komplexe erst nach Reexpression von *KSR*-1 nachweisbar waren. *KSR-1* scheint demzufolge essentiell für die Bildung von B-*RAF*-c-*RAF* Hetero-Oligomeren zu sein (Chen C et al., 2008). Die Heterooligomerisation von c-*RAF* und B-*RAF* bewirkt unabhängig von der B-*RAF*-Kinase-Aktivität eine Steigerung in der c-*RAF*-Kinase-Aktivität (Wan et al., 2004, Garnett et al., 2005). Daneben führt die Homooligomerisation von *KSR* zu funktionellen B-*RAF*-*MEK*-Komplexen und zu einer Aktivierung von *MEK* (Chen C et al., 2008). Damit ist *KSR-1* sowohl an der Aktivierung der MAP2K als auch an der Aktivierung der MAP3K der ERK1/2-Kaskade beteiligt.

1.5 *IMP*, ein Regulator der ERK1/2-Kaskade

Die E3-Ubiquitin-Ligase *IMP* (*impedes mitogenic signal propagation*) wurde erstmals 1998 als ein zytoplasmatisches Protein beschrieben und durch *Yeast Two-Hybrid screening* als Interaktionspartner des Kern-Lokalisations-Motivs (NLS = engl. *nuclear localisation sequence*) von BRCA1 (Breast Cancer 1/Brustkrebsgen 1) identifiziert. *IMP* ist daher auch unter dem Namen BRAP (*BRCA1 Associated Protein*) bekannt (Li et al., 1998). Daneben konnte gezeigt werden, dass *IMP* über eine Interaktion mit der

NLS von p21 dessen Kerntranslokation verhindern kann (Asada et al., 2004).

IMP ist ein in Eukaryonten hochkonserviertes Protein mit einem Molekulargewicht von 69 kDA. Aus der Aminosäuresequenz von *IMP* lässt sich auf das Vorhandensein einer RING-H2-Domäne, gefolgt von einem Zinkfinger Motiv und einem kurzen *Leucin Zipper Coiled Coil* schließen (Matheny et al., 2004). Damit ähnelt *IMP* in seiner Bauweise Proteinen mit einer *RING-B box Coiled Coil* (RBCC), zu denen unter anderem Proto-Onkogene wie *transcriptional intermediary factor 1* (*TIF-1*) und *Promyelocytic leukemia protein* (*PML*) gehören. Neben dieser RING-Typ Zink-Finger Domäne folgt in 3‘ Richtung der DNA-Sequenz eine weitere Ubiquitin-Protease-ähnliche Zink-Finger-Domäne (siehe Abb 1.5 Seite: 24). Zinkfinger sind Strukturmotive, bei denen ein Zink-Atom über Histidine koordinativ gebunden ist. Oftmals erfolgt über Zinkfinger eine spezifische Interaktion mit DNS und RNS und auch mit Proteinen. Das UBP-ZnF Motiv ist mit Ausnahme von *IMP* bisher nur in De-Ubiquitinylierungs-Enzymen (*DUB* engl. *De-ubiquitinating enzyme*) und in der HDAC6 Histone Deacetylase bekannt (Reyes-Turcu et al., 2006). Daher wird angenommen, dass es sich bei *IMP* um eine E3-Ubiquitin-Ligase handelt, und dass das UBP-ZnF Motiv entsprechend den DUBs eine Bindungsfunktion für Polyubiquitin darstellt.

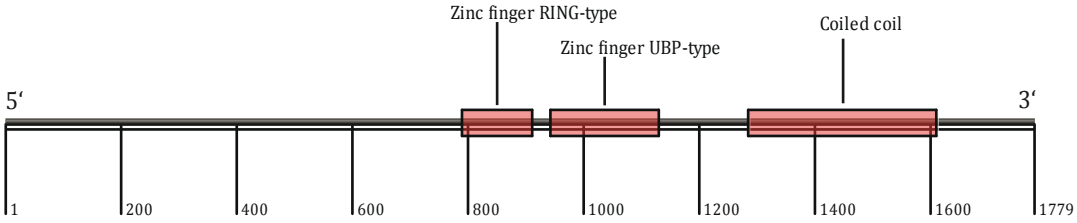


Abb. 1. 5 Übersicht über wichtige Domänen der Ubiquitin-Ligase *IMP* anhand der DNS-Sequenz

IMP kann bei vermehrter Expression eine hemmende Funktion auf die ERK1/2-Kaskade ausüben. Dabei scheint neben *IMP* die Anwesenheit von *KSR* (siehe Einleitung 1.4 Seite: 18) notwendig zu sein, um die *MEK*-Aktivierung zu beeinflussen (Matheny et al., 2004). Der hemmende Einfluss von *IMP* auf die Bildung funktioneller *RAF*-*MEK*-Komplexe beruht wenigstens zu einem Teil auf der Reduktion von *KSR*-Homooligomeren. Die Homooligomerisation von *KSR*-Proteinen erfolgt über die Interaktionen in den C-terminalen Hälften der Proteine und wird durch die Expression von *IMP* verringert (Chen C et al., 2008). Dies könnte zum Teil auf einer direkten Interaktion zwischen *IMP* und *KSR* beruhen, da diese sich im Bereich ihrer N-terminalen Hälften binden können (Matheny et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *IMP* in *KSR*-Komplexen zusammen mit *MEK* jedoch nicht zusammen mit B-*RAF* vorkommt. Tatsächlich kann durch die Expression von *IMP* eine

Oligomerisation von *KSR-MEK*-Komplexen mit *KSR*-B-*RAF*-Komplexen über eine Hemmung der Homooligomerisation von *KSR* verhindert werden (Chen C et al., 2008) (siehe Abb. 1.6 Seite: 26). Dabei wird jedoch die Interaktion zwischen *KSR* und *MEK* bzw. *KSR* und B-*RAF* nicht beeinflusst. Die für die *MEK*-Aktivierung notwendige Interaktion mit B-*RAF* wird somit limitiert.

Darüber hinaus scheint *IMP* ebenfalls *KSR*-vermittelt die Bildung von c-*RAF*-B-*RAF*-Heterooligomeren zu hemmen und so zu einer reduzierten, c-*RAF*-vermittelten Aktivierung von *MEK* führen zu können (Chen C et al., 2008) (siehe Abb. 1.6 Seite: 26).

In einem *Yeast Two-Hybrid* screen konnte *IMP* als ein spezifischer Interaktionspartner von *RAS* identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *RAS* die intrazelluläre *IMP*-Konzentration durch Induktion der Auto-Ubiquitinylierung von *IMP* reguliert. Damit aktiviert *RAS* sowohl direkt über die *RAF*-Kinase Aktivität, als auch indirekt über den Abbau von *IMP* die ERK1/2-Kaskade (Matheny et al., 2004).

Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass *IMP* als ein funktioneller Gegenspieler von *RAS* innerhalb der ERK1/2-Kaskade wirkt und möglicherweise die Funktion eines Schwellenwertregulators hat. Die hemmende Wirkung von *IMP* auf die ERK1/2-Kaskade erfolgt durch eine *KSR*-abhängige Inhibition der Signalfortleitung von *RAF* auf *MEK*, die zumindest teilweise durch eine Unterbrechung der *KSR-1*-Homooligomerisation und der B-*RAF*/c-*RAF*-Heterooligomerisation zu erklären ist (Matheny and White, 2009).

Eine Bedeutung von *IMP* für verschiedene kardiale Mechanismen ist zunehmend wahrscheinlich: So konnte im Tiermodel bei Ratten über eine durch Monocrotalin induzierte Rechtsherzbelastung *IMP* als ein selektiv nur im Proteom des rechten Ventrikels angereichertes und danach offenbar über mechanische Last reguliertes Protein identifiziert werden (Schott et al., 2005).

In transgenen Mäusen führte die Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von *IMP* zu einer ausgeprägten dilatativen Kardiomyopathie mit deutlich verminderter Kontraktionskraft des Herzens und erhöhter Mortalität (Grebe, 2008). Eine Deletion des *IMP* Gens bei Mäusen führt zu einem vorzeitigen Versterben der Tiere zwischen dem 9. und dem 11. Tag der Embryonalentwicklung (Grebe, 2008).

2009 konnte für die asiatische Bevölkerung gezeigt werden, dass bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen (*SNP*, engl. *single nucleotide polymorphism*) im *IMP* Gen einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung eines Herzinfarktes darstellen (Ozaki et al., 2009).

Die KSR1-abhängige Modulation der ERK1/2-Kaskade durch IMP

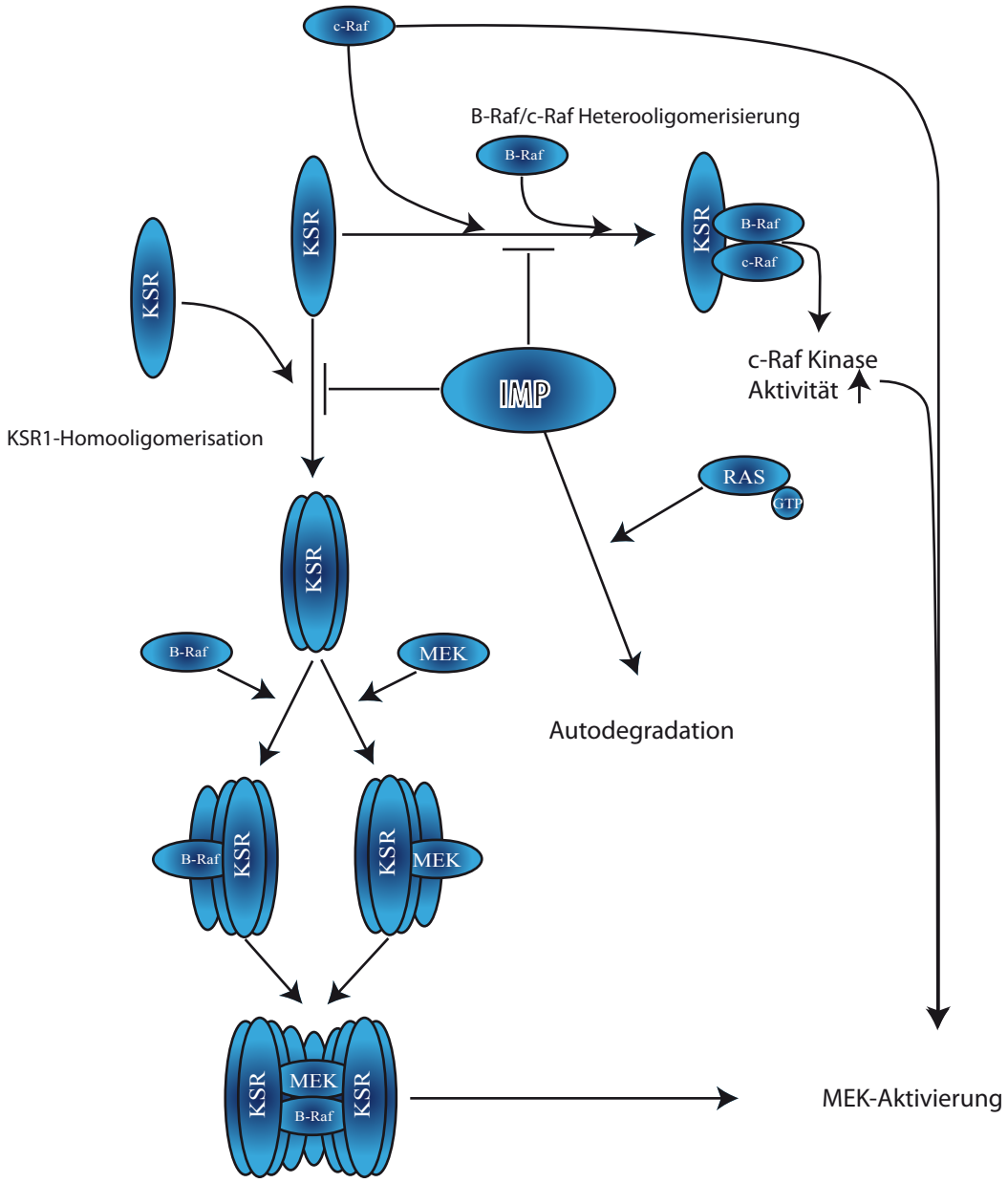


Abb. 1. 6 Übersicht zur *MEK*-Aktivierung
2008 wurden von Chen C et al. zwei möglicherweise unabhängige Wege der *MEK*-Aktivierung beschrieben. Zum einen erfolgt eine *MEK*-Aktivierung über c-*RAF*. *KSR-1*-vermittelt kann hier die c-*RAF*-Kinase-Aktivität über eine Heterooligomerisation von c-*RAF* mit B-*RAF* gesteigert werden, woraus eine vermehrte *MEK*-Aktivierung resultiert. Dies erfolgt unabhängig von der B-*RAF*-Kinase-Aktivität.
Der andere Weg der *MEK*-Aktivierung erfolgt über B-*RAF*. Durch die Homooligomerisation von kann B-*RAF* an *MEK* gebunden werden und über seine Kinase-Aktivität zu einer *MEK*-Aktivierung führen.
IMP kann beide Wege zum einen über die Beeinflussung der *KSR*-Homooligomerisation, zum anderen über die Beeinflussung der B-*RAF*-c-*RAF* Heterooligomerisation *KSR*-abhängig hemmen. Die basale c-*RAF*-Kinase-Aktivität bleibt dabei unbeeinflusst

1.6 Mutagenese

Die Mutagenese wird als labortechnisches Untersuchungsverfahren eingesetzt, um Zusammenhänge von Aufbau und Funktion einzelner Proteine aufzuklären. Funktion und strukturelle Aufgabe einer einzelnen Aminosäure in einem Protein können durch den direkten Vergleich des mutierten Proteins mit dem Wild-Typ/Original untersucht werden.

Vor der Ära der zielgerichteten (engl.: *site-directed*) Mutagenese konnten Mutationen lediglich über die natürliche Fehlerrate der DNS-Replikation hergestellt werden, und sie mussten darüber hinaus phänotypisch oder durch eine gezielte Untersuchung identifiziert werden können. Dabei wurde die Mutationsrate durch den Einsatz von Mutagenen erhöht. Eine Isolierung von letalen Mutationen oder Mutationen ohne überprüfbare Veränderung des Phänotyps war nicht möglich, (Zaccolo, 1996; Zaccolo and Gherardi, 1999) und sowohl die Art als auch die Position der Mutation innerhalb des gewünschten Gens waren zufällig verteilt. Eingang gefunden hat diese Methode zur Erstellung von Gen-Datenbanken.

Erst durch die Entwicklung der zielgerichteten Mutagenese (Smith M et al., 1985) wurde es möglich, einzelne Basen gezielt in der DNS-Sequenz zu verändern. Dabei wurden die Möglichkeiten der DNS Synthese und der Mutagenese in den folgenden Jahren durch die Entwicklung eines effizienten Verfahrens zur Herstellung synthetischer Oligonukleotide, der Phosphoramidit-Methode (McBride and Caruthers, 1983) und insbesondere durch die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) revolutioniert. Dies führte 1993 zur Verleihung des Chemie-Nobelpreises zu gleichen Teilen an Kary Mullis für die Entdeckung der PCR und an Michael Smith für die erste zielgerichtete Mutagenese.

In der vorliegenden Arbeit bildet die zielgerichtete Mutagense die Grundlage für weitergehende Untersuchungen der Ubiquitin-Ligase *IMP*.

1.7 Ziele der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Abschnitten erläutert, spielen die MAPK Kaskaden eine entscheidende Rolle bei der Hypertrophie-Entwicklung. Insbesondere die ERK1/2-Kaskade scheint als ein zentraler Regulator an der Entstehung der Herzhypertrophie beteiligt zu sein. Ihre Aktivität unterliegt wahrscheinlich inhibitorischen Einflüssen durch *IMP*. Die mögliche Hemmwirkung von *IMP* auf die ERK1/2-Kaskade in Abhängigkeit von Phosphorylierungen wurde bislang nicht untersucht. Potentielle Phosphorylierungsstellen konnten durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Grebe, 2008) identifiziert werden. Mögliche Auswirkungen einzelner Phosphorylierungsschritte auf die Aktivität der ERK1/2-Kaskade sollten mit Hilfe der vorgelegten Arbeit quantifiziert werden. Unser besonderes Interesse galt dabei folgenden Fragestellungen:

1. Gibt es Unterschiede hinsichtlich des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* im Vergleich zu dem Einfluss von *IMP* auf die Interaktion zwischen c-*RAF* und *MEK*?

Dazu wurde der Einfluss von *IMP* sowohl auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* als auch auf die Interaktion zwischen c-RAF^{BXB} und *MEK* mit Hilfe des *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* und des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* verglichen.

2. Unterscheidet sich eine nicht ubiquitinylierbare *IMP*-Mutante von Wildtyp-*IMP* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK*?

Dazu wurde die nicht ubiquitinylierbare Mutante IMP^{C264A} erstellt und ihr Einfluss auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* mit dem Einfluss von Wildtyp-*IMP* auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* verglichen.

3. Gibt es Phosphorylierungsstellen in *IMP*, die in der Lage sind, die Aktivität, mit der *IMP* die Signalfortleitung innerhalb der ERK1/2-Kaskade hemmt, zu beeinflussen?

In diesem Zusammenhang sollten im Vorfeld identifizierte potentielle Phosphorylierungsstellen im *IMP*–Gen zunächst mutiert und dann mit Hilfe des *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* und des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* bezüglich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid/Bisacrylamid 40%	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose Sea Plaque® GTG	Biozym Scientific, Oldendorf
Agarose, low melting GQT	Severn Biotech,Kidderminster (UK)
Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Anilinblau	Sigma-Aldrich, München
Antibiotic/Mycotic-Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Aprotinin	Roche, Mannheim
Bacto Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Butan-Dion-Monoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich, München
Canamycin	Sigma-Aldrich, München
Carbenecillin	Sigma-Aldrich, München
Carbenicillin	Roth GmbH, Karlsruhe
Carnitin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München

Substanz	Bezugsquelle
Creatine anhydrous	Sigma-Aldrich, München
Cytosin-β-D-arabinofuranosid-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DNS-Längenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium	Sigma-Aldrich, München
Eisen(III)-chlorid, wasserfrei	Sigma-Aldrich, München
Endothelin	Sigma-Aldrich, München
Entwicklerlösung	Kodak, Darmstadt
EosinY-disodium	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fixierlösung	Kodak, Darmstadt
Flag-Peptid	Sigma-Aldrich, München
Formalin	Merck, Darmstadt
Glukose (Dextrose)	AppliChem, Darmstadt

Substanz	Bezugsquelle
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, München
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Isoprenalin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Kollagenase CLS 2	Biochrom, Berlin
Ladepuffer (für DNS-Gelelektrophorese)	Fermentas, St. Leon-Rot
Laminin	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	Biomol, Hamburg
M199-Medium	Sigma-Aldrich, München
M199-Medium	GibcoBRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt

Substanz	Bezugsquelle
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na_3PO_4)	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyrophosphat ($Na_4P_2O_7$)	Sigma-Aldrich, München
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
PBS	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin	Biomol, Hamburg
peqGOLD Universal Agarose	PEGLAB, Erlangen
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphomolybdänsäure	Sigma-Aldrich, München
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20)	Bio-Rad Laboratories, München
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Precision Plus Blue, All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, München
Rinderalbumin	Sigma-Aldrich, München
Röntgen-Superfix	Tetenal AG, Norderstedt
Roti®-Blue	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SeaKem HE Agarose	Combrex Bio Science, Rockland (USA)
Select Yeast Extract	Gibco, Eggenstein
Softa-Man	Braun, Melsungen
SuperFect®Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Taurin	Sigma-Aldrich, München

Substanz	Bezugsquelle
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris-Base)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, München
Vecta Shield ohne DAPI	VectorLab, Burlingame (USA)
XRay-Developer LX24	Kodak, Darmstadt
Xylenxyanol FF	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Sigma-Aldrich, München
ZVAD-FMK	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.2. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
BamHI	Promega, Mannheim
DPNI	Promega, Mannheim
EcoRI	Promega, Mannheim
EcoRV	Promega, Mannheim
Fast-Link™ DNS-Ligase	Biozym Scientific, Oldendorf
MluI	Promega, Mannheim
PfuTurbo™ Hotstart DNS Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
PfuUltra™ Hotstart DNS Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
96-Well-Platten für Luminometer	Greiner, Solingen
24-Well-Platten für Zellkultur	Nunc, Langenselbold
Elektoporationsküvetten	Biozym Scientific, Oldendorf
Falcon Culture-slides	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier	WhatmanÒ, Dassel
Kulturschalen für Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
ProtranÒ Nitrcellulose Transfer Membran	WhatmanÒ, Dassel
Röntgenfilme Fuji Medical X-Ray Films	Fujifilm GmbH, Düsseldorf

2.1.4. Gebrauchsfertige Reaktionssyteme

Reaktionssystem	Bezugsquelle
Fast-Link™ DNS Ligation Kit	Biozym Scientific, Oldendorf
CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System	Promega, Mannheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAampÒ DNS Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprepÒ Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquickÒ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquickÒ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Reaktionssystem	Bezugsquelle
Quick change® II XL Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
SuperSignalÒ West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, (USA)

2.1.5. Geräte

Gerät	Hersteller
µQuant Universal Microplate-Spektralphotometer	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Bio Photometer (für Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmungen)	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammern für DNS (Owl Separation Systems)	Portsmouth, NH, USA
Elektroporations-Gerät (Easyjec T)	Wolf Laboratories Limited, York, England
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Hamburg
Geldokumentationssystem (MultiImageÔ Light Cabinet)	AlphaInnotech Inc., San Leandro, USA
Gelelektrophoresekammer (für SDS-PAGE) und Blotting-Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Hamburg
Luminometer Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbach
PCR- und Real-Time PCR-Gerät iQÔ5 Multicolor Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

2.1.6. Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Carbenicillin-Stammlösung	100 mg Carbenicillin/ml in H_2O
Buffer D	Promega, Mannheim
Buffer Multicore	Promega, Mannheim
Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) H_2O	0,1% DEPC ad 2l ddH_2O Inkubation 24 Stunden unter Rühren, danach Dampfdrucksterilisation
Kanamycin-Lösung	50 mg/ml in H_2O, steril filtriert, Aliquots bei -20°C gelagert
IP-Lysepuffer	25 mM Tris 100 mM NaCl 0,5 % (v/v) NP-40 30 mM Pervanadat 10 µM CalyculinA 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 1 mg/ml E-64
Ladepuffer für PCR-Produkte	40% Sucrose 1mM EDTA 0,05% Bromphenolblau
Lämmli-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8 50% Glycerol 10% SDS 150 mM DTT 5 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Lysepuffer für Zellen/Gewebe	1% (v/v) NP 40 10% (v/v) Glycerol 137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4 10 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 7,0 20 mM NaF 1 mM Natrium-Orthovanadat 1 mM Natrium-Pyrophosphat 50 mM β-Glycerophosphat 4 µg/ml Aprotinin 4 µg/ml Leupeptin 4 µg/ml Pepstatin A 1 mM PMSF
PAGE-Laufpuffer , 5x	125 mM Tris Base 96 mM Glycin 0,5 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,8 6 M Urea 30% (v/v) Glycerol 2% (w/v) SDS Bromphenolblau
TBE, 5x	445mM Tris/HCl (pH 8,0) 445mM Borsäure 10mM EDTA

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
TBE-Puffer , 5x	445 mM Tris/HCl (pH 8,0) 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
TBS, 10x	0,2 M Tris 2 M NaCl pH 7,5
TE-Puffer,1 x	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
Transferpuffer für Western Blot, 1 x	25 mM Tris 150 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS

2.1.7. Medien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar (bei festem Nährmedium)

Medium	Zusammensetzung
SOC-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM $MgSO_4$ 10 mM $MgCl_2$ 20 mM Glukose

Die Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Für die Selektion wurden entsprechend der Resistenz Carbenicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) bzw. Kanamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml) zugegeben.

2.1.8. Längenstandards

Um die Größe von DNS-Fragmenten auf Agarosegelen zu bestimmen, liefen folgende Längenstandards parallel zu den Proben:

Längenstandard	Hersteller
Gene Ruler™ 1 kb DNS Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9. Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
BRAP-T99A-s:	5' CTTCAGAAGCCTCCCCCGCTGCGCAAAGAAGTAAAG 3'
BRAP-T99A-as:	5' CTTTACTTCTTTGCGCAGCGGGGGAGGCTTCTGAAG 3'

Name	Sequenz
BRAP-T99A-s2:	5' GAAGCCTCCCCCGCTGCGCAAAGAAGTAAAG 3'
BRAP-T99A-as2:	5' CTTTACTTCTTTGCGCAGCGGGGGAGGCTTC 3'
BRAP-S117A/S119A-s:	5'CATAAACGCTGCCCCAGATGCTCCGGCCAAACAGCTTC 3'
BRAP-S117A/S119A-as:	5'GAAGCTGTTTGGCCGGAGCATCTGGGGCAGCGTTTATG 3'
BRAP-Y218A-s:	5' CTGATGCGGATAGTTTTGCTATGACATGCAATGG 3'
BRAP-Y218A-as:	5' CCATTGCATGTCATAGCAAAACTATCCGCATCAG 3'
BRAP-S252A-s:	5'AATCTGAAGATGGCGCCGCCCTCCCAGTGATGGACCTG 3'
BRAP-S252A-as:	5'CAGGTCCATCACTGGGAGGGCGGCGCCATCTTCAGATT 3'
BRAP-T308A-s:	5' GTTTGCCGGTACTGTCAAGCGCCCGAGCCAGTAGAAG 3'
BRAP-T308A-as:	5' CTTCTACTGGCTCGGGCGCTTGACAGTACCGGCAAAC 3'
BRAP-T308A-s2:	5' GGTACTGTCAAGCGCCCGAGCCAGTAGAAG 3'
BRAP-T308A-as2:	5' CTTCTACTGGCTCGGGCGCTTGACAGTACC 3'
BRAP-T380A-s:	5'GTTCATCGACTGGTTGCAGCTAAAACAGATGGAAAAA 3'
BRAP-T380A-as:	5'TTTTTCCATCTGTTTTAGCTGCAACCAGTCGATGAAC 3'
BRAP-T395A-s:	5'CAGTATGAATGTGAGGGGGATGCTTGCCAGGAAGAGAAAATAG3'
BRAP-T395A-as:	5'CTATTTTCTCTTCCTGGCAAGCATCCCCCTCACATTCATACTG3'
BRAP-T395A-s2:	5'GATGCTTGCCAGGAAGAGAAAATAGATGCCTTACAGTTAG3'
BRAP-T395A-as2:	5'CTAACTGTAAGGCATCTATTTTCTCTTCCTGGCAAGCATC3'
BRAP-Y408A/S409A/Y410A-s:	5'CCTTACAGTTAGAGGCTGCAGCTTTACTAACAAGCCAGCTGG 3'
BRAP-Y408A/S409A/Y410A-as:	5' CCAGCTGGCTTGTTAGTAAAGCTGCAGCCTCTAACTGTAAGG 3'
BRAP-Y539A-s:	5'GCTGCGTGACGTCATGTTCGCCCTGGAGACACAGCAGAAG3'
BRAP-Y539A-as:	5'CTTCTGCTGTGTCTCCAGGGCGAACATGACGTCACGCAGC3'
BRAP-S574A-s:	5'TCGAGCCCTGCCGCTTCGGGGGGCAGTGGGAAG 3'
BRAP-S574A-as:	5'CTTCCCACTGCCCCCCGAAGCGGCAGGGCTCGA3'
BRAP-C264A-s:	5' ACTGAACTCCCCAAGGCCACGGTGTGTCTGGA 3'
BRAP-C264A-as:	5' TCCAGACACACCGTGGCCTTGGGGAGTTCAGT 3'
BRAP-restr-f:	5' ACAGGAATTCAAGCTTGCCTGCCCTATGAGTGTGTCACT 3'
BRAP-restr-r:	5'-ATATGGTACCTATTGGATCCCTTGCCCCTCTTGCT-3'

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Operon Biotechnologies in Köln bestellt.

2.1.10. Datenbanken und Analyse-Software

Folgende Software-Programme wurden zur Bearbeitung und Auswertung von Daten verwendet:

Office 2007, Microsoft Inc. USA

Graph Pad Prism Version 5-0, Graphpad Inc. USA

Lasergene, DNA Star Inc. USA

Adobe Acrobat, Adobe Systems Inc. USA

Adobe Illustrator, Adobe Systems Inc. USA

BLAST-Programm, NCBI USA

NetPhosK 1.0 Server, Technical University Denmark

Phosida, Dept. of Proteomics and Signal Transduction Max Planck Institute of Biochemistry Martinsried Germany.

2.2 Methoden

2.2.1 Mutagenese

Die Mutationen wurden mit dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers erstellt. Wie bei einer Polymerase-Kettenreaktion wird bei einer Mutagenese ein Großteil der DNS lediglich amplifiziert. Die zu erzielende Mutation wird mit Hilfe von Oligonukleotiden, die für den gesuchten Aminosäureaustausch kodieren und als Primer fungieren, in den neu entstehenden Tochterstrang integriert. Dabei synthetisiert eine Polymerase, ausgehend von den Oligonukleotiden, den komplementären Strang zum gewünschten Abschnitt der DNS. In dieser Arbeit war der Ausgangsstrang der doppelsträngige pDC 516-Vektor. Der Vektor dient der Erzeugung von Adenovieren. Die *IMP* Sequenz wurde in Vorarbeiten in den Vektor eingefügt. Für die Mutagenesen wurde der Vektor ausgehend von den Oligonukleotidsequenzen, die für den gewünschten Austausch von Aminosäuren kodierten, mit Hilfe der Pfu Ultra Polymerase amplifiziert. Die Dauer der Polymerisationsphase wurde auf die Größe des Vektors abgestimmt und betrug 1 min/kb Ausgangsstrang. Da die Größe des pDC 516 *IMP* Vektors 5796 Nukleotide betrug, entsprach dies 6 Minuten. Die übrigen Bedingungen der PCR-basierten Mutagenese entsprachen denen einer gewöhnlichen PCR (siehe Tab. 2.2.1 Seite 42).

Nach der Synthese wurden die im Gegensatz zu den Tochtersträngen methylierten Ausgangsstränge unter Zuhilfenahme des Restriktionsenzyms Dpn I fragmentiert

(siehe Methoden 2.2.7 Seite: 47), um den Anteil an mutierten Klonen in der folgenden Transformation zu erhöhen. Dpn I schneidet selektiv methylierte DNS und kann daher die Konzentration der Ausgangsstränge verringern (siehe Abb. 2.2.1 Seite: 43). Für die Fragmentierung wurde 1µl Dpn I zugesetzt und für eine Stunde bei 37° inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz
H_2O 40,3µl Puffer X 5µl dNTP 1µl Template 0,2µl [Brap pDC 516 100ng/µl] Primer s 1,25 µl [1:1000] Primer as 1,25 µl [1:1000] PfuUltra™ High-Fidality 1µl / PfuTurbo™ High-Fidality
PCR-Cycler Einstellungen
1x [95° 30''] 16-18 x [95° 30'',55° 1', 66-72° 6'] 1x [68° 10'] 1x [4° ∞]
Restriktionsverdauung
1µl DPN I/50µl Konstrukt; Inkubation: 1h bei 37 °C

Tab. 2.2. 1 Übersicht über die Mutations-/Amplifikationsreaktionen

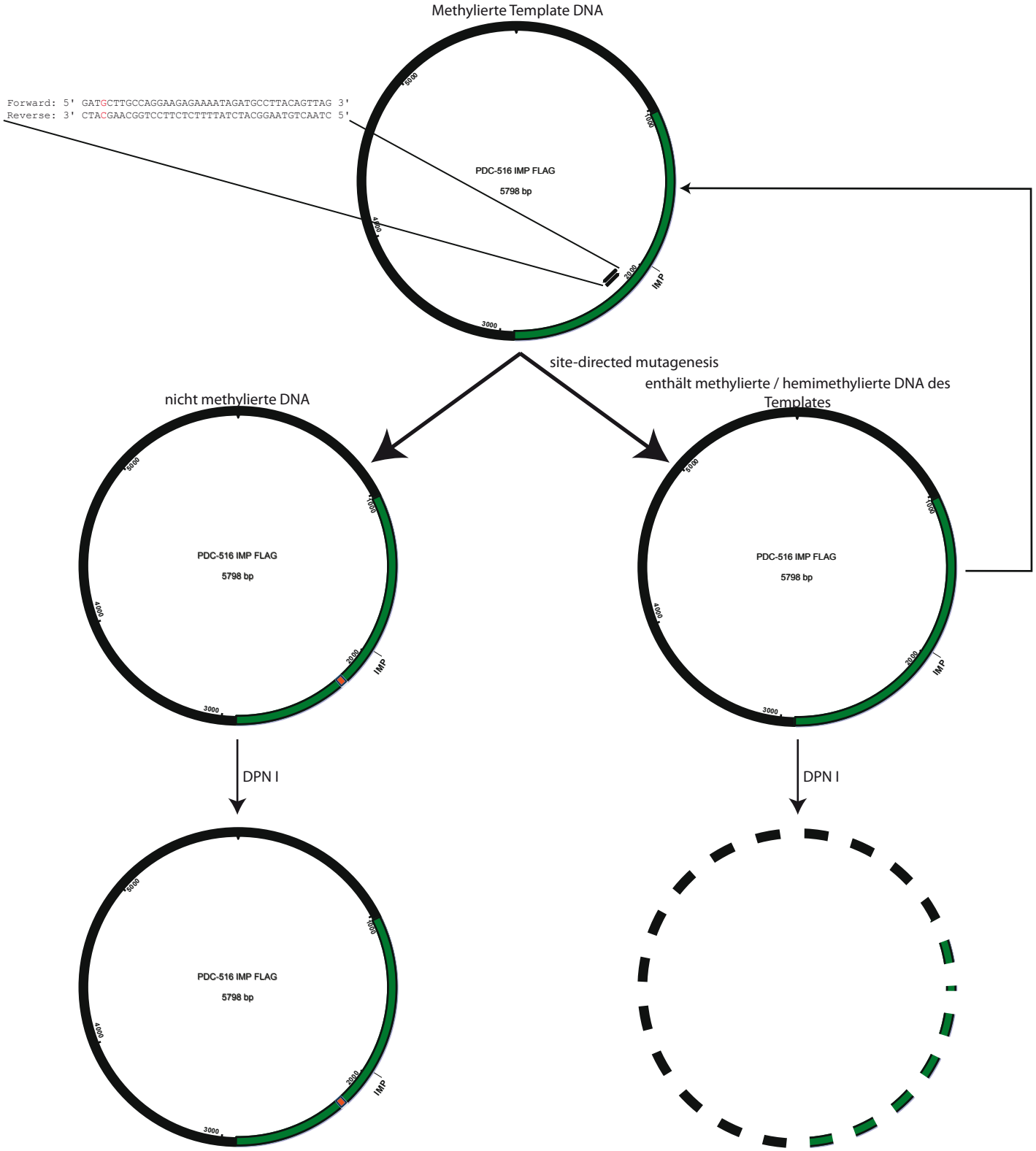


Abb. 2.2. 1 Schematische Darstellung der Mutagenese
In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Mutationen mit Hilfe von Oligonukleotiden vorgenommen, in denen die gewünschte Mutation schon enthalten war und die in einer PCR-Reaktion als Primer fungierten. Ab dem 2. PCR-Zyklus entstanden durch die semikonservative Replikation der DNS Vektoren, die in beiden Strängen die gesuchte Mutation enthielten. Darüber hinaus waren die entstehenden Tochterstränge im Gegensatz zu den durch Bakterien synthetisierten Ausgangssträngen nicht methyliert, so dass man in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Dpn I selektiv methylierte DNS verdauen und damit die Konzentration der DNS des Ausgangsstranges verringern konnte. Anschließend erfolgte eine Transformation mit chemokompetenten XL1-Blue cells.

2.2.2 Transformation

Die nicht virale Aufnahme von freier DNS in Zellen wird als Transformation bezeichnet. Die Transformation wurde sowohl mit elektrokompetenten als auch mit chemokompetenten E. coli - Zellen durchgeführt. Die Elektroporation wurde für Retransformationen und bei Transformationen im Rahmen von zuvor erstellten Ligationen angewandt. Die Transformation über chemokompetente Zellen via Hitzeschock wurde bei der Erstellung der Phosphorylierungsmutanten bzw. der nicht ubiquitinylierbaren Mutante verwendet.
Die Transformation dient der Überführung von DNS in prokaryotische Zellen. Bei der Elektroporation wird mit Hilfe eines Elektroporators ein elektrisches Feld erzeugt, das über eine Poreninduktion die Semipermeabilität der bakteriellen Zellmembran aufhebt (Dower et al., 1988). Dadurch kann zuvor zum Reaktionsansatz zugeführte freie DNS in den intrazellularen Raum gelangen. Durch die Aufnahme und Transkription der Vektor-DNS erlangen die transformierten Bakterien eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum, sofern auf der DNS des Vektors das entsprechende Resistenz-Gen kodiert ist. Dies wird genutzt, um eine Selektion der transformierten von den nicht transformierten Zellen auf den mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Nährmedienplatten durchzuführen.

Für die Elektroporation wurde zunächst ein 50 µl-Aliquot elektro-kompetenter Zellen (XL1-Blue Electroporation-Competent Cells, Stratagene) auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligations- bzw. Retransformationsansatzes versetzt. Unmittelbar danach wurden die Bakterien in eine zuvor auf -20°C gekühlte E.coli Pulser® Cuvette (Bio-Rad Laboratories, München) überführt. Die Bakterien wurden dann einem elektrischen Impuls von 2,5 kV, 25 µF (EasyjecT basic Elektroporationssystem, Equi Bio, Kent (UK)) ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 500 µl SOC-Medium. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C unter Schütteln. Danach wurden 50µl der transformierten Zellen auf einer mit einem Antibiotikum versetzten Agarplatte ausgestrichen. Einzelkolonien zeigten sich nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C. Die Kolonien wurden einzeln gepickt, die Bakterien in LB-Medium bei 37°C über Nacht vermehrt und die DNS-Vektoren anschließend mit einer Mini- bzw. Midi-Präparation mit Hilfe eines Kits (siehe Methoden 2.2.3 Seite: 45 und Methoden 2.2.5 Seite: 46) aus den lysierten Bakterien extrahiert.
Für die Transformation via Hitzeschock wurde zunächst ein 50 µl-Aliquot chemo-kompetenter Zellen (XL1-Blue Supercompetent Cells, Stratagene) auf Eis aufgetaut und mit 3-7 µl des Mutageneseansatzes (siehe Methoden 2.2.1 Seite: 41) versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Über einen Hitzeschock von

42 °C für 45 Sekunden in einem Wärmeblock wurde analog zur Elektroporation die Aufnahme von zuvor zugeführter freier DNS ermöglicht. Die weiteren Schritte entsprachen denen der Elektroporation.

2.2.3 Minipräparation von Plasmid-DNS

Um die auf den Nährmedienplatten entstandenen Bakterien-Klone auf die gesuchte Mutation zu untersuchen, wurden einzelne Kolonien von den LB-Carb-Platten mit einer autoklavierten Pipettenspitze entnommen und dann in 5 ml LB-Carb-Medium gegeben. Bei 37 °C wurden die Zellen über Nacht in einem Schüttler bei ca. 200rpm inkubiert. Die eigentliche Plasmidpräparation erfolgte mit einem Kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979). Hierzu wurden 2 ml der Übernachtkultur in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (E-Cup) bei 4 °C und 6000rpm für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß erneut mit 2ml der Übernachtkultur gefüllt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4° C und 6000rpm für 5min und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 250 µl RNase haltiger P1-Lösung vollständig resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 250 µl der alkalischen P2-Lösung zugegeben und durch 4-6 maliges Wenden des E-Cups vorsichtig gemischt. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Denaturierung der DNS. Durch rasche Zugabe der N3-Lösung erfolgte eine schlagartige Neutralisation, wodurch es zu einem Ausfallen der genomischen DNS kommt. Die Plasmid DNS hingegen renaturierte und blieb in Lösung. Unmittelbar danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000rpm und 4 °C für 10min, so dass die denaturierten Proteine und die genomische DNS sich als Pellet absetzten. Der die Plasmid - DNS enthaltende Überstand wurde dann auf eine Silika-Säule gegeben, die die Plasmid - DNS bei hoher Salzkonzentration und geringem pH Wert adsorbiert. Um Endonukleasen zu entfernen und einem damit verbundenen Verlust von Plasmid - DNS vorzubeugen, wurde die Säule mit 0,5ml PB-Puffer gewaschen. Als Vorbereitung des Auswaschvorgangs (Elution) wurde die Salzkonzentration durch ein Waschen der Säule mit 0,75ml PE-Puffer reduziert. Die Elution erfolgte dann unter geringerer Salzkonzentration in 50µl Wasser oder 50µl EB Puffer in ein 1,5-ml-E-Cup.
Es folgte die photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration (siehe Methoden 2.2.6 Seite: 46) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Qualität der so gewonnenen Vektor-DNS war ausreichend gut, um sie für Sequenzierungen und Restriktionsanalysen einsetzen zu können. Der Rest der Übernachtkultur konnte bei Bedarf für die Erstellung eines Glycerin-Stocks verwendet werden.

2.2.4 Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks

In einem Kryoröhrchen wurden 500 µl einer Bakteriensuspension mit 500µl sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei –80°C aufbewahrt (Swift, 1937)

2.2.5 Midipräparation von Plasmid-DNS

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNS, die insbesondere für die Transfektionen (siehe Methoden 2.2.18 Seite: 55) im Rahmen des *Mammalian Two-Hybrid Assay* (siehe Methoden 2.2.17 Seite: 53) benötigt wurden, kam das HiSpeed® Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden), welches auf dem Prinzip der modifizierten alkalischen Lyse von Bakterienzellen beruht, zum Einsatz. Die Zellen einer 50-ml-Übernachtkultur wurden in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen bei 4 °C und 4000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 6 ml P1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 6 ml der alkalischen P2-Lösung durch 4-6 maliges Wenden des Falcon-Röhrchens vorsichtig gemischt und nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die klare Suspension mit 6 ml gekühltem P3-Puffer (bei 4 °C gelagert) versetzt. Nach erneutem 4-6 maligem Wenden des Falcon-Röhrchens wurde das Lysat unmittelbar in einen Filtereinsatz (QIAfilter midi) überführt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Daraufhin wurden über dem Filtereinsatz die gefällten Bestandteile aus dem Lysat entfernt, das plasmidhaltige Filtrat in einen weiteren, DNS-bindenden und einmalig mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierten Filtereinsatz (HiSpeed Midi) überführt und nach dem Durchlaufen des Filters mit 20 ml QC-Puffer gewaschen. Der Durchfluss durch die Filtermatrix mit Bindung der DNS (Anionen-Austausch) erfolgte über Gravitation. Bei hoher Salzkonzentration wurde mittels QF-Puffer die DNS aus dem Filter herausgewaschen (Elution). Die DNS wurde dann mit 3,5 ml 0,7 Vol % Isopropanol bei RT gefällt und in einem Filter-Modul (QIAprecipitator Midi Module) gesammelt. Zur weiteren Reinigung der DNS erfolgten ein Waschschritt mit 2 ml 0,7 Vol % Ethanol und eine sorgfältige Trocknung des Filter-Moduls. Danach wurde die DNS mit 500µl Wasser aus dem Filter-Modul eluiert und der DNS-Gehalt photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Spektralphotometer messen durch das

Beleuchten der Messfläche über das gesamte Spektrum von infrarot bis ultraviolett des sichtbaren Lichtes die Remissionswerte. Dadurch können die genaue Wellenlänge der Farbe definiert und Farbabweichungen von einem Messpunkt zum nächsten berechnet werden.

Dazu wurde zunächst die Extinktion des Nullwertes mit Wasser bestimmt, um diese dann von den Messwerten der Proben abziehen zu können. Die Verdünnung der Proben (meist 1:20) wurde so gewählt, dass die Extinktion bei 260nm, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht, im optimalen Messbereich zwischen 0,1 und 1,0 lag. Um störende Verunreinigungen auszuschließen, wurden gleichzeitig die Extinktion bei 230nm für Kohlenhydrate und Salze (E260/E230 > 2), bei 280 nm für Proteine (E260/E280 > 1,8) bzw. bei 320 nm für Schwebstoffe (E320 nahe 0) gemessen und die Proben bei Bedarf entsprechend gereinigt bzw. verworfen. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde mittels folgender Formel durchgeführt:

$$[C]\ [\mu g/\mu l] = (E260 - E320) \times f \times c$$

[C]	Nukleinsäurekonzentration der gemessenen Probe
E	Extinktion
f	Verdünnungsfaktor
c	nukleinsäurespezifischer Koeffizient in µg/µl • für doppelsträngige DNS: c = 0,05 µg/µl • für einzelsträngige DNS: c = 0,025 µg/µl

2.2.7 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Für die enzymatische Spaltung von DNS wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Dabei handelt es sich um Bakterien-Enzyme, die DNS ohne ATP-Verbrauch innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer Erkennungssequenz schneiden können und darüber hinaus keine Methyltransferase-Aktivität besitzen (Roberts et al., 2003).

Für den Restriktionsansatz wurden pro µg DNS 2-3 U des jeweiligen Enzyms verwendet. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Puffers, um eine ausreichende enzymatische Aktivität und Spezifität gewährleisten zu können. Die Inkubation erfolgte in einem Mindestvolumen von 20µl bei 37°C über Nacht oder für

Testansätze über 1-2h. Anschließend wurde die Spaltung der DNS mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Die Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte über eine Denaturierung durch Hitze (15min bei 65°C) oder ergab sich aus der folgenden Verwendung des Ansatzes.

2.2.8 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNS aus Agarosegelen basiert auf der in Gegenwart eines thixotropen Salzes spezifischen Bindung von DNS auf Glas bzw. Silikaoberflächen (Vogelstein and Gillespie 1979). Im Rahmen der Arbeit wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die zuvor mittels Gelelektrophorese gewonnene DNS-Bande wurde den Herstellerangaben entsprechend extrahiert und mit Wasser eluiert.

2.2.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Unter Ligation versteht man die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNS- oder RNA-Segmente an ihren Enden. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäurensegmente mit Hilfe des Enzyms Ligase durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden, so dass rekombinante DNS-Moleküle entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Insert - zu - Vektor - Verhältnis von 3:1 (Mol DNS) angestrebt und mit Hilfe des LIGATION CALCULATORs (www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) die benötigte Menge in ng errechnet:

100 ng Vektor-DNS

16-51 ng Insert-DNS

1 µl Fast-LinkTM DNS-Ligase (2 U/µl)

1,5 µl 10× Ligationspuffer

1,5 µl 10 mM ATP

ad 15 µl H_2O.

Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Ligase anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert.

2.2.10 Agarose – Gel – Elektrophorese

Die Agarose – Gel - Elektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe. Durch den Vergleich mit Strängen bekannter Länge kann näherungsweise die Länge eines Nukleinsäurestranges bestimmt werden. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch die Gelmatrix, wodurch eine Auftrennung der Nukleinsäureströnge entsprechend ihrer Größe ermöglicht wird. Die Laufgeschwindigkeit der Banden ist von der Porengröße des Gels, die von der Agarose-Konzentration abhängt (150 nm bei einprozentigen, 500 nm bei 0,16-prozentigen Gelen), und von der angelegten Spannung abhängig.
In der Regel wurde ein 0,8% Gel verwendet, weil dadurch eine gute Separation der PCR-Produkte erfolgte. Um die DNS Banden später im Gel identifizieren zu können, wurde nach dem Aufkochen der Agarose in 1 × TBE-Puffer Ethidiumbromid (2,5/100 ml) zugesetzt. Ethidiumbromid bindet an Nukleinsäuren und verändert dabei sein Absorptionsspektrum (Waring, 1965). Dabei wird unter dem Einfluss von UV-Licht die Intensität der Fluoreszenz-Emission durch die Bindung (Interkalation) mit Nukleinsären um den Faktor 50–100 gesteigert. Entsprechend dem benötigten Volumen wurden beim Gießen des Gels in den Gelträger Kämme eingesetzt. Nach Härtung des Gels wurde das Gel in die mit 1 × TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt, und es wurden die mit Ladepuffer beschwerten Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei 50-125V.

2.2.11 Zellkultur

Die adhärent wachsenden COS-7-Zellen, wurden in Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium (Sigma-Aldrich, München) unter Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fetalem Kälber Serum (FKS) in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit 5% CO2 bei 37°C. In Abhängigkeit von der Proliferationsrate wurde die Zellkultur ein- bis zweimal pro Woche auf zwei neue Zellkulturschalen aufgeteilt. Die Zellen wurden dazu mit 1× DPBS gewaschen und für 5min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA in Ca^{2+}/Mg^{2+}-freier PBS-Lösung) inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde anschließend abgesaugt, und die Zellen wurden vorsichtig unter Spülen mit DMEM vom Boden der Gewebekulturflaschen gelöst. 5-10% dieser Zellsuspension wurden dann zur weiteren Kultur verwendet.

2.2.12 Herstellung von Protein-Lysaten aus eukaryontischen Zellen

Um Lysate für den Luciferase Assay (siehe Methoden 2.2.18 Seite: 55) herzustellen, wurden die Zellen einer am Vortag transfizierten 24-Well-Platte zunächst in 500µl DPBS gewaschen und anschließend mit 100µl 1:4 verdünntem Passive Lysis Buffer (PLB) für 15min unter leichtem Schwenken auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung von Protein-Lysaten für den Western Blot wurden die Zellen einer 10-cm-Kulturschale zunächst mit 5 ml DPBS vorsichtig gewaschen. Danach wurden 1 ml DPBS auf die Kulturschale gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Die gelösten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4° C und 6000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl Lysepuffer resuspendiert und durch mehrfaches Aspirieren durch eine 40G-Kanüle lysiert. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Proben über 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der die Zellproteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dadurch wurden die unlöslichen Bestandteile entfernt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (2.16.4) wurde das Lysat bei -80°C gelagert.

2.2.13 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Mit Hilfe des BCATM Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford (USA)) wurde die Proteinkonzentration eines Protein-Lysates bestimmt. Die BCA-Methode (Smith P et al., 1985) basiert auf der Biuret-Reaktion. Dabei werden Cu^{2+}-Ionen in einer wässrig alkalischen Lösung unter Bildung eines farbigen Komplexes mit Oligopeptiden, die mindestens zwei Peptidbindungen aufweisen, zu Cu^{+}-Ionen (Lösung B) reduziert. Dabei komplexiert das entstandene einwertige Kupferion mit Bicinchoninsäure (Lösung A) zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe. Der entstehende Farbkomplex weist ein Absorptionsmaximum bei 562 nm auf. Durch die Verwendung von Proteinstandardkonzentrationen (0-2000 µg/ml) kann die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden ermittelt werden.

Dazu wurden 25µl der Standardkonzentrationen und 25µl einer 1:5- bzw. 1:10-Verdünnung der Proteinlösung mit 200µl einer 50:1 - Mischung der Lösungen A und B versetzt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Extinktion bei 562nm mit Hilfe des µQuant Universal Microplate-Spektralphotometers (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA).

2.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Variante der Polyacrylamidgelelektrophorese und dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Als Elektrolyt dient ein diskontinuierliches System mit Tris-Glycinpuffern (Lämmli, 1970). Das Natriumdodecylsulfat hat dabei die Funktion, die Eigenladung der Proteine zu überdecken, um die Proteine unabhängig von ihrer Ladung nur nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel auftrennen zu können.
In der vorliegenden Arbeit wurde das SDS-PAGE-System PROTEAN der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Für das Trenn- und das Sammelgel wurden die folgenden Komponenten gemischt:

	12,5% Trenngel
Acrylamid-Biscrylamid	4,17 ml
4x Tris/SDS, pH8,8	2,5 ml
H_2O	3,33 ml
APS	33 µl
TEMED	7 µl

	4% Sammelgel
Acrylamid-Biscrylamid	3,33 ml
4x Tris/SDS, pH6,8	2,5 ml
H_2O	4,16 ml
APS	33 µl
TEMED	7 µl

Die Proteinproben wurden mit Lysepuffer auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt, mit 0,4 Volumeneinheiten 4xLämmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 70°C erhitzt und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1-x-PAGE-Laufpuffer bei 0,05 A.

2.2.15 Western Blot

Ziel ist es, die zuvor im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für weitere Methoden zugänglich zu machen. Dazu wird senkrecht zum Polyacrylamid-Gel ein elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden und aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Oberfläche der Membran haften. Das durch die elektrophoretische Auftrennung entstandene Muster bleibt dabei erhalten, so dass die anhand der Größe aufgetrennten Proteinbanden auf der Membran nun immunologisch identifiziert werden können.
Im Rahmen der Arbeit wurde das *Tank-Blot-System* der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Dazu wurden vom Plus- zum Minus-Pol ein Schwamm, zwei Whatman-GB003-Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel), die Nitrocellulose Membran (Protran® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman®, Dassel), das PAGE-Gel, zwei weitere Filterpapiere und ein weiterer Schwamm in eine Kassette eingesetzt (Sandwich-Modell). Zuvor wurden die Schwämme, die Filterpapiere und die Membran in Transferpuffer getränkt, um Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden. Die Kassette wurde dann in einen mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt, und es wurden die SDS-Proteinkomplexe aus dem Gel auf die Membran in Richtung der Anode bei 0,5A für zwei Stunden übertragen. Im Anschluss daran wurde die Membran für 60 Sekunden mit Ponceau-Rot zur Überprüfung des Transfers gefärbt. Darüber hinaus wurden die Proteine durch die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fixiert. Danach wurde die Membran in 1 x TBS-Tween (TBST) mit 5% Magermilchpulver über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen in der folgenden Immundetektion zu reduzieren.

2.2.16 Immundetektion von membrangebundenen Proteinen

Die Immundetektion basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran in 1 x TBS-Tween (TBST) mit 0.5% Magermilchpulver und mit einem Primärantikörper bei RT inkubiert, so dass dieser spezifisch an die aufgetrennten Proteine binden konnte (siehe Tbl. 2.2.2 Seite 53). Danach wurde die Membran 3x5 Minuten in 1 x TBST gewaschen. Ein Sekundärantikörper, der an der Fc-Region des Primärantikörpers bindet und mit Peroxidase konjugiert war, wurde nun in 1 x TBS-Tween (TBST) mit 0.5% Magermilchpulver auf die Membran gegeben und bei RT inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde 3 mal über 5 min in 1 x TBS-Tween gewaschen und

anschließend in einer 1:1 Mischung von Luminol/Enhancer-Lösung und stabiler Peroxid-Lösung für 5min bei RT inkubiert. Dabei katalysierte die Peroxidase-Aktivität des Sekundärantikörpers die Oxydation des auf die Membran aufgetragenen Luminols, wodurch eine Chemilumineszenz erzeugt wurde. Zuletzt wurde die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt und zusammen mit einem Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm, Düsseldorf) in eine Röntgenkassette eingelegt. Der Film wurde nach einer Minute entwickelt. Entsprechend der Intensität der Banden konnte die Belichtungszeit variiert werden.

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubation
anti-Flag	1:10000	2 h, RT
anti-GAPDH	1:50000	1 h, RT

Tab. 2.2. 2 Verwendete Antikörper zur Immundetektion

2.2.17 *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* und *Dual-Luciferase Reporter Assay System*

Das *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* (Promega, Mannheim) dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in intakten Zellen. Die möglichen Interaktionen werden durch Transkription von Plasmid DNS zur Expression gebracht. Dabei werden die potentiellen Interaktoren als Fusionsproteine exprimiert. Diese beinhalten eine DNS-bindende Domäne, die an eine unvollständige Promotor-Region vor einem Promotor-Gen binden kann, und eine Transkription aktivierende Domäne, die das Zusammentreffen von RNA-Polymerase II Komplexen mit der TATA Box fördern und die Transkription verstärken kann (siehe Abb. 2.2.2 Seite: 54). Beide Domänen sind normalerweise Teile eines einzigen Proteins und werden gleichermaßen zur Aktivierung eines Gens benötigt. Im Falle des *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* werden GAL4 als DNS bindende Domäne und VP 16 als Transkription aktivierende Domäne primär getrennt voneinander verwendet (Sadowski et al., 1988). Dazu wird eine DNS-Sequenz der auf Interaktion zu untersuchenden Proteine in den pBIND-Vektor, der eine GAL4 Sequenz enthält, und die andere in den pACT-Vektor, der die VP 16 Sequenz enthält, eingefügt (siehe Abb. 2.2.5 Seite: 62). Bei einer Transfektion dieser Vektoren entstehen dann Fusionsproteine, die entsprechend dem Maß ihrer Interaktion zu einer Rekonstitution des Transkriptionsaktivators führen, der damit eine gesteigerte Transkription des Gens bewirkt, das sich hinter einer GAL4-Bindungsstelle befindet. Im Falle des *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* kommt es zu einer Anlagerung an eine von fünf GAL4-Bindungsstellen, die sich auf einem dritten transient transfizierten

Vektor, dem pG5luc Vektor, befinden, wodurch eine Steigerung der Expression des 3'-wärts gelegenen Firefly - Luciferase - Reporter - Gens erzielt wird (Siehe Abb. 2.2.2 Seite: 54 und Abb. 2.2.3 Seite: 55).

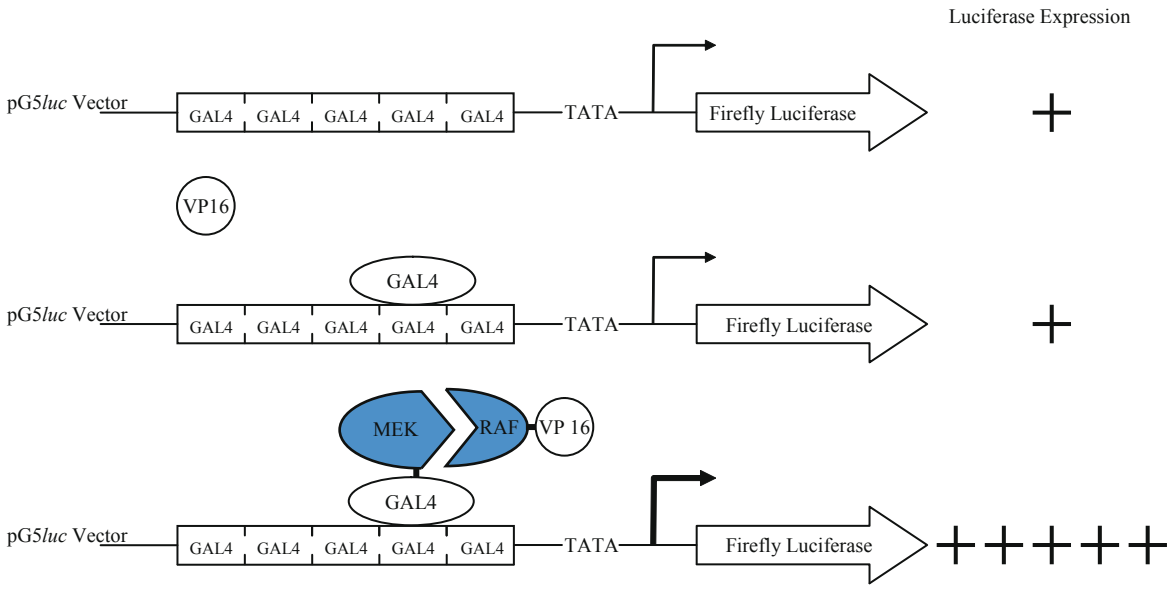


Abb. 2.2. 2 Schematische Darstellung der Fireflyexpression.
Entsprechend dem Maß der Wiederherstellung/Rekonstitution des Transkriptionsaktivators VP16/GAL4 kommt es zur Expression des Firefly-Gens (In Anlehnung an *CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System Technical Manual*, TM049, Promega)

Auf dem pBIND-*MEK*-Vektor findet sich zudem das Renilla-Luciferase-Gen, dessen Expression unabhängig von der Interaktion der Fusionsproteine über den SV40 Promotor stimuliert wird. Luciferasen sind strukturell unterschiedliche Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen reagieren (Oxidation). Unterschieden werden unter anderem Firefly-Luciferasen (aus dem Leuchtkäfer), bei denen Luciferol, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagieren und Renilla-Luciferasen, die nur Luciferol und Sauerstoff (kein ATP) zur Reaktion benötigen. Durch die Unterschiede in der Reaktionsweise ist es möglich, die Biolumineszenz von Firefly und Renilla getrennt voneinander in derselben Probe zu betrachten. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Varianz der Messdaten, die unter anderem auf Unterschieden in der Transfektionseffizienz, der Überlebensfähigkeit der Zellen und der Zell-Lyse-Effizienz beruhen, zu minimieren. Dazu wird die durch die Renilla-Luciferase produzierte Biolumineszenz gemessen und zur Normalisierung des in derselben Probe bestimmten Firefly-Luciferase Signals verwendet.

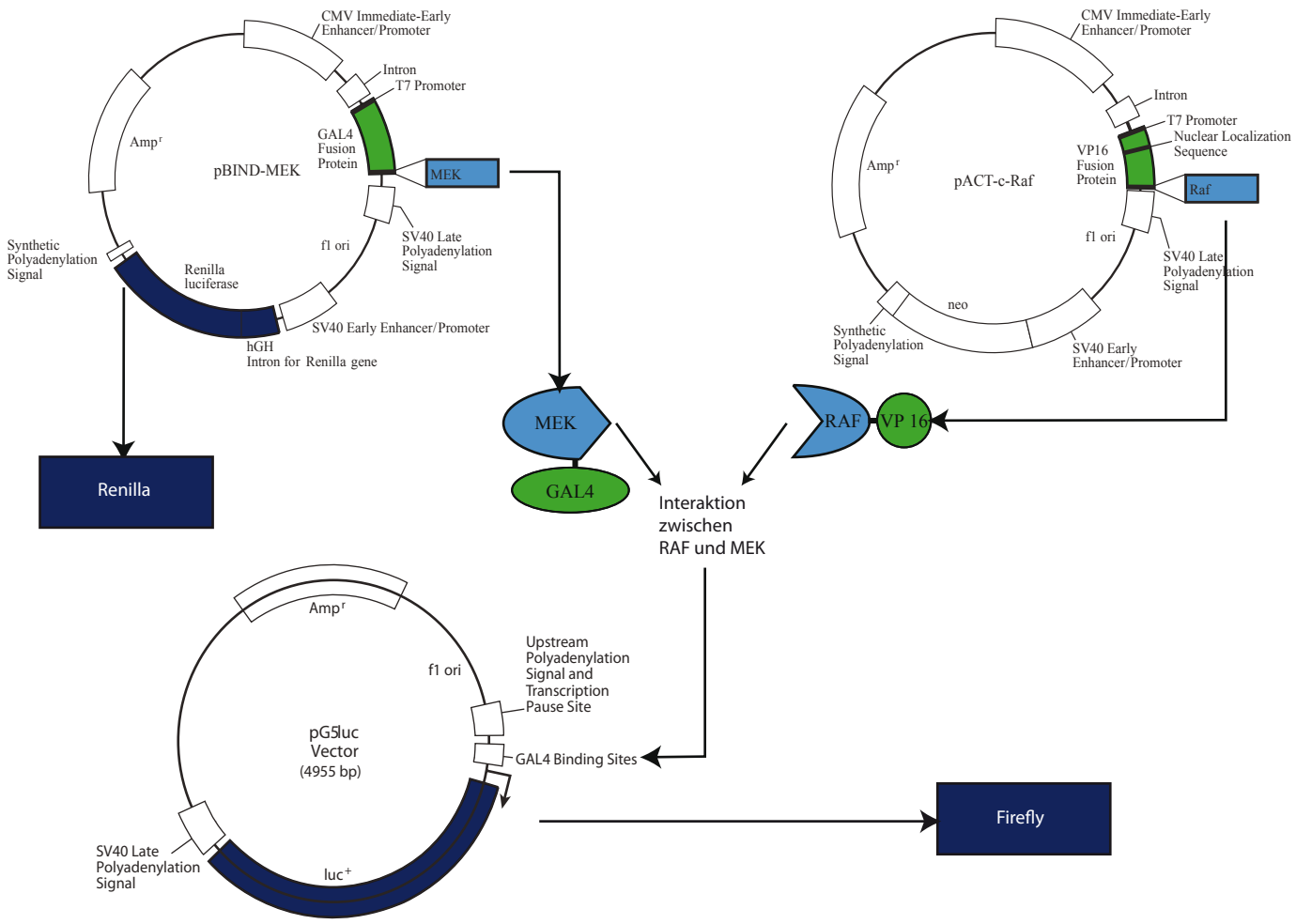


Abb. 2.2. 3 Schematische Darstellung der Luciferase-Expression des *Dual-Luciferase Reporter Assay System*
Es werden zwei Luciferasen exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Fusionsproteine, wird durch die Rekonstitution des Transkriptionsaktivators auf einem dritten transient transfizierten Vektor (pG5luc Vektor) das Firefly-Luciferae-Gen exprimiert. Ein SV40-Promotor kontrolliert die Expression des Renilla-Luciferase- Gens. (Die dargestellten Vektoren stammen aus: *™ Mammalian Two-Hybrid System Technical Manual*, TM049, Promega)

2.2.18 Transfektion von COS-7-Zellen

Für die Transfektion wurden 24-Well-Platten (NUNC, Wiesbaden) mit einer Fläche von 0,5 cm^2 verwendet. Auf den einzelnen Wells wurden die Zellen zusammen mit 500µl DMEM aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde darauf geachtet das die Zellkonfluenz im Bereich von 60-80% lag. Die Transfektionsansätze wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Cups hergestellt. Neben den pBIND-*MEK*- und pACT-*RAF*-Konstrukten kamen auch noch der pG5LUC Vektor als Reporter, der pDC515-Vektor als Ausgleichsvektor und der pDC516-Vektor als Leervektor zum Einsatz. Zunächst wurde nach Herstellerangaben ein Master-Mix erstellt, um Schwankungen im Firefly-Signal zu verringern. Danach wurde der Mastermix auf die Eppendorf-Cups verteilt und die restlichen Vektoren entsprechend den unten folgenden Schemata hinzugefügt (siehe Abb. 2.2.4 Seite: 56). Insgesamt wurden für jeden Ansatz 1,2µl des Transfektionsreagenz Fugene 6 (Roche, Mannheim) und 400ng DNS bei einem Komplettvolumen von 20µl verwendet. Nach 2h Inkubation bei RT

wurden die Transfektionsansätze als Triplikat auf die 24-Well-Platte aufgetragen. Mindestens 3 Wells einer Platte blieben unbehandelt und dienten als Kontrollproben zur Bestimmung der Hintergrund-Luminescence. Die Zellen wurden für 24h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend mit PLB entsprechend den Herstellerangaben des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Mannheim) lysiert (siehe Methoden 2.2.12 Seite: 50). Das Lysat wurde in Eppendorf-Cups überführt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

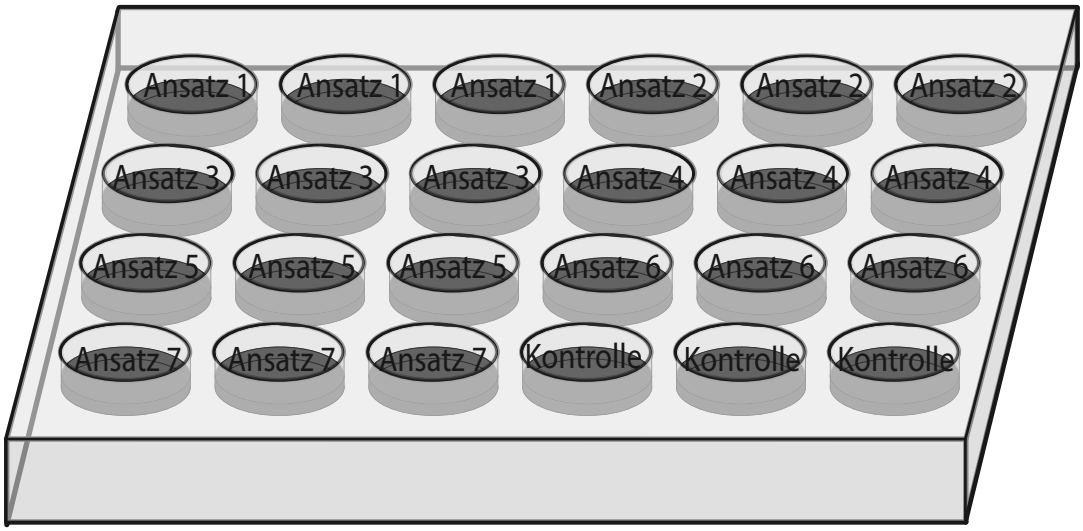


Abb. 2.2. 4 Schematische Darstellung eines 24-Wells und der Auftragung der Transfektionsansätze

Im Folgenden ist die Durchführung der Transfektionen beschrieben.

2.2.18.1 Erstellung der Transfektionsansätze zur Bestimmung des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion von B-*RAF* und *MEK* im Vergleich zu der Interaktion von c-*RAF*^{BXB} und *MEK*

Für die Vektoren pG5-LUC, pBIND-*MEK* und pDC515 wurde zusammen mit Fugene-6 ein Mastermix erstellt und dieser auf die benötigte Anzahl an 1,5-ml-Reaktionsgefäßen verteilt. Die einzelnen Transfektionsansätze dieser Versuchsreihe unterschieden sich durch die Zugabe von pACT-B-*RAF* oder pACT-BXB und pDC-516-leer oder pDC-516-*IMP*. Um die basale Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* messen und dabei einen Einfluss unterschiedlicher Vektor-Konzentrationen auszuschließen zu können, wurde der Leervektor pDC-516 (pDC-516-leer) zu den entsprechenden Transfektionsansätzen hinzugefügt. Die Zusammensetzung der einzelnen Transfektionsansätze ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
LUC	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
pACT-B-*RAF*	50 ng	50 ng	-	-
pACT-BXB	-	-	50 ng	50 ng
pBIND-*MEK*	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
pDC515	125 ng	125 ng	125 ng	125 ng
pDC516	125 ng	-	125 ng	-
pDC516-*IMP*	-	125 ng	-	125 ng

Tab. 2.2. 3 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Bestimmung des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion von B-RAF und MEK im Vergleich zu der Interaktion von c-RAF^{BXB} und MEK

2.2.18.2 Erstellung der Transfektionsansätze zur Messung der Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP*

Für die Vektoren pG5-LUC, pACT-B-*RAF*, pBIND-*MEK* und pDC515 wurde zusammen mit Fugene-6 ein Mastermix erstellt und dieser auf die benötigte Anzahl an 1,5-ml-Reaktionsgefäßen verteilt. Die einzelnen Transfektionsansätze dieser Versuchsreihe unterschieden sich lediglich durch die Zugabe eines weiteren Vektors: pDC-516-leer, pDC516-*IMP* oder pDC-516-*IMP*^{C264A}. Um die basale Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* messen und dabei einen Einfluss unterschiedlicher Vektor-Konzentrationen auszuschließen zu können, wurde der Vektor pDC-516 als Leervektor (pDC-516-leer) zu dem entsprechenden Transfektionsansätzen hinzugefügt. Der Einfluss von *IMP* bzw. der nicht ubiquitinylierbaren Mutante auf die *RAF*/*MEK*-Interaktion wurde durch die transiente Transfektion des pDC516-*IMP*-Vektors bzw. des pDC516-*IMP*^{C264A} -Vektors in den entsprechenden Transfektionsansätzen ermittelt. Die Zusammensetzung der einzelnen Transfektionsansätze ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
pG5-LUC	50 ng	50 ng	50 ng
pACT-B-*RAF*	50 ng	50 ng	50 ng
pBIND-*MEK*	50 ng	50 ng	50 ng
pDC515	125 ng	125 ng	125 ng
pDC516-leer	125 ng		
pDC516-*IMP*		125 ng	
pDC516-*IMP*^{C264A}			125 ng

Tab. 2.2. 4 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Messung der Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP*

Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Luciferase Aktivität der Proben wurde mit Hilfe des multimode readers (MMR) Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) bestimmt.

2.2.18.3 Erstellung der Transfektionsansätze zur Messung der Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP* unter dem konstantem Einfluss von *RAS*:

Mit Ausnahme der Zugabe von *RAS* zum Master-Mix entsprach die Erstellung der Transfektionsansätze der unter 2.2.18.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die Zusammensetzung der einzelnen Transfektionsansätze ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Vektor	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
pG5-LUC	50 ng	50 ng	50 ng
pACT-B-*RAF*	50 ng	50 ng	50 ng
pBIND-*MEK*	50 ng	50 ng	50 ng
pDC515	25 ng	25 ng	25 ng
pSG5-*RAS*^{V12}	50 ng	50 ng	50 ng
pDC516	125 ng		
pDC516-*IMP*		125 ng	
pDC516-*IMP*^{C264A}			125 ng

Tab. 2.2. 5 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Messung der Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP* unter dem konstantem Einfluss von *RAS*

Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Luciferase Aktivität der Proben mit Hilfe des MMR Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) bestimmt.

2.2.18.4 Erstellung der Transfektionsansätze zur Untersuchung der erstellten Phosphorylierungsmutanten:

Für die Vektoren pG5-LUC, pACT-B-*RAF*, pBIND-*MEK* und pDC-515-leer wurde zusammen mit Fugene-6 ein Mastermix erstellt und dieser auf die benötigte Anzahl an 1,5-ml-Reaktionsgefäßen verteilt. Die einzelnen Transfektionsansätze dieser Versuchsreihe unterschieden sich lediglich durch die Zugabe eines weiteren Vektors, der entweder die DNS-Sequenz von *IMP* bzw. die DNS-Sequenz der erstellten Mutanten enthielt oder als Leervektor neben der DNS des Vektors keine weitere DNS enthielt. Um die basale Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* zu messen und dabei einen Einfluss unterschiedlicher Vektor-Konzentrationen ausschließen zu können, wurde der Leervektor pDC-516 (pDC-516-leer) zu dem entsprechenden Transfektionsansätzen hinzugefügt. Die Zusammensetzung der einzelnen Transfektionsansätze ist in den folgenden Tabellen dargestellt:

	Ansatz 1	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**
pG5 – Luc	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
pACT - B-*RAF*	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
pBIND - *MEK*	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
pDC-515-leer	125ng	125ng	125ng	125ng	125ng	125ng	125ng
pDC-516-leer	125ng						
pDC516 - *IMP*		125ng					
pDC-516-*IMP*^{T308A}			125ng				
pDC-516-*IMP*^{S380A}				125ng			
pDC-516-*IMP*^{T395A}					125ng		
pDC-516-*IMP*^{Y408A}						125ng	
pDC-516-*IMP*^{S574A}							125ng

	Ansatz 1	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**	**Ansatz**
pG5 – Luc	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
pACT - B-*RAF*	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
pBIND - *MEK*	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
pDC-515-leer	125ng	125ng	125ng	125ng	125ng	125ng	125ng
pDC-516-leer	125ng						
pDC-516-*IMP*		125ng					
pDC-516-*IMP*^{T99A}			125ng				
pDC-516-*IMP*^{S117A}				125ng			
pDC-516-*IMP*^{Y218A}					125ng		
pDC-516-*IMP*^{S252A}						125ng	
pDC-516-*IMP*^{C264A}							125ng

Tab. 2.2.6 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze zur Untersuchung der erstellten Phosphorylierungsmutanten

2.2.18.5 Erstellung der Transfektionsansätze für den Western Blot

Für die Transfektion wurden 10er Platten (NUNC) mit einer Fläche von 56,75 cm^2 verwendet. Auf die einzelnen Platten wurden 1,27 ml der in DMEM gelösten Zellen zusammen mit 15,5 ml DMEM aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde darauf geachtet das die Zellkonfluenz im Bereich von 60-80% lag. Die Transfektionsansätze wurden in 2-ml-Eppendorf-Cups nach dem folgenden Schema hergestellt:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5
pDC-516-leer	6213 ng				
pDC-516-*IMP*		6213 ng			
pDC-516-*IMP*^{C264A}			6213 ng		
pDC-516-*IMP*^{T308A}				6213 ng	
pDC-516-*IMP*^{S574A}					6213 ng

Tab. 2.2.7 Übersicht über die verwendeten DNS-Konzentrationen der Transfektionsansätze für den Western Blot

Für jeden Ansatz wurden 18,6µl Fugene 6 verwendet. Nach 2h Inkubation bei RT wurden die Transfektionsansätze auf die 10er- Platten aufgetragen. Die Zellen wurden für 24h Bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate für den Western Blot erstellt. In den Lysaten konnten *IMP* bzw. die verwendeten Mutanten über eine Flag-Tag-Sequenz nachgewiesen werden, die im Vorfeld der Arbeit durch Frau Dr. Cornelia Grebe an das den Carboxyterminus kodierende Ende der cDNS fusioniert wurde.

2.2.19 Erstellung der Fusionskonstrukte

Als Voraussetzung für die Durchführung des *Mammalian Two-Hybrid System* wurden im Vorfeld durch unsere Arbeitsgruppe die DNS-Sequenzen von *MEK*, c-*RAF*, und B-*RAF* in die Vektoren des Assay-Systems kloniert. Dabei wurde die cDNS von *MEK* als Fusion mit der GAL4-DNS-Bindungsdomäne in den pBIND-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert. Darüber hinaus wurden die cDNS von c-*RAF* und B-*RAF* jeweils als Fusion mit der VP16 Transaktivierungsdomäne in den pACT-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert. Bei beiden Vektoren steht die Transkription des Fusionskonstruktes unter der Kontrolle des frühen CMV-Promotors und das Ende der Translation wird durch eine späte SV-40 Polyadenylierung in Gang gesetzt. Die Klonierungen wurden zunächst durch Reaktionen mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau) gespalten und mit nachfolgender Gel-Elektrophorese überprüft. Bei einem den Erwartungen entsprechenden DNS-Bandenmuster wurden alle

erstellten Konstrukte mit vektorspezifischen oder genspezifischen Primern vollständig durchsequenziert, um Mutationen oder Verschiebungen im Leseraster des Fusionskonstruktes ausschließen zu können. Im Rahmen der Arbeit wurde darüber hinaus c-*RAF*^{BXB} in den pACT Vektor eingefügt. Nachfolgend werden die Klonierungsstrategien für die Herstellung der einzelnen Konstrukte beschrieben:

pBIND-*MEK*: Das 1,7kbp große Insert von *MEK* wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI aus dem pM2-Vektor herausgeschnitten und in den BamHI und KpnI geschnittenen pBIND-Vektor einkloniert.

pACT-B-*RAF*: Das 1,9 kbp große Insert von B-*RAF* wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI im Vorfeld der Arbeit in den pACT Vektor einkloniert.

pACT-BXB: Das 1,9kbp große Insert von c-*RAF*^{BXB} wurde uns großzügiger Weise von der Universität Würzburg in Form des pcDNA3-HA-BXBwt Vektors zur Verfügung gestellt. Die c-*RAF*^{BXB} Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen MluI und XbaI aus dem Vektor herausgeschnitten und in den MluI und XbaI geschnittenen pACT-Vektor einkloniert. Zwischen der DNS-Sequenz von VP16 und c-*RAF*^{BXB} lag dabei ein 438bp langer Rest des T7-Promotors.

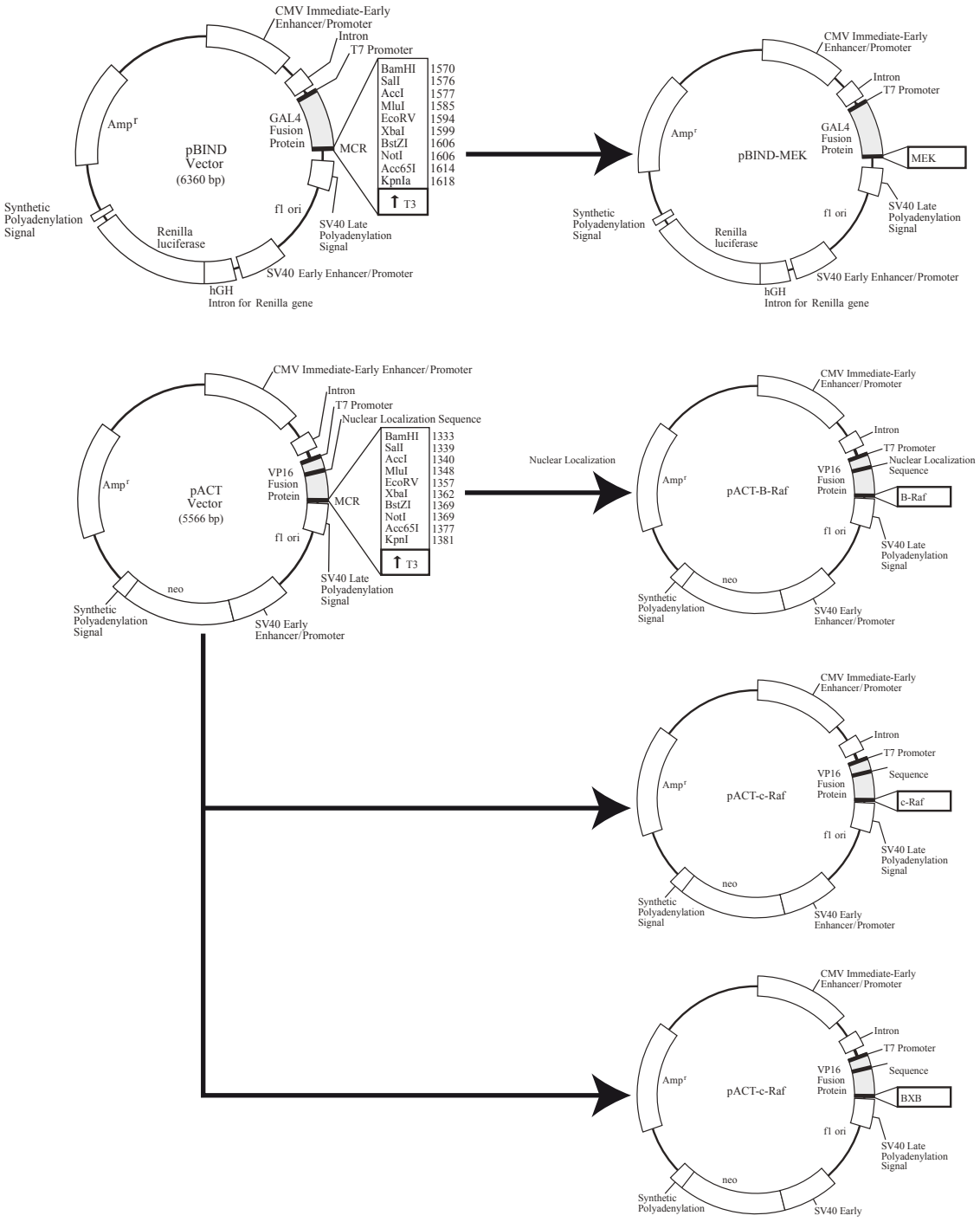


Abb. 2.2. 5 Übersicht über die für das *Dual-Luciferase Reporter Assay System* notwendigen Klonierungen
In den pBIND-Vektor wurde die cDNS von *MEK* und in den pACT Vektor jeweils einzeln die cDNSs von B-*RAF*, c-*RAF* und c-*RAF*^{BXB} eingefügt, unter Zuhilfenahme einer in beiden Vektoren enthaltenen MCR (*multiple cloning region*). (Die dargestellten Vektoren stammen aus: *™ Mammalian Two-Hybrid System Technical Manual*, TM049, Promega)

2.2.20 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Luciferase-Aktivität wurde mit Hilfe des Mikroplatten Luminometers (MMR, engl.: *multimode microplate reader*) Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbach) bestimmt. Dazu wurde ein kommerzieller Assay (Promega, Mannheim) verwendet.

Dabei wird zunächst die Lumineszenz des Substrates anhand der Firefly Luciferase gemessen. Nach Beendigung dieser Reaktion mit einer Stoplösung erfolgt die Bestimmung der Lumineszenz des Substrates durch Renilla-Luciferase.

Zunächst wurden 20 µl jeder Probe auf eine 96-Well-Platte überführt. Die Messung erfolgte daraufhin für jedes Well im Luminometer vollautomatisch nach dem folgenden Programm:

1. Zugabe von 120µl Luciferase Assay Reagent II (LARII™) (Promega, Mannheim)
2. Pauseintervall von 1,5s
3. Messung des Firefly-Signals über 10s
4. Zugabe von 120µl von mit Substrat versetztem Stop&Glow™ (Promega, Mannheim)
5. Pauseintervall
6. Messung des Renilla-Signals über 10s .

Bei jeder Messung wurden mindestens 3 nicht transfizierte Lysate desselben Versuchs zur Bestimmung der Hintergrund-Lumineszenz ohne die Anwesenheit von Luciferasen (Rauschen) erfasst. Das im Durchschnitt ermittelte Firefly- und Renilla-Signal dieser Kontrollproben wurde von den Messwerten der zu untersuchenden Proben abgezogen. Anschließend wurde aus den Messwerten die auf Renilla-Lumineszenz normalisierte Luciferase-Aktivität berechnet. Die Angabe erfolgt in relativen Lichteinheiten (RLU, engl.: *relative light unit*).

$$\mathbf{RLU} = \frac{\text{Firefly Lumineszenz}}{\text{Renilla Lumineszenz}}$$

3. Ergebnisse

3.1 Die Mutation potentieller Phosphorylierungsstellen der Ubiquitin-Ligase *IMP*

Im Vorfeld der Arbeit konnten durch Frau Dr. Cornelia Grebe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Henning Urlaub (Max-Plank-Isititut für biophysikalische Chemie, Göttingen) mittels 2D Western Blot und massenspektrometrischer Analyse posttranslationale Modifikationen der Ubiquitin-Ligase *IMP* nachgewiesen werden (siehe Tbl. 3.1.1 Seite 64).

Identifiziertes Polypeptid	Aminosäure*
K.RS**S**EASP**T**AQR.S	S94; T99
K.ECINAAPD**S**P**S**K.Q	S117; S119
R.AQADADSF**Y**M**T**CNGR.Q	Y218; T220
K.SEDGA**S**LPVMDLTELPK.C	S252
R.YCQ**T**PEPVEENK.C	T308
R.LVA**S**KTDGK.I	S380
K.IVQYECEGD**T**CQEEK.I	T395
K.IDALQLE**YS**YLLTSQLESQR.I	Y408; S409
R.DVMF**Y**LETQQK.I	Y539
R.QEIQEGQINIAMASASSPA**SS**GG**S**GKLP**S**RK.G	S574; S575; S578;S583

*anhand des Sequenzkontextes als die mit der größten Wahrscheinlichkeit phosphorylierte Aminosäure durch das Programm „Maskot“ vorgeschlagen.

Tab. 3.1. 1 Übersicht über die identifizierten phosphorylierbaren Peptide der E3-Ubiquitin-Ligase *IMP* (Grebe, 2008)

In der vorliegenden Arbeit sollten die potentiellen Phosphorylierungsstellen in *IMP* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Ubiquitinierungsstelle an Position C264 auf die Aktivität von *IMP* untersucht werden.

3.1.1 Die Erstellung von Mutanten der Ubiquitin-Ligase *IMP*

Die Übertragung eines Phosphatrestes durch Kinasen erfolgt auf die Hydroxygruppen eines Proteins und damit vor allem auf die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin, weil nur in dem spezifischen Rest dieser Aminosäuren eine Hydroxygruppe enthalten ist. Daher war es möglich die genaue Lokalisation der Phosphorylierungsstelle innerhalb der identifizierten Polypeptide einzugrenzen. Um eine weitere Eingrenzung im Fall mehrerer möglicher Phosphorylierungsstellen zu erreichen, beschränkten wir uns auf konservierte Aminosäuren (siehe Abb. 3.1.1 Seite: 66). Anhand dieser Kriterien wurden die folgenden potentiell phosphorylierten Aminosäuren identifiziert (siehe Abb. 3.1.2 Seite: 67): T99, S117, S119, Y218, S252, T308, S380, T395, Y408, S574.
Um die Bedeutung der möglichen Phosphorylierung zu untersuchen, erzeugten wir mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese (siehe Methoden 2.2.1 Seite: 43) nicht-phosphorylierbare Mutanten. Damit an den potentiellen Phosphorylierungsstellen die Bindung einer Phosphatgruppe ausgeschlossen werden konnte, musste die DNS-Sequenz in der Weise verändert werden, dass das entsprechende Basentriplet für eine Aminosäure codiert, die in ihrem spezifischen Rest keine OH-Gruppe enthält. Neben den oben beschriebenen Phosphorylierungsstellen wurde auch eine mögliche Ubiquitinierungsstelle an Position C264 (Matheny et al., 2004) mutiert. In der Aminosäuresequenz wurden dazu Cystein, Serin, Threonin bzw. Tyrosin durch Alanin ersetzt. Es wurde Alanin gewählt, damit durch die Mutagenese mit Ausnahme der Inaktivierung der Phosphorylierungsstellen bzw. der Ubiquitinierungsstelle möglichst wenig weitere Veränderungen in Struktur und Eigenschaft des Proteins auftraten. Grundlage aller Konstrukte war der Vektor pDC-516, in den die humane DNS Sequenz von *IMP* eingefügt worden war.

```
HUMAN                 MSVSLV..VIRLELAEHSPVPAGFG.......FSAAAGEMSDEEIKKTTLASAVACLEGKSPGEKVAIIHQ......HLGRREMTDVIIETMKSNPDELKTTVEERKSSEAS 97
MOUSE                 MSVSLV..VIRLELAGHSPVPTDFG.......FSAAAGEMSDEEIKKKTLASAVACLEGKSAGEKAAIIHQ......HLGRREMTDVIIETMKARADEVRDTVEEKKPSAAP 97
XENOPUS               ..........................................................................................MDAALA 6
ZEBRAFISH             MSVSLV..VIRLELADQSDSPQGFH.......YCAVS.EMSEDEMREKALGSAKATLGGKTDLERGAILHQ......HLGSRVMSDMVIETFQP.............S.TG 81
ANOPHELES             .....AFRLIASP...................SEAAGAVSNEHPNNPRLQREM...RGQRKPKKITIESYRN....RLLD...GGP................APSDEYRG 60
DROSOPHILA            MLENISLCVIKIETDLDPS.............ADSEGAVSAEHPTNPRVLKERERDRGLRQSRDITIETYTN....QRWKRELSEPRQQEMNW.........VAAVQHVNS 85
SCHIZOSACHCHAROMYCES ...............................MYYYLEIECESPVKDIFTCNKRR.....................................................AS 25
CAENORHABDITIS        MSSLYVPLVLRLEVRDRTKIVQSFIDDSKAGSESPLAGERTRQRLVKKGNTPPKKELKGREEDPPIGVMSSEPSHNYHKGRRTYSEVVIESLDG.................E 95

                      T99A        S117A
HUMAN                 PTAQRSKDHSKECINAAPDSPSK.QLPDQISFFSGNPSVEIVHGIMHLYKTNKMTSLKEDVRRSAMLCILTVPAAMTSHDLMKFVAP.FNDVIEQMKIIRDSTPNQYMVLIK 207
MOUSE                 VSAQRSREQ.SESVNTAPESPSK.QLPDQISFFSGNPSVEIVHGIMHLYKTNKMTSLKEDVRRSAMLCVLTVPATMTSHDLMKFVAP.FNDVIEQMKIIRDSTPNQYMVLIK 206
XENOPUS               VTNKTSLEEQGTCAMAVPDSPSK.QLPEQITFFSGNPSVEIVHGLMHLYKTNKMTLLKEDVRRSPMLCILTVPAAMTSHDLMKFVAS.FNEVIDHMKIIRDSTPNQYMVLIK 116
ZEBRAFISH             AEEGKEVDVSQTDVNMTPDSPSK.QLPDQISFFSGNPSVEIVHGIMHLYKTNKMTSLTEDVRRSAMLCILTVPTTMTSHDLMKFVAP.YNDVMEHMKIIRDSTPNQYMVLVK 191
ANOPHELES             ILPKSSREQTP...MDEVPPAATEILGEINFFSGNPFVEVTKGILHLFKRNE.RADISEGGVSKTLCLIAVPSSLNCHDILNFIAP.CQKEIQHVRILRDGSPNQFMVLLE 167
DROSOPHILA            PSAGSSREITPRSGDDGQAGASASNFPQEIGYFSGNPIVEVTKGLIHLYKKNE.RKAIKEA.PSNQLCLLAVPATLNCHDLLNFIAP.CHAEIKHIQIVRDGSPNQFMVLLE 194
SCHIZOSACHCHAROMYCES KVVGNSFGGDHFNFRLGEIKLLSMDFPS..SKVPEVEETSLGHGVVHLYRVFP.SESHEFDAPGLILAILAIPLYMSPSDVLGFLGEKHCKSIQHIRLLKTKDPNRIMALLK 134
CAENORHABDITIS        KLVDSSSSVAGTSEKSGGRSVSE.GPPDQVAYYSGNPLTEKTEGIMHFYKYNDEKLTKVAQCR..MLCMYAVPAQVEVREIISFMCI.SLPMIVSIKVVRDPAPNQYMLIIK 203

                        Y218A                                                S252A   C264A
HUMAN                 FRAQADADSFYMTCNGRQFNSIEDD.VCQLVYVERAEVLK................SEDGASLPVMDLTELPKCTVCLERMDESVNGILTTLCNHSFHSQCLQRWDDTTCP 301
MOUSE                 FSAQADADSFYMACNGRQFNSIEDD.VCQLVYVERAEVLK................SEDGASLPVMDLTELPKCTVCLERMDESVNGILTTLCNHSFHSQCLQRWDDTTCP 300
XENOPUS               FSSQADADSFYMANNGRQFNSIEED.VCQLVYVERAEVLK................SGDGASLPVMDLTELPKCTVCLERMDESVNGILTTLCNHSFHSQCLQRWEDTTCP 210
ZEBRAFISH             FRSQADADSFYTTRNGRQFNSIEDA.VCQLVYVERAEVIK................SEEGASLPVMDLTELPKCTVCLERMDESVNGVLTTLCNHSFHSQCLQRWEDASCP 285
ANOPHELES             FRCVEGAIEFFKTFNGAPYNSLEPDTLCHAVWVSSVEWGL................DDCCVTP..QGHTELPSCPVCLERMDESVDGVLTILCNHVFHAGCLNKWGDSTCP 260
DROSOPHILA            FRSNESALEFYKSYNGSTYNSLEPDSLCHAVWVSEVER...................SEHGAPP..MGHTELPTCPVCLERMDESVDGVLTILCNHAFHASCLMKWGDSTCP 285
SCHIZOSACHCHAROMYCES FKDQASVIRFYTEFNGKAFSQIDPE.TCHVLHIDKVNIKYPMESSDSSSTEQQLVGPSSKPFASTTPALIELPTCVVCLERMDSSITGLITIVCQHTFHCPCLQKWGNSSCP 245
CAENORHABDITIS        FKEHNDAVTFYEEFNNCPFNDLESY.CCTLFFVDRIECTT................SNDLFSSDDTSLTELPTCAVCLERMDDSV...LAILCNHSFHARCLEQWADNTCP 294

                        T308A                                                                                S380A     T395A
HUMAN                 VCRYCQTPEPVE.ENKCFECGVQENLWICLICGHIGCGRYVSRHAYKHFEETQHTYAMQLTNHRVWDYAGDNYVHRLVASKTDGKIVQYECEGDTCQEEK........IDAL 404
MOUSE                 VCRYCQTPEPVE.ENKCFECGVQENLWICLICGHIGCGRYVSRHAYKHFEETQHTYAMQLTNHRVWDYAGDNYVHRLVASKTDGKIVQYECEGDTCQEEK........IDAL 403
XENOPUS               VCRYCQTPEPVE.ENKCFECGVQENLWICLICGHIGCGRYVSRHAYKHFEETQHTYAMQLTNHRVWDYAGDNYVHRLVASKTDGKIVQYECEGDTCQDEK........IDSL 313
ZEBRAFISH             VCRYCQTPEPVE.ENKCFECGVQENLWICLICGHIGCGRYVSRHAYKHFEETQHTYAMQLTNHRVWDYAGDNYVHRLVASKTDGKMVQYECEGDTCQDEK........IDAL 388
ANOPHELES             VCRCVQTPELSE.QSVCMECEGTEALWICLICGHIGCGRYQGGHAASHYRTTNHTYALQLGTNRVWDYAGDNFVHRLLQSKSDGKLVATQSPGGDDGEEK........IDSM 363
DROSOPHILA            VCRHVQTPGLVE.DSVCMECEGTDSLWICLICGHVGCGRYQGGHAAAHFRATNHTFAMQLGTSSVWDYAGDNFVHRLFQNKSDGKLVASQTEK.DEREEK........IDSM 387
SCHIZOSACHCHAROMYCES VCRYTQKVQSSEFQSKCTVCCYDKDLWICLICGNIGCGRYHDAHAKQHYVDTAHCYAMELETQRVWDYAGDNYVHRLLQSETDGKLVELSTDGKSSGWTGSSATESKLRDKM 357
CAENORHABDITIS        VCRYVQSPEVVA.EQRCNDCGMSNDLWICLICGNIGCGRYAEQHAQRHWELTSHTYSLKVGGERVWDYAGDNYVHRLIENGADGKLVEYQRESNASFDDKN.QKGGDKLEGI 404

                      Y408A
HUMAN                 QLEYSYLLTSQLESQRIYWEN.......KIVRIEKDTAEEINNMKTKFKETIEKCDNLEHKLNDLLKEKQSVERKCTQLNTKVAKLTNELKEEQEMNKCLRANQVLLQNKLK 509
MOUSE                 QLEYSYLLTSQLESQRIYWEN.......KIVRIEKDTAEEINNMKTKFKETIEKCDSLELRLSDLLKEKQSVERKCTQLNTRVAKLSTELQEEQELNKCLRANQLVLQNQLK 508
XENOPUS               QLEYSYLLTSQLESQRIYWEN.......KIVRLEKDTAEEINNMKAKFKETIDKCDSFEHRLNDLSKEKQAVERRCAQLNSKVAKLSTELKEEQEMNKCLRANQTMLQGRLR 418
ZEBRAFISH             QLEYSYLLTSQLESQRIYWEN.......KIVHLEKDTAEEINNMKAKFKETIDKCDSLERKLNELAKDKQSIDKKCSQLNNKVAKLSQELREEQEMNRCLRANQSQLQAQLQ 493
ANOPHELES             QLEFTYLLTSQLDAQRDYYEE.......RLSRLESIICGERQKLQEDHEQAKQKTAQLEVKLHALTKEKNSLERKVSQLTSKLGTVLGELAEEKQFGKTLQANQVTWQTKFT 468
DROSOPHILA            QMEFTYLLTSQLDTQRKYYEE.......RMERLE....QEWQNHKATANDAKTEVSELQQLQQNMQKEKVNLERKLAQHTAKLKDVQKQLNEERELSKALQSNQSSWHGKYK 488
SCHIZOSACHCHAROMYCES GLEYTQILVSQLESQRLYYES.......HLSNMSQKLSRVNEELVLKTKIATASSN.ANTDLRSRVDISESKLKKRDDKLKRVSSQLEHLKHNYEEEKSMNENLLVRIQTLE 461
CAENORHABDITIS        KLEYTLLLTSQLEDQRKYFEGLRHDMEQTMSKMEKTAYAQVENLEHQLTERSTELKSLKGDLDDTVTARKVAEKRATQTNEKVNKLANELKDEREINQMLRKDQQVWKGQVE 516

                                                                                                S574A
HUMAN                 EEERVLKETCDQKDLQITEIQEQLRDVMFYLETQQKINHLPAE...TRQEIQEGQINIAMASASSPA..........SSGGSGKLPSRKGRSKRGK..........      592
MOUSE                 EEEKLLKETCAQKDLQITEIQEQLRDVMFYLETQQQISHLPAE...TRQEIQEGQINIAMASAPNPP..........SSGAGGKLQSRKGRSKRGK..........      591
XENOPUS               EEENTHKETSEQKDMQLLEMQEQLRDVMFYLETQQKINHMPAD...TRQEIQDGQINIASSSSPAP............S...GKLSSRKGRGKRGK..........      496
ZEBRAFISH             EEERRVQDTAANKDDQIAELQEQLRDVMFYLETQQQIDRMPAD...TRQEIQEGQINIASAPAAPQPG........PSAHGSGKMTGRKGRSKRGK..........      578
ANOPHELES             TLEKQCTEKEQ....EIVELKEQVRDLMFYMEAQNTIAGSELK.....SELVDGTVVLPADAVAAASSISASGAFAAGTSAGGAKAKRRQRRK............      552
DROSOPHILA            LLEQQYNEFKQTHDAEVTELKEQLRDIMFFLDNQQKLAN.........TEIAGGTVTGIAEKEPDPN...................TRRRNRRKK............      555
SCHIZOSACHCHAROMYCES KQNTTKSDQIVSMQFQINDLNEQLRDLMFTISASQEIQKMGQS.....EELQNGTIVLPNNSTVRSNS...............VKSKKKKKKPVVPSSSGSLGTD      547
CAENORHABDITIS        KLIESQKTARTEYEKKIEDLQSQVNDLLMHFETQNKLKEQLDAGKITQEEITESQVELDSSSSSSR................KLNRKKKK..............      590
```

Abb. 3.1. 1 Übersicht über die Konservierung der Ubiquitin-Ligase *IMP* anhand der Primärstruktur
An den rot markierten Stellen wurde die humane DNS Sequenz mittels zielgerichteter Mutagense verändert.

In der folgenden Abbildung sind die durchgeführten Veränderungen und deren Lokalisation in der Primärstruktur und der DNS Sequenz von *IMP* dargestellt.

```
1       ATGAGTGTGTCACTGGTTGTTATCCGATTGGAGCTCGCGGAACACTCGCCTGTCCCCGCC
1        M  S  V  S  L  V  V  I  R  L  E  L  A  E  H  S  P  V  P  A
61      GGCTTCGGCTTCAGCGCCGCGGCCGGGGAAATGTCTGATGAGGAGATAAAAAAGACGACA
21       G  F  G  F  S  A  A  A  G  E  M  S  D  E  E  I  K  K  T  T
121     CTAGCCTCAGCTGTAGCCTGTTTAGAAGGCAAGTCACCAGGAGAGAAAGTAGCGATTATC
41       L  A  S  A  V  A  C  L  E  G  K  S  P  G  E  K  V  A  I  I
181     CATCAGCATCTCGGCCGTCGAGAAATGACAGATGTGATCATTGAGACCATGAAGTCCAAC
61       H  Q  H  L  G  R  R  E  M  T  D  V  I  I  E  T  M  K  S  N
241     CCAGATGAACTAAAAACTACAGTGGAAGAAAGGAAGTCTTCAGAAGCCTCCCCCACTGCG
81       P  D  E  L  K  T  T  V  E  E  R  K  S  S  E  A  S  P  T  A
301     CAAAGAAGTAAAGATCACAGTAAGGAATGCATAAACGCTGCCCCAGATTCTCCGTCCAAA
101      Q  R  S  K  D  H  S  K  E  C  I  N  A  A  P  D  S  P  S  K
361     CAGCTTCCAGACCAGATTTCATTCTTCAGTGGAAATCCATCAGTTGAAATAGTTCATGGT
121      Q  L  P  D  Q  I  S  F  F  S  G  N  P  S  V  E  I  V  H  G
421     ATTATGCACCTATATAAGACAAATAAGATGACCTCCTTAAAAGAAGATGTGCGGCGCAGT
141      I  M  H  L  Y  K  T  N  K  M  T  S  L  K  E  D  V  R  R  S
481     GCCATGCTGTGTATTCTCACAGTCCCTGCTGCAATGACCAGTCATGACCTTATGAAGTTT
161      A  M  L  C  I  L  T  V  P  A  A  M  T  S  H  D  L  M  K  F
541     GTTGCCCCATTTAACGAAGTAATTGAACAAATGAAAATTATCAGAGACTCTACTCCCAAC
181      V  A  P  F  N  E  V  I  E  Q  M  K  I  I  R  D  S  T  P  N
601     CAATATATGGTGCTGATAAAGTTTCGTGCACAGGCTGATGCGGATAGTTTTTATATGACA
201      Q  Y  M  V  L  I  K  F  R  A  Q  A  D  A  D  S  F  Y  M  T
661     TGCAATGGCCGCCAGTTCAACTCAATAGAAGATGACGTTTGCCAGCTAGTGTATGTGGAA
221      C  N  G  R  Q  F  N  S  I  E  D  D  V  C  Q  L  V  Y  V  E
721     AGAGCTGAAGTGCTCAAATCTGAAGATGGCGCCAGCCTCCCAGTGATGGACCTGACTGAA
241      R  A  E  V  L  K  S  E  D  G  A  S  L  P  V  M  D  L  T  E
781     CTCCCCAAGTGCACGGTGTGTCTGGAGCGCATGGACGAGTCTGTGAATGGCATCCTCACA
261      L  P  K  C  T  V  C  L  E  R  M  D  E  S  V  N  G  I  L  T
841     ACGTTATGTAACCACAGCTTCCACAGCCAGTGTCTACAGCGCTGGGACGATACCACGTGT
281      T  L  C  N  H  S  F  H  S  Q  C  L  Q  R  W  D  D  T  T  C
901     CCTGTTTGCCGGTACTGTCAAACGCCCGAGCCAGTAGAAGAAAATAAGTGTTTTGAGTGT
301      P  V  C  R  Y  C  Q  T  P  E  P  V  E  E  N  K  C  F  E  C
961     GGTGTTCAGGAAAATCTTTGGATTTGTTTAATATGCGGCCACATAGGATGTGGACGGTAT
321      G  V  Q  E  N  L  W  I  C  L  I  C  G  H  I  G  C  G  R  Y
1021    GTCAGTCGACATGCTTATAAGCACTTTGAGGAAACGCAGCACACGTATGCCATGCAGCTT
341      V  S  R  H  A  Y  K  H  F  E  E  T  Q  H  T  Y  A  M  Q  L
1081    ACCAACCATCGAGTCTGGGACTATGCTGGAGATAACTATGTTCATCGACTGGTTGGAAGT
361      T  N  H  R  V  W  D  Y  A  G  D  N  Y  V  H  R  L  V  A  S
1141    AAAACAGATGGAAAAATAGTACAGTATGAATGTGAGGGGGATACTTGCCAGGAAGAGAA
381      K  T  D  G  K  I  V  Q  Y  E  C  E  G  D  T  C  Q  E  E  K
1201    ATAGATGCCTTACAGTTAGAGTATTCATATTTACTAACAAGCCAGCTGGAATCTCAGCGA
401      I  D  A  L  Q  L  E  Y  S  Y  L  L  T  S  Q  L  E  S  Q  R
1261    ATCTACTGGGAAAACAAGATAGTTCGGATAGAGAAGGACACAGCAGAGGAAATTAACAAC
421      I  Y  W  E  N  K  I  V  R  I  E  K  D  T  A  E  E  I  N  N
1321    ATGAAGACCAAGTTTAAAGAAACAATTGAGAAGTGTGATAATCTAGAGCACAAACTAAAT
441      M  K  T  K  F  K  E  T  I  E  K  C  D  N  L  E  H  K  L  N
1381    GATCTCCTAAAAGAAAAGCAGTCTGTGGAAAGAAAGTGCACTCAGCTAAACACAAAAGTG
461      D  L  L  K  E  K  Q  S  V  E  R  K  C  T  Q  L  N  T  K  V
1441    GCCAAACTCACCAACGAGCTCAAAGAGGAGCAGGAAATGAACAAGTGTTTGCGAGCCAAC
481      A  K  L  T  N  E  L  K  E  E  Q  E  M  N  K  C  L  R  A  N
1501    CAAGTCCTCCTGCAGAACAAGCTAAAAGAGGAGGAGAGGGTGCTGAAGGAGACCTGTGAC
501      Q  V  L  L  Q  N  K  L  K  E  E  E  R  V  L  K  E  T  C  D
1561    CAAAAAGATCTGCAGATCACCGAGATCCAGGAGCAGCTGCGTGACGTCATGTTCTACCTG
521      Q  K  D  L  Q  I  T  E  I  Q  E  Q  L  R  D  V  M  F  Y  L
1621    GAGACACAGCAGAAGATCAACCATCTGCCTGCCGAGACCCGGCAGGAAATCCAGGAGGGA
541      E  T  Q  Q  K  I  N  H  L  P  A  E  T  R  Q  E  I  Q  E  G
1681    CAGATCAACATCGCCATGGCCTCGGCCTCGAGCCCTGCCTCTTCGGGGGGCAGTGGGAAG
561      Q  I  N  I  A  M  A  S  A  S  S  P  A  S  S  G  G  S  G  K
1741            TTGCCCTCCAGGAAGGGCCGCAGCAAGAGGGGCAAGTGA
581               L  P  S  R  K  G  R  S  K  R  G  K  *
```

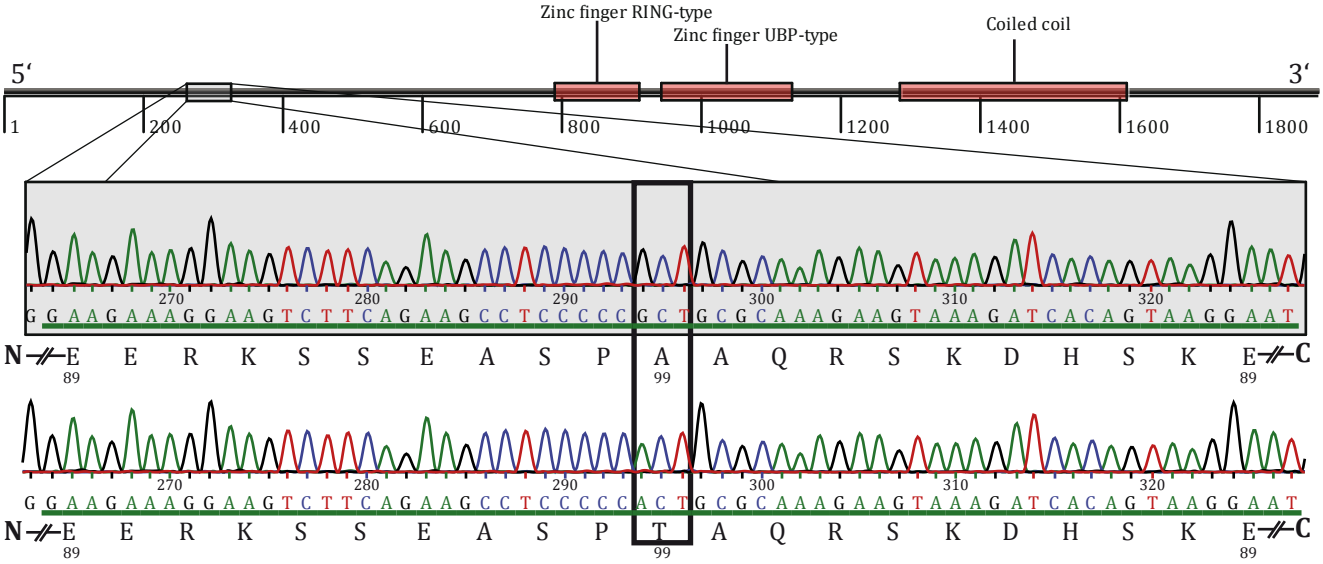
Name der Mutante	Mutation
IMP^{T99A}	ACT➔GCT T[99]A
IMP^{S117A}	TCTCCGTCC➔GCTCCGGCC S[117]A, S[119]A
IMP^{Y218A}	TAT➔GCT Y[218]A
IMP^{S252A}	AGC➔GCC S[252]A
IMP^{C264A}	TGC➔GCC C[264]A
IMP^{T308A}	ACG➔GCG T[308]A
IMP^{S380A}	AGT➔GCT S[380]A
IMP^{T395A}	ACT➔GCT T[395]A
IMP^{Y408A}	TATTCATAT➔GCTGCAGCT Y[408]A, S[409]A, Y[410]A
IMP^{S574A}	TCT➔GCT S[574]A

Abb. 3.1. 2 Übersicht zur Lokalisation der durchgeführten Mutationen in der Primärstruktur und der DNS-Sequenz von *IMP*

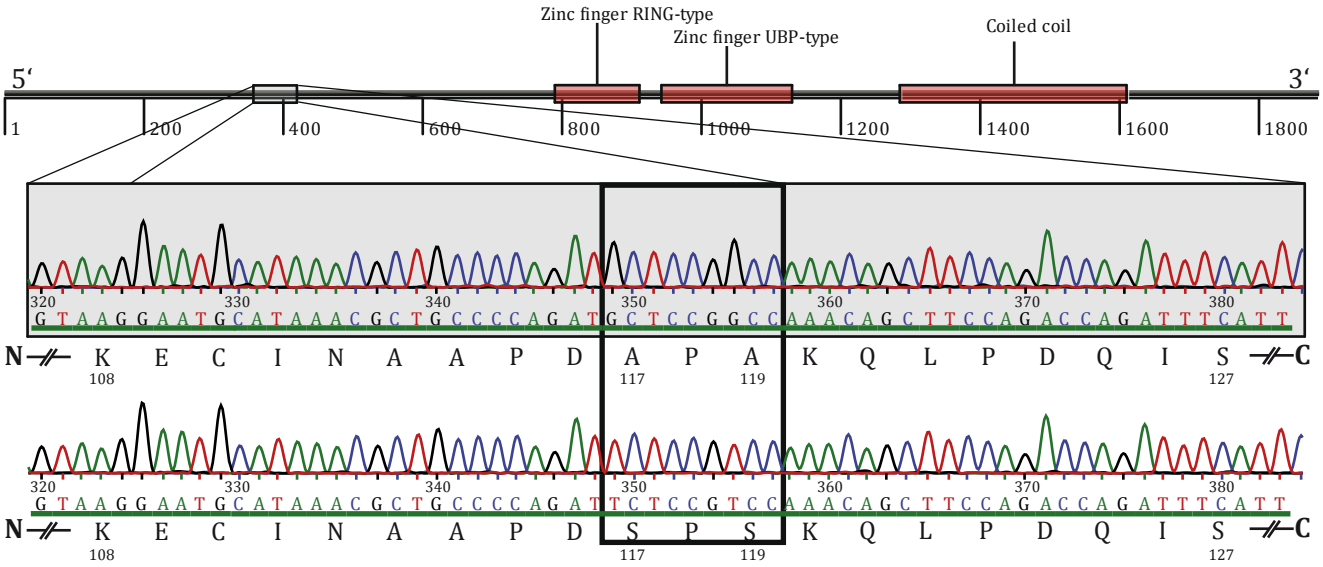
Um unerwünschte Mutationen ausschließen zu können, wurden die DNS-Sequenzen der erstellten Mutanten im Bereich des *IMP*-Gens mittels Sequenzierung vollständig überprüft. Durchschnittlich enthielten etwa 10% der aus der Transformation hervorgegangenen Kolonien die gesuchte Mutation.

Im Folgenden sind die DNS - Sequenzanalysen im Bereich der jeweiligen gewünschten Mutation, die Lokalisation der Mutation innerhalb des Proteins sowie wichtige Domänen des Proteins graphisch dargestellt (siehe Abb. 3.1.3 Seite: 71):

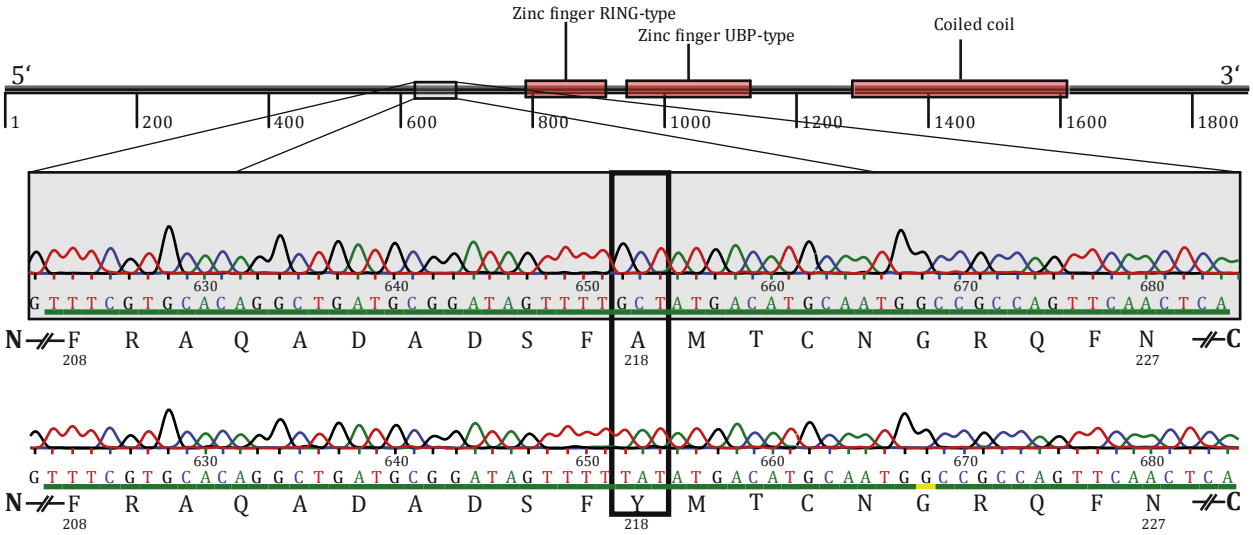
pDC-516-*IMP*^{T99A} (Klon 14):



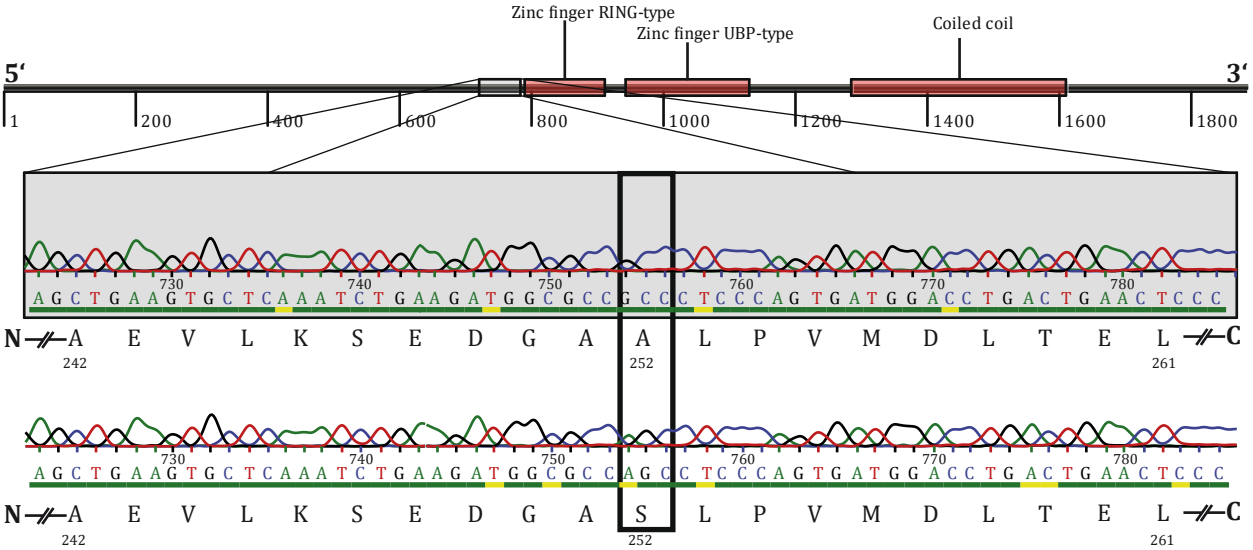
pDC-516-*IMP*$^{S117A/S119A}$ (Klon 2):



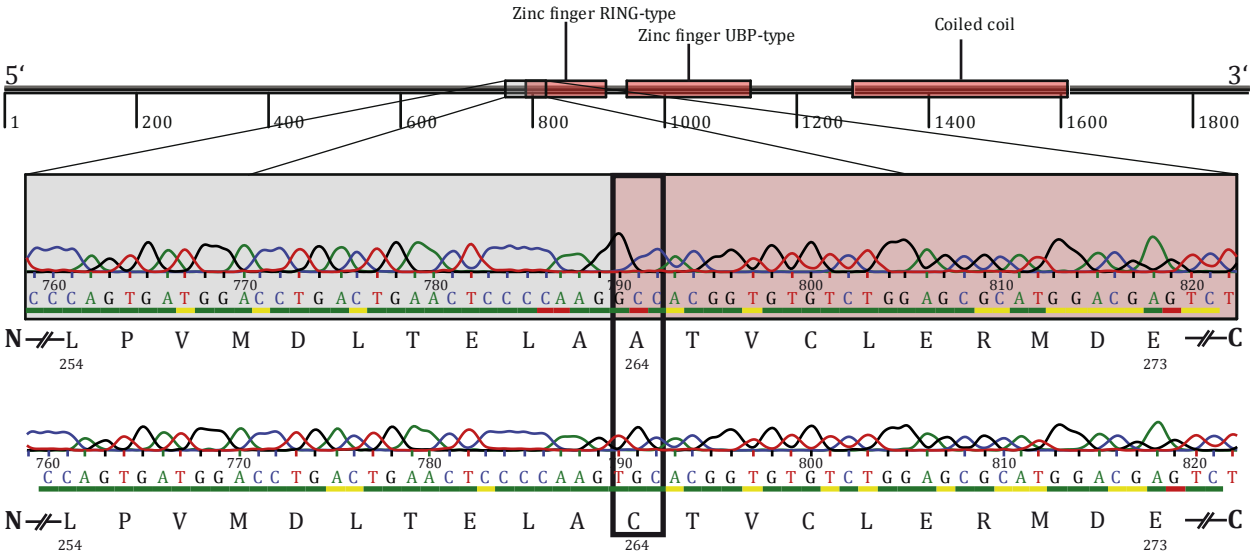
pDC-516-*IMP*^{Y218A} (Klon 13):



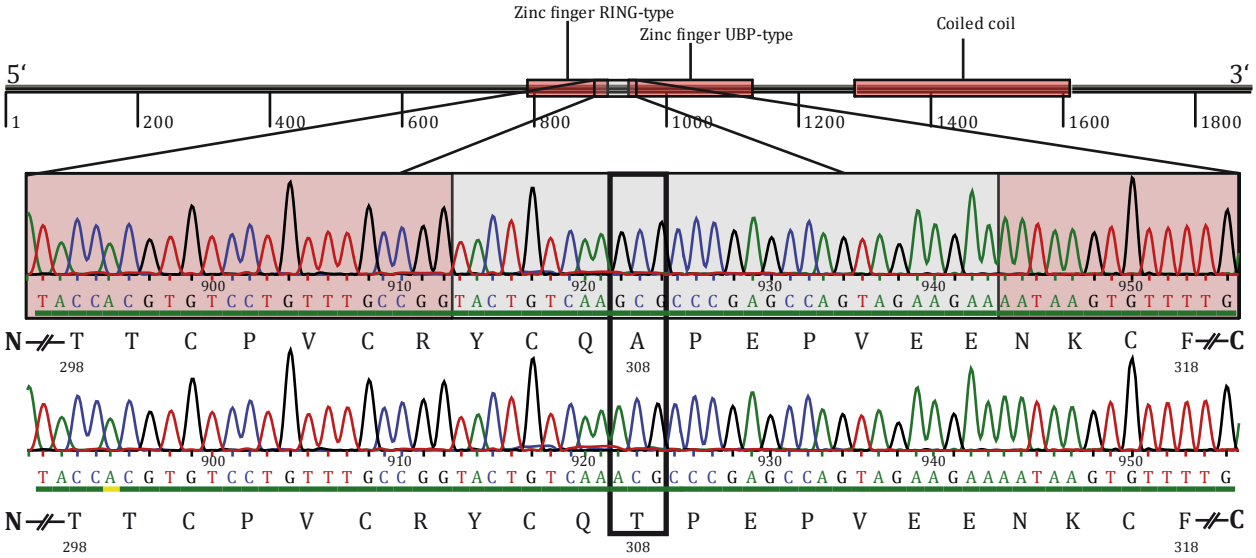
pDC-516-*IMP*^{S252A} (Klon 11):



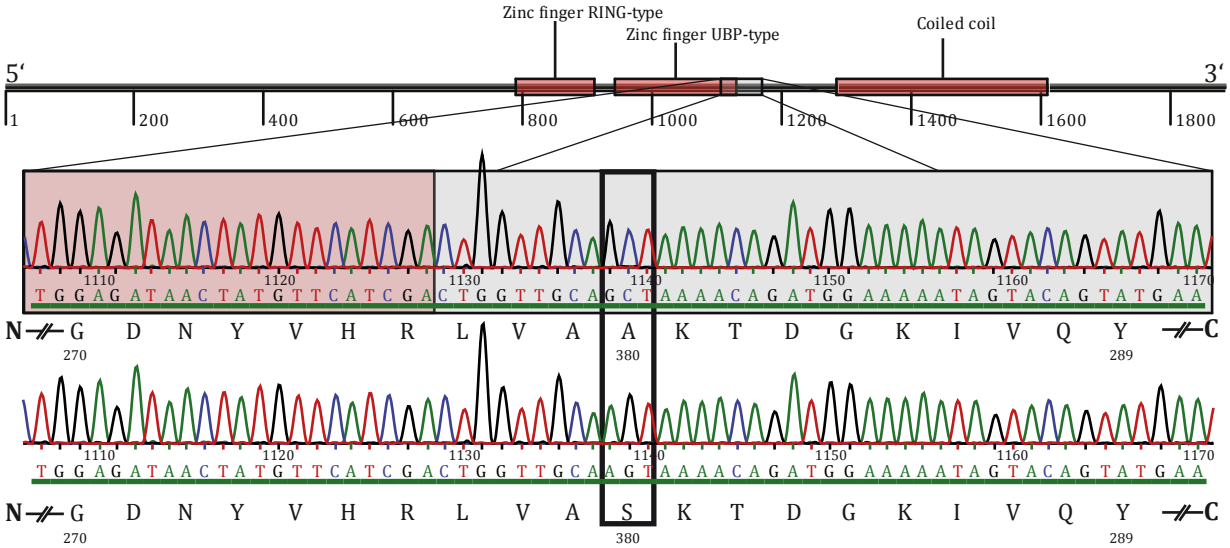
pDC-516-*IMP*^{C264A} (Klon 2):



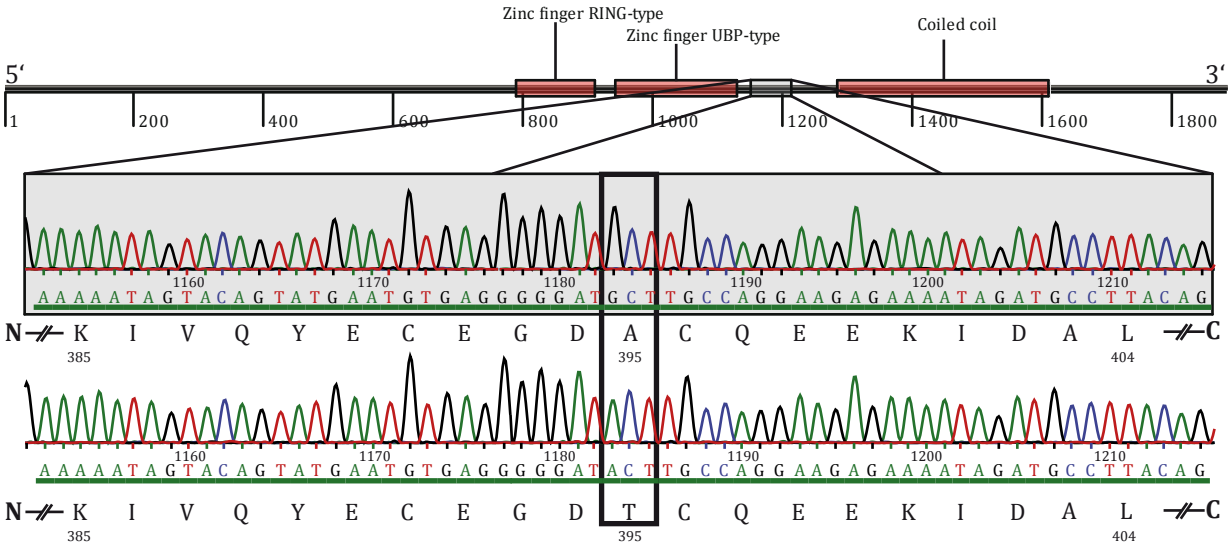
pDC-516-*IMP*^{T308A} (Klon 19):



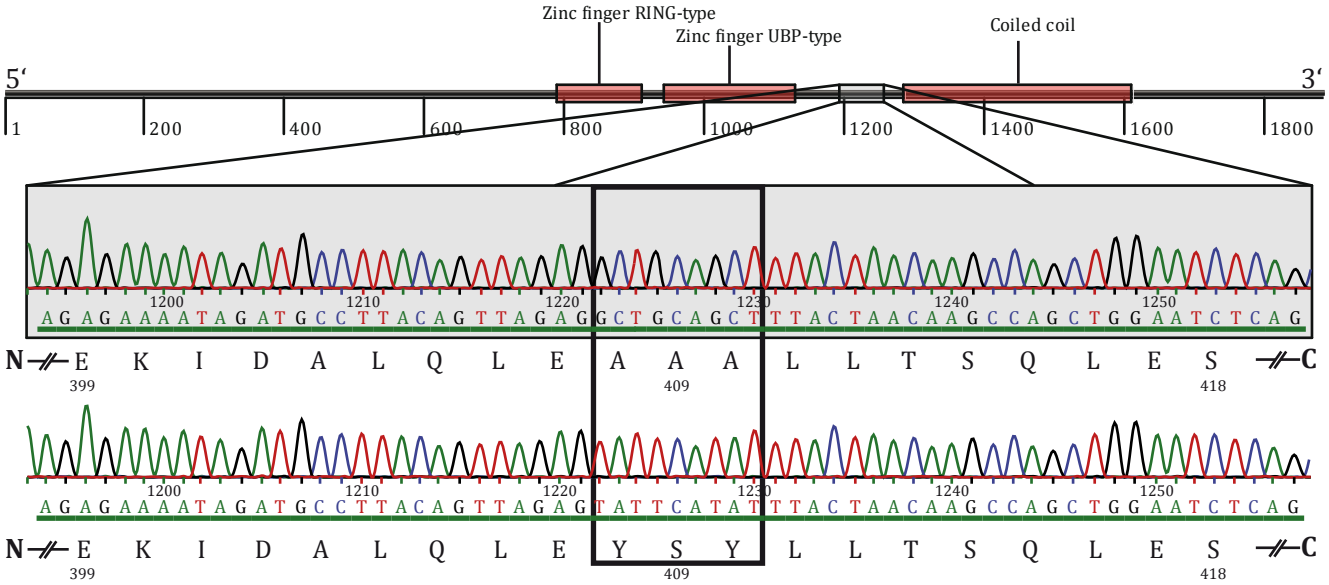
pDC-516-*IMP*^{S380A} (Klon 11):



pDC-516-*IMP*^{T395A} (Klon 14):



pDC-516-*IMP*$^{Y408A/S409A/Y410A}$ (Klon 5):



pDC-516-*IMP*^{S574A} (Klon 3):

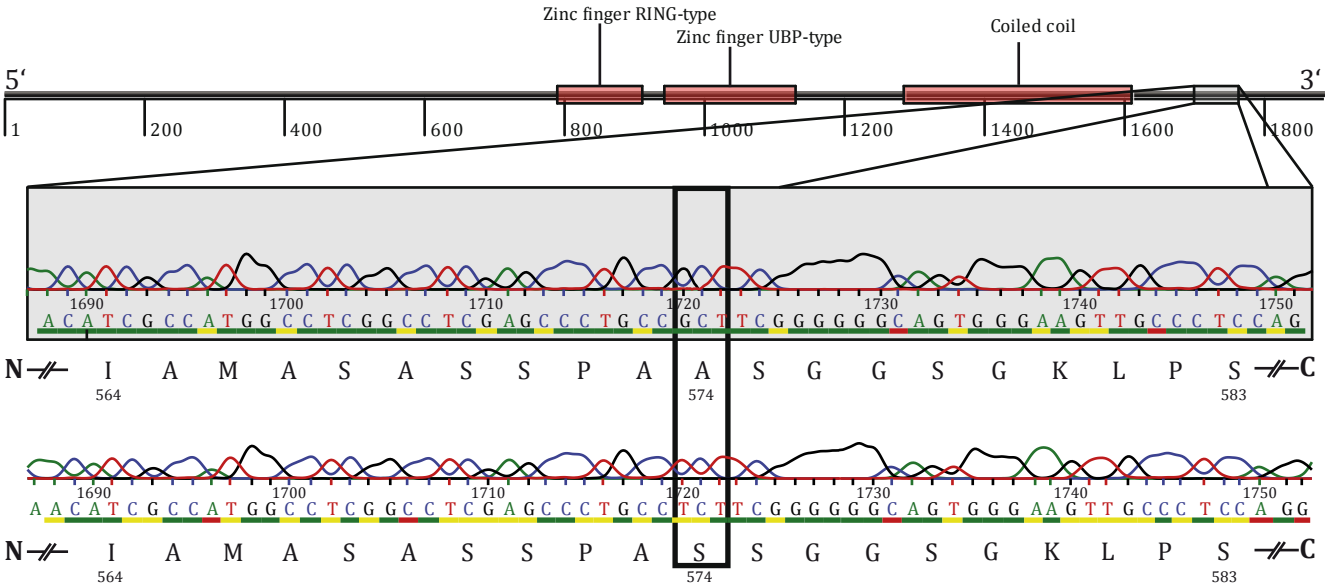


Abb. 3.1. 3 Übersicht zu den erstellten Mutationen von *IMP*
Die DNA- und Aminosäuresequenz von *IMP* sind im Bereich der jeweiligen Mutation anhand der Sequenzanalyse der Mutante (obere Sequenz) sowie der von Wildtyp-*IMP* (untere Sequenz) unter Berücksichtigung der Lokalisation der Mutation innerhalb des Proteins sowie wichtiger Domänen des Proteins dargestellt.

Darüber hinaus wurden Mehrfachmutanten mit den folgenden Kombinationen hergestellt:

Name der Mutante	Mutation
IMP$^{T99A/Y408A}$	T99A, Y408A, S409A
IMP$^{S117A/S119A/Y408A/S409A}$	S117A, S119A, Y408A, S409A
IMP$^{Y218A/Y408A}$	Y218A, Y408A, S409A
IMP$^{T99A/ S117A/Y408A}$	T99A, S117A, S119A, Y408A, S409A
IMP$^{T308A/S574A}$	T308A, S574A

Die nähere Untersuchung der Mehrfach-Mutanten ist ein zukünftiges Projekt. Auch sollen weitere Mehrfach-Mutanten erstellt werden.

3.2 *Mammalian Two-Hybrid*

Mit einem *Mammalian-Two-Hybrid*-Ansatz wurde die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* bestimmt. Dies erlaubt sowohl einen Einfluss im Sinne einer Hemmung als auch einer Steigerung der Proteinwechselwirkung zwischen *RAF* und *MEK* zu ermitteln. Dieses Untersuchungssystem ermöglicht es somit, die erstellten Mutanten mit der Ubiquitin-Ligase *IMP* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* zu vergleichen (siehe Methoden 2.2.17 Seite: 53).

3.2.1 Der Einfluss von *IMP* auf die Interaktion von B-*RAF* und *MEK* im Vergleich zum Einfluss von *IMP* auf die Interaktion von c-*RAF*^{BXB} und *MEK*

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* verglichen mit dem Einfluss von *IMP* auf die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* (siehe Methoden 2.2.18.1 Seite: 56). Bei c-*RAF*^{BXB} handelt es sich um eine konstitutiv aktive c-*RAF*-Isoform (Bruder et al., 1992), die nach ihrer Überexpression zu einer, im Vergleich zu c-*RAF*, gesteigerten Phosphorylierung von *MEK* führt. Um den jeweiligen Einfluss von *IMP* auf die Interaktion darstellen zu können, wurden in den Ansätzen, in denen die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion bestimmt werden sollte, die gemessenen RLU jeweils auf das arithmetische Mittel der basalen B-*RAF*/*MEK*-Interaktion desselben Versuchs normalisiert (RLUs siehe Anhang 6.1

Seite: 97). In den Ansätzen, die zur Bestimmung der c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion dienten, wurde entsprechend auf das arithmetische Mittel der basalen c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion desselben Versuchs normalisiert. Die so erhaltenen Ergebnisse der luminometrischen Messungen sind in der folgenden Tabelle (siehe Tab. 3.2.1 Seite 73) in Prozent der jeweiligen Interaktion dargestellt:

	Basal (B-*RAF*/*MEK*)	*IMP* (B-*RAF*/*MEK*)		Basal (c-*RAF*^{BXB}/*MEK*)	*IMP* (c-*RAF*^{BXB}/*MEK*)
N1	112,264029	92,7556938	N1	113,228503	61,85994352
	71,3794365	86,0093207		88,2281533	70,73134282
	116,356534	75,1631287		98,5433439	68,53964546
Mittelwert	100	84,6427144	Mittelwert	100	67,04364393
N2	102,192852	65,0103743	N2	92,5875307	101,8605514
	95,5262117	52,2131117		111,248008	73,65983755
	102,280937	41,9391162		96,1644608	94,248518
Mittelwert	100	53,0542007	Mittelwert	100	89,92296897
N3	95,189953	66,7907183	N3	131,853181	77,1530834
	106,147383	94,3217155		79,5190988	64,43146915
	98,6626638	78,0062997		88,6277207	53,38019168
Mittelwert	100	79,7062445	Mittelwert	100	64,98824808
N4	113,365479	75,1932933	N4	107,315246	60,42023348
	104,596506	69,2306343		108,994254	42,80102535
	82,0380144	74,3789496		83,6904999	67,51082287
Mittelwert	100	72,9342924	Mittelwert	100	56,9106939
N5	105,495687	83,9283956	N5	89,4837703	80,45299933
	117,846106	75,2927844		99,1488239	56,44068189
	76,6582066	103,853446		111,367406	86,51744307
Mittelwert	100	87,6915419	Mittelwert	100	74,47037476
N6	99,5926035	82,870468	N6	130,86835	133,0698893
	95,0903477	82,4659131		93,7935842	58,40037059
	105,317049	90,3624781		75,338066	103,4212577
Mittelwert	100	85,2329531	Mittelwert	100	98,29717253

Tab. 3.2. 1 Spezifische interaktionsabhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP*

Drei Messungen desselben Zelllysates wurden als Triplikat gemessen. Der jeweilige Mittelwert (farbig hinterlegt) wurde aus den drei Einzelwerten gebildet. Die Messwerte sind in Prozent der durchschnittlichen basalen Interaktion angegeben. Das Experiment wurde 6 Mal wiederholt.

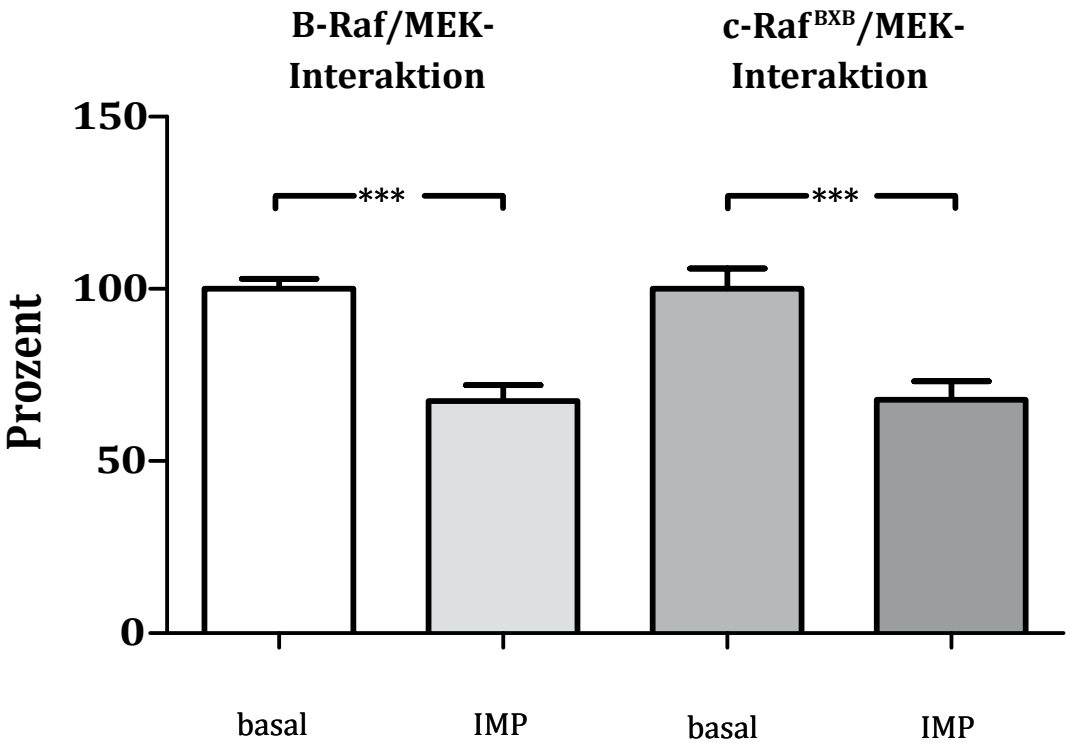


Abb. 3.2. 1 Untersuchung des Einflusses von *IMP* auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion im Vergleich zum Einfluss auf die c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion
Dargestellt ist die interaktionsabhängige Lichtemission des *Mammalian Two-Hybrid Assay* für die oben genannten Protein-Protein-Interaktionen in Prozent der basalen Interaktion. Auf der linken Seite sind die basale Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* sowie der Einfluss von *IMP* auf diese Interaktion dargestellt. Auf der rechten Seite erfolgt eine entsprechende Darstellung für die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK*. Verglichen mit der Lichtemission unter basalen Bedingungen (basal) war die interaktionsspezifische Luciferase-Aktivität in *IMP* transfizierten Zellen (*IMP*) jeweils statistisch höchst signifikant reduziert. Jeder Balken entspricht 6 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. (* ➔ $p < 0,05$, ** ➔ $p < 0,01$, *** ➔ $p < 0,001$, n.s ➔ statistisch nicht signifikant)

Anhand der interaktionsspezifischen Luciferase-Aktivität in *IMP* transfizierten Zellen (*IMP*) konnte gezeigt werden, dass *IMP* sowohl die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion (100% (basal(B-*RAF*)) vs. 77,6% (*IMP*(B-*RAF*)), N=6, p: <0,001) als auch die c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion (100% (basal(c-*RAF*^{BXB})) vs. 74,4% (*IMP*(c-*RAF*^{BXB})), N=6, p: <0,001) statistisch höchst signifikant hemmen kann (siehe Abb. 3.2.1 Seite: 74). Ein statistisch signifikanter Unterschied des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* und des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* zeigte sich nicht (77,6% (*IMP*(B-*RAF*)) vs. 74,4% (*IMP*(c-*RAF*^{BXB})), N=6, p: n.s.) (siehe Abb. 3.2.1 Seite: 74). Aus diesem Versuch konnten daher keine Hinweise auf Unterschiede in den hemmenden Einflüssen von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* bzw. c-*RAF*^{BXB} und *MEK* abgeleitet werden.

3.2.2 Die Inhibition der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-*IMP*

In dieser und der folgenden Versuchsreihe sollte die IMP^{C264A}-Mutante, die aufgrund der Mutation nicht mehr ubiquitinyliert werden kann, mit Hilfe des *Mammalian Two-Hybrid Assay* (siehe Methoden 3.2.18.2 Seite: 57) näher charakterisiert werden. In dieser Versuchsreihe erfolgte ein direkter Vergleich zwischen der *IMP*^{C264A}-Mutante und Wildtyp-*IMP* bezüglich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK*. Die Ergebnisse der luminometrischen Messungen sind in der folgenden Tabelle (siehe Tab. 3.2.2 Seite 75) als relative Lichteinheiten (engl.: *relative light units* (RLU)) dargestellt.

RLU[Firefly/Renilla]	Basal	*IMP*	*IMP*^{C264A}
N1	1,316582	1,142374	1,198016
	1,468136	1,051786	1,051989
	1,364614	1,130002	1,039999
Mittelwert	1,383110667	1,108054	1,096668
N2	1,722304	0,9237896	1,361452
	1,589082	1,304574	1,238118
	1,246362	1,078913	1,219455
Mittelwert	1,519249333	1,102425533	1,273008333
N3	1,189337	1,101739	1,206958
	1,015774	0,9990456	1,533206
	1,028639	0,7771086	1,176382
Mittelwert	1,077916667	0,959297733	1,305515333
N4	1,850667	1,322747	0,9707438
	1,637218	1,279801	1,223223
	1,739385	1,197169	1,303021
Mittelwert	1,742423333	1,266572333	1,1656626
N5	1,385403	1,481149	1,348398
	1,387215	1,454275	1,396621
	1,576636	1,254157	1,438736
Mittelwert	1,449751333	1,396527	1,394585
N6	2,082505335	1,785120764	1,853963209
	2,485935064	1,583709618	1,397327005
	2,172445297	1,619241799	1,520418702
Mittelwert	2,246961899	1,662690727	1,590569638

Tab. 3.2. 2 Spezifische interaktions-abhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* bzw. *IMP*^{C264A}.
Drei Messungen desselben Zelllysates wurden als Triplikat gemessen. Der jeweilige Mittelwert (farbig hinterlegt) wurde aus den drei Einzelwerten gebildet. Das Experiment wurde 6 Mal wiederholt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen zu erzielen, wurden die gemessenen Werte (in RLU) auf das arithmetische Mittel der unter

IMP-Einfluss gemessenen Werte desselben Versuchs normalisiert (siehe Tab. 3.2.3 Seite 76):

$$\left(\frac{x}{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_{(\mathrm{IMP})}i}\right)$$

Prozent	Basal	*IMP*	*IMP*^{C264A}
N1	118,8192994	103,097322	108,1189184
	132,4967917	94,92190814	94,94022854
	123,1541062	101,9807699	93,85815132
Mittelwert	124,8233991	100	98,97243275
N2	156,2286021	83,79609979	123,4960511
	144,1441578	118,3367004	112,3085381
	113,0563437	97,86719986	110,6156346
Mittelwert	137,8097012	100	115,4734079
N3	123,9799656	114,848494	125,8168302
	105,8872511	104,1434338	159,8258754
	107,2283363	81,00807216	122,6294986
Mittelwert	112,3651844	100	136,0907347
N4	146,1161713	104,4351724	76,64337634
	129,2636794	101,0444462	96,57742932
	137,3300959	94,52038139	102,8777406
Mittelwert	137,5699822	100	92,03284876
N5	99,20345256	106,0594604	96,55366491
	99,33320301	104,1351152	100,006731
	112,8969222	89,80542446	103,0224263
Mittelwert	103,8111926	100	99,86094075
N6	125,2491099	107,363368	111,5037919
	149,5127761	95,24980155	84,04010331
	130,6584118	97,38683042	91,44326588
Mittelwert	135,1400993	100	95,66238704

Tab. 3.2. 3 Übersicht über die aus Tab. 3.2.2 normalisierten Messwerte.
Zur Normalisierung wurde das arithmetische Mittel aus den unter dem Einfluss von *IMP* gemessenen Werten (in RLU) eines Versuchs gebildet und anschließend als Grundwert zu allen Messwerten eines Versuchs prozentual in Beziehung gesetzt.

B-*RAF*/*MEK*-Interaktion

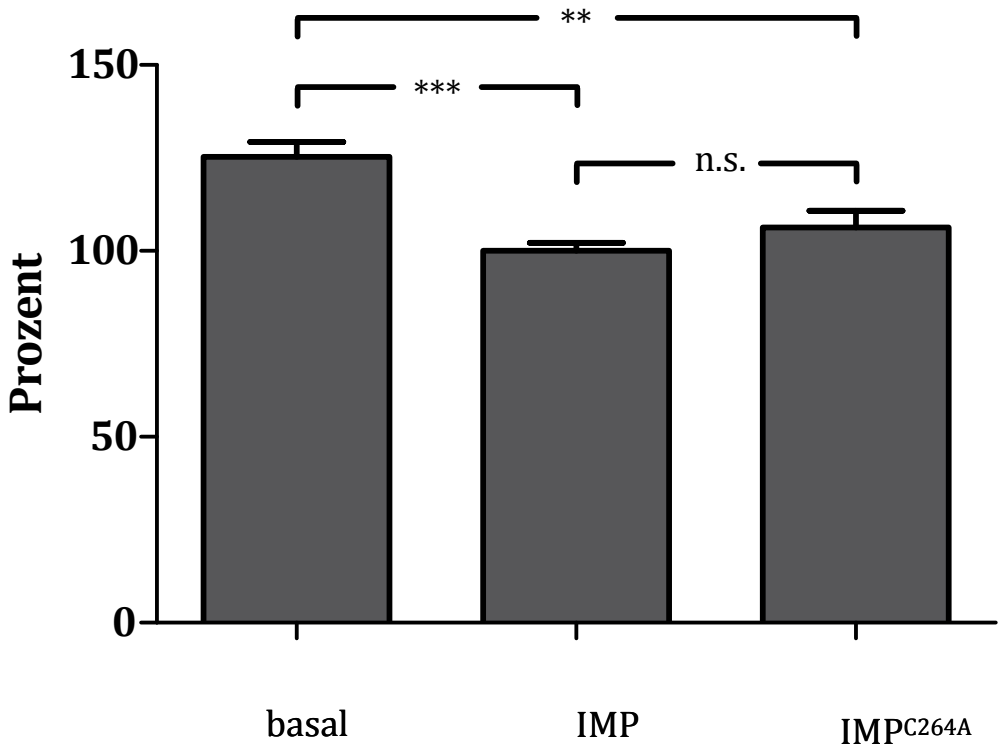


Abb. 3.2. 2 Untersuchung des Einflusses von pDC-516-*IMP*^{C264A} auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion
Es wurde die Höhe der interaktions-spezifischen Lichtemissionen bestimmt. Das Diagramm wurde anhand der Tab. 3.2.3 erstellt. Verglichen mit der Lichtemission unter basalen Bedingungen (basal), war die interaktionsspezifische Luciferase-Aktivität in *IMP* transfizierten Zellen (*IMP*) und in *IMP*^{C264A} transfizierten (*IMP*^{C264A}) Zellen statistisch signifikant reduziert. Jeder Balken entspricht 6 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. (* ➔ $p < 0,05$, ** ➔ $p < 0,01$, *** ➔ $p < 0,001$, n.s ➔ statistisch nicht signifikant)

Verglichen mit der Lichtemission unter basalen Bedingungen (basal), war die interaktionsspezifische Luciferase-Aktivität in *IMP* transfizierten Zellen (*IMP*) statistisch höchst signifikant reduziert (125% (basal) vs. 100% (*IMP*), N=6, p:<0,001) (siehe Abb. 3.2.2 Seite: 77) Der Einfluss der *IMP*^{C264A}-Mutante auf die Interaktion war statistisch immer noch hoch signifikant (125% (basal) vs. 106% (*IMP*^{C264A}) , N=6, p:<0,01) (siehe Abb. 3.2.2 77). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der interaktionsspezifischen Luciferase-Aktivität in *IMP* vs. *IMP*^{C264A} transfizierten COS-7-Zelllysaten konnte nicht festgestellt werden (100% (*IMP*) vs. 106% (*IMP*^{C264A}), N=6, p: n.s.) (siehe Abb. 3.2.2 Seite: 77).

3.2.3 Die Inhibition der *IMP*^{C264A}-Mutante auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion im Vergleich zu Wildtyp-*IMP* unter dem konstantem Einfluss von *RAS*

Für *RAS* konnte eine Interaktion mit *IMP* nachgewiesen werden, die über Ubiquitinierung zu einer Degradation von *IMP* führt (Matheny et al., 2004). In dieser Versuchsreihe wurde die *IMP*^{C264A}-Mutante, die aufgrund der Mutation nicht mehr ubiquitinyliert werden kann, unter *RAS* Einfluss mit Hilfe des *Mammalian Two-Hybrid Assay* (siehe Methoden 2.2.18.3 Seite: 58) näher charakterisiert. Dabei erfolgte ein direkter Vergleich zwischen der *IMP*^{C264A}-Mutante und Wildtyp-*IMP* bezüglich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* unter dem konstanten Einfluss von *RAS*^{V12}**.** Die Ergebnisse der luminometrischen Messungen sind in der folgenden Tabelle (siehe Tbl. 3.2.4 Seite 79) als relative Lichteinheiten (engl.: *relative light units* (RLU)) dargestellt:

RLU[Firefly/Renilla]	RAS^{V12}	RAS^{V12}+IMP	RAS^{V12}+IMP^{C264A}
N1	2,494959	2,757075	2,50945
	3,37927	2,942385	2,517914
	2,740642	2,883485	2,368677
Mittelwert	2,871623667	2,860981667	2,465347
N2	3,26518	2,673135	2,190281
	3,362804	2,863769	2,4589
	3,43155	2,695951	2,377842
Mittelwert	3,353178	2,744285	2,342341
N3	2,05759482	1,624599543	1,595291
	1,748613642	1,701484859	1,518691
	1,326027378	1,624347759	1,39596
Mittelwert	1,71074528	1,650144054	1,503314
N4	2,561189775	2,280013869	2,247836
	2,267497323	2,232609925	2,153721
	2,159728087	2,28737708	2,26882
Mittelwert	2,329471728	2,266666958	2,223459
N5	3,840144161	3,054530155	3,087836
	3,182929976	3,543973972	3,144198
	3,415069965	3,25415035	3,154896
Mittelwert	3,479381367	3,284218159	3,128976667
N6	2,420880623	2,373186436	2,187126217
	2,457063609	2,515244427	2,186864772
	3,523308553	2,545461495	1,971399848
Mittelwert	2,800417595	2,477964119	2,115130279

Tab. 3.2. 4 Spezifische interaktions-abhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* bzw. IMP^{C264A} unter dem Einfluss von RAS^{V12}
Drei Messungen desselben Zelllysates wurden als Triplikat gemessen. Der jeweilige Mittelwert (farbig hinterlegt) wurde aus den drei Einzelwerten gebildet. Das Experiment wurde 6 Mal wiederholt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen zu erzielen wurden die gemessenen Werte (in RLU) auf das arithmetische Mittel der unter RAS^{V12}+IMP Einfluss gemessenen Werte desselben Versuchs normalisiert (siehe Tab. 3.2.5 Seite 80):

$$\left(\frac{x}{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_{(\mathrm{RAS^{V12}+IMP})}{}^{i}}\right)$$

	RAS^{V12}	*RAS*^{V12}+*IMP*	*RAS*^{V12}+*IMP*^{C264A}
N1	87,20639594	96,36814636	87,71290041
	118,1157516	102,8452938	88,00874292
	95,7937631	100,7865599	82,79245644
Mittelwert	100,3719702	100	86,17136659
N2	118,9810825	97,40733925	79,81244659
	122,538439	104,353921	89,60075211
	125,0434995	98,23873978	86,64705014
Mittelwert	122,1876737	100	85,35341628
N3	124,6918301	98,45198297	96,67586272
	105,9673328	103,1112923	92,03384375
	80,35827991	98,43672472	84,59625067
Mittelwert	103,672481	100	91,10198572
N4	112,993652	100,5888342	99,16922255
	100,0366337	98,49748404	95,01709073
	95,28210923	100,9136817	100,0949871
Mittelwert	102,7707983	100	98,0937668
N5	116,9271947	93,00631099	94,02042893
	96,91591186	107,9092131	95,73657558
	103,9842605	99,08447589	96,06231521
Mittelwert	105,9424557	100	95,27310657
N6	97,69635501	95,77162226	88,26303011
	99,15654508	101,5044733	88,25247933
	142,1856162	102,7239045	79,55723944
Mittelwert	113,0128388	100	85,35758296

Tab. 3.2. 5 Übersicht über die aus Tab. 3.2.4 normalisierten Messwerte
Zur Normalisierung wurde das arithmetische Mittel aus den unter dem Einfluss von *IMP*+*RAS*^{V12} gemessenen Werten (in RLU) eines Versuchs gebildet und anschließend als Grundwert zu allen Messwerten eines Versuchs prozentual in Beziehung gesetzt.

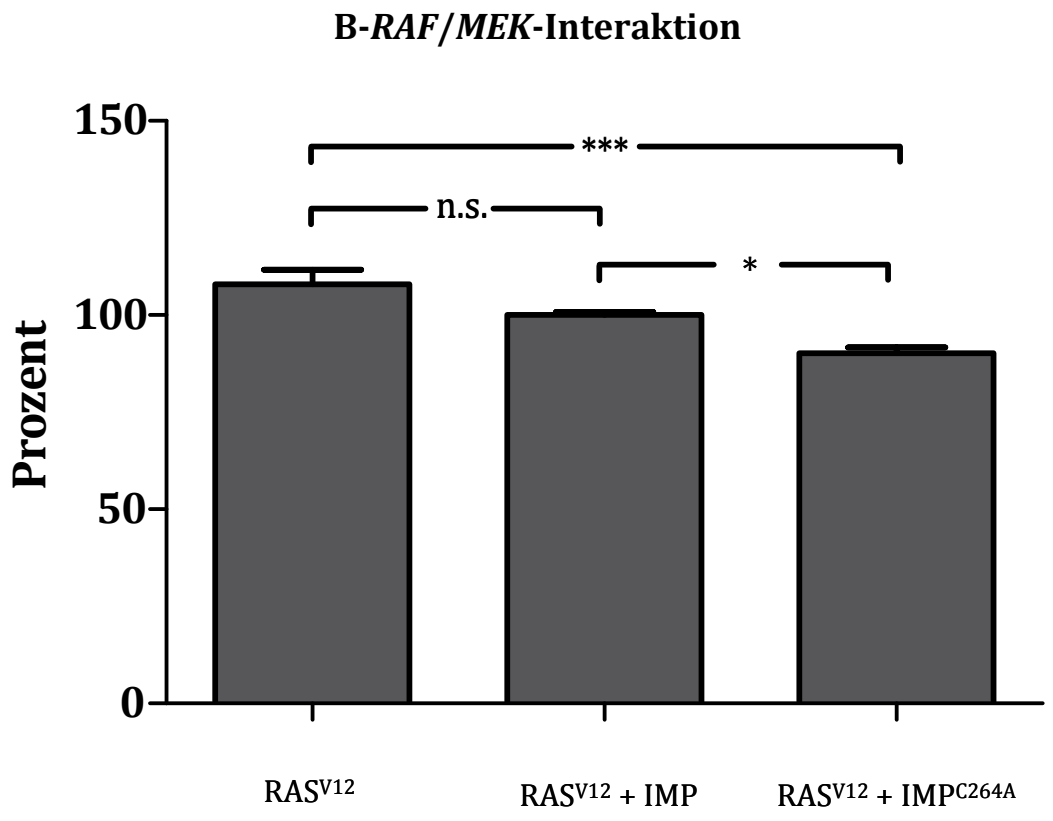


Abb. 3.2.3 Untersuchung des Einflusses von pDC-516-C264A auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion unter der Stimulation von *RAS*^{V12}
Es wurde die Höhe der interaktions-spezifischen Lichtemissionen bestimmt. Das Diagramm wurde anhand der Tab. 3.2.5 erstellt. Verglichen mit der Lichtemission unter dem alleinigen Einfluss von *RAS*^{V12} (*RAS*^{V12}) war die interaktionsspezifische Luciferase-Aktivität in darüber hinaus mit *IMP*^{C264A} transfizierten Zelllysaten (*RAS*^{V12} + *IMP*^{C264A}) statistisch signifikant reduziert. Ein statistisch signifikanter Einfluss durch *IMP* konnte bei gleichzeitiger Stimulation durch *RAS*^{V12} (*RAS*^{V12} + *IMP*) nicht festgestellt werden. Jeder Balken entspricht 6 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. (* ➔ $p < 0,05$, ** ➔ $p < 0,01$, *** ➔ $p < 0,001$, n.s ➔ statistisch nicht signifikant)

Der Einfluss der *IMP*^{C264A}-Mutante auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion war statistisch höchst signifikant (108% (*RAS*^{V12}) vs. 90,2% (*IMP*^{C264A}), N=6, p:< 0,001) (siehe Abb. 3.2.3 Seite: 81). Die mit *IMP*^{C264A} und *RAS*^{V12} transfizierten COS-7-Zelllysate wiesen eine um 17,8 % geringere Lichtemission im Vergleich zu den lediglich mit *RAS*^{V12} transfizierten Zelllysaten auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit *IMP* und *RAS*^{V12} transfizierten Zelllysaten (*RAS*^{V12}+*IMP*) keine statistisch signifikante Reduktion der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion (108% (*RAS*^{V12}) vs. 100% (*IMP*), N=6, p: n.s.) festgestellt werden (siehe Abb. 3.2.3 Seite: 81). Jedoch konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der interaktionsspezifischen Luciferase-Aktivität unter dem Einfluss von *RAS*^{V12} in *IMP* vs. *IMP*^{C264A} transfizierten COS-7-Zelllysaten gefunden werden (100% (*IMP*) vs. 90,2% (*IMP*^{C264A}), N=6, p: < 0,05) (siehe Abb. 3.2.3 Seite: 81). Die Inhibition der Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* unter *RAS* Einfluss durch die *IMP*^{C264A}-Mutante im Gegensatz zu dem Einfluß von Wildtyp-*IMP* lässt sich durch die

Inaktivierung der Ubiquitinierungsstelle und der dadurch reduzierten Autodegradation der Mutante erklären (Matheny et al., 2004).

3.2.4 Untersuchung der Phosphorylierungsmutanten anhand der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* verglichen mit dem Einfluss der erstellten Mutanten auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* (siehe Methoden 2.2.18.4 Seite: 59). Ziel war es, Unterschiede im Ausmaß der durch die Mutanten bzw. *IMP* verursachten Inhibition der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* zu erfassen. Die Ergebnisse der luminometrischen Messungen sind in der folgenden Tabelle (siehe Tab. 3.2.6 Seite 82) als RLU aufgelistet:

RLU	B-*RAF-MEK*	*IMP*	T99	S117	Y218	S252	C264
N1	0,73247507	0,66947245	0,57678603	0,52683475	0,55931747	0,58643864	0,28141009
	0,75437549	0,52105441	0,56651547	0,65212223	0,60639715	0,64109921	0,61552384
	0,90107391	0,49410294	0,58878623	0,52005005	0,66953712	0,49620883	0,67054834
Mittelwert	0,79597482	0,56154326	0,57736258	0,56633568	0,61175058	0,57458223	0,52249409
N2	1,38430424	1,10130032	0,80184398	1,12801847	0,92370179	1,04350998	1,07258442
	1,54636526	0,98798467	1,02962562	1,22754032	1,05993683	1,02107381	1,09466348
	1,0059016	1,36275491	1,19583281	1,05261329	0,46018077	1,01544165	1,1190712
Mittelwert	1,31219037	1,15067997	1,0091008	1,13605736	0,81460646	1,02667515	1,0954397
N3	2,18904471	1,28080488	1,11210836	0,89688043	1,07545266	1,04284733	1,0689016
	1,93100379	0,83648073	1,16898416	1,11168744	1,31030279	1,06371784	1,00249258
	2,05799267	0,92341167	0,91665685	1,20641956	1,15033421	1,03700054	0,96658112
Mittelwert	2,05934706	1,01356576	1,06591646	1,07166248	1,17869655	1,04785524	1,01265843
RLU	B-*RAF-MEK*	*IMP*	T308	S380	T395	Y408	S574
N1	0,80621496	0,51125769	0,30952268	0,61975533	0,55372507	0,62198273	0,24864665
	0,28757951	0,58117121	0,37099361	0,67345189	0,82891053	0,6591732	0,24763182
	0,89477143	0,40533907	0,35310338	0,60911641	0,14396333	0,60507508	0,30285698
Mittelwert	0,6628553	0,49925599	0,34453989	0,63410788	0,50886631	0,62874367	0,26637848
N2	1,38317846	1,15093534	0,50743291	1,1574224	1,10854291	1,41428873	0,7091584
	1,32064949	1,14531673	0,75362677	1,10994188	1,29088104	1,2639506	0,64649931
	1,46268165	1,25498711	0,82930166	0,83997063	0,63225651	1,18901019	0,80184008
Mittelwert	1,38883653	1,18374639	0,69678712	1,0357783	1,01056015	1,28908318	0,71916593
N3	3,07391614	1,13283886	0,58981886	1,26091416	1,00048907	1,12292459	0,65660456
	2,27188316	1,23605545	0,72227532	1,33929419	1,18056467	1,24223344	0,6751761
	2,54895914	1,35070957	0,83868138	1,22990411	1,33802151	1,03101599	0,75118235
Mittelwert	2,63158615	1,23986796	0,71692519	1,27670415	1,17302509	1,13205801	0,694321

Tab. 3.2. 6 Spezifische interaktionsabhängige Lichtemissionen in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von *IMP* bzw. der erstellten Mutationen von *IMP*
Drei Messungen desselben Zelllysates wurden als Triplikat gemessen. Der jeweilige Mittelwert (farbig hinterlegt) wurde aus den drei Einzelwerten gebildet. Das Experiment wurde 6 Mal wiederholt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen zu erzielen wurden die gemessenen Werte (in RLU) auf das arithmetische Mittel der unter *IMP*-Einfluss gemessenen Werte desselben Versuchs normalisiert (siehe Tab. 3.2.7 Seite 83):

$$\left(\frac{x}{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_{(\mathrm{IMP})}\, i}\right)$$

Prozent	B-*RAF-MEK*	*IMP*	T99	S117	Y218	S252	C264
N1	130,43965	119,220101	102,714442	93,819084	99,6036287	104,433386	50,113697
	134,339691	92,7897175	100,885454	116,130362	107,98761	114,167375	109,612897
	160,463845	87,9901815	104,851446	92,6108606	119,231619	88,3652007	119,411697
Mittelwert	141,747729	100	102,817114	100,853436	108,940952	102,321987	93,0460967
N2	120,30315	95,7086554	69,6843608	98,0305999	80,2744301	90,6863775	93,2130954
	134,387084	85,8609426	89,4797557	106,679559	92,113955	88,7365589	95,1318797
	87,4180166	118,430402	103,924014	91,4775022	39,9920724	88,2470958	97,2530361
Mittelwert	114,036084	100	87,6960434	98,7292204	70,7934858	89,223344	95,199337
N3	215,974611	126,366234	109,722368	88,4876412	106,105859	102,888966	105,459522
	190,515887	82,5285107	115,333825	109,680841	129,276545	104,948084	98,907503
	203,04481	91,1052555	90,4388141	119,027261	113,493792	102,312112	95,3644211
Mittelwert	203,178436	100	105,165002	105,731914	116,292065	103,383054	99,9104819
Prozent	B-*RAF-MEK*	*IMP*	T308	S380	T395	Y408	S574
N1	161,483282	102,403918	61,9967896	124,135782	110,91005	124,581927	49,8034386
	57,6016155	116,407459	74,3092952	134,8911	166,02916	132,031106	49,6001709
	179,220972	81,1886236	70,7259182	122,004828	28,8355732	121,195357	60,6616613
Mittelwert	132,768623	100	69,0106676	127,01057	101,924928	125,93613	53,3550903
N2	116,847534	97,2282023	42,8666916	97,7762133	93,6469942	119,475653	59,9079673
	111,565239	96,7535561	63,6645464	93,7651756	109,050473	106,775456	54,6146801
	123,563768	106,018242	70,0573762	70,9586646	53,4114839	100,444673	67,7374887
Mittelwert	117,325514	100	58,8628714	87,5000178	85,3696503	108,898594	60,7533787
N3	247,922863	91,3677015	47,5711024	101,697455	80,6931953	90,5680788	52,9576195
	183,235896	99,6925069	58,2542128	108,019098	95,2169671	100,190785	54,4554841
	205,583112	108,939792	67,642798	99,1963779	107,916452	83,1553055	60,5856735
Mittelwert	212,24729	100	57,8227044	102,970977	94,6088716	91,3047232	55,9995924

Tab. 3.2. 7 Übersicht über die aus Tab. 3.2.7 normalisierten Messwerte
Zur Normalisierung wurde das arithmetische Mittel aus den unter dem Einfluss von *IMP* gemessenen Werten (in RLU) eines Versuchs gebildet und anschließend als Grundwert zu allen Messwerten eines Versuchs prozentual in Beziehung gesetzt.

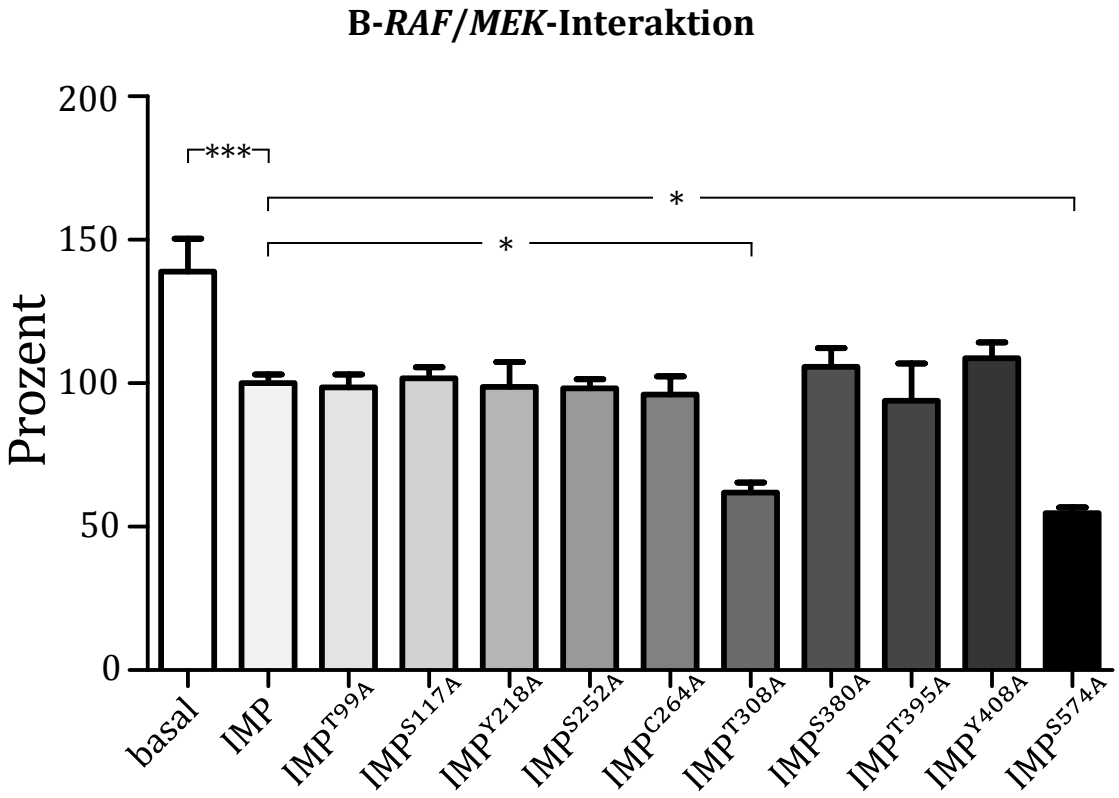


Abb. 3.2. 4 Untersuchung des Einflusses der erstellten Mutationen von *IMP* auf die B-*RAF*/*MEK*-Interaktion
Das Diagramm wurde anhand der in Tab. 3.2.7 gezeigten Daten erstellt. Es wurde die Höhe der interaktionsspezifischen Lichtemissionen bestimmt. Verglichen mit der Lichtemission unter basalen Bedingungen (basal) war die interaktionsspezifische Luciferase-Aktivität in darüber hinaus mit *IMP* transfizierten Zelllysaten (*IMP*) bzw. in darüber hinaus mit den Mutanten transfizierten Zelllysaten (*IMP*^{T99A}... *IMP*^{S574A}) statistisch signifikant reduziert. Jeder Balken entspricht 3 Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. (* ➔ p < 0,05, ** ➔ p < 0,01, *** ➔ p < 0,001, n.s ➔ statistisch nicht signifikant).

Aus den Messwerten geht hervor, dass neben *IMP* auch die erstellten Mutanten einen statistisch signifikant hemmenden Einfluss auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* haben (siehe Abb. 3.2.4 Seite: 84):

(153 % (basal) vs. 100 % (*IMP*), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 99 % (*IMP*^{T99A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 102 % (*IMP*^{S117A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 99 % (*IMP*^{Y218A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 98 % (*IMP*^{S252A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 96 % (*IMP*^{C264A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 62 % (*IMP*^{T308A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 106 % (*IMP*^{S380A}), N=3, p: < 0,001)

(153 % (basal) vs. 94 % (*IMP*^{T395A}), N=3, p: < 0,001)

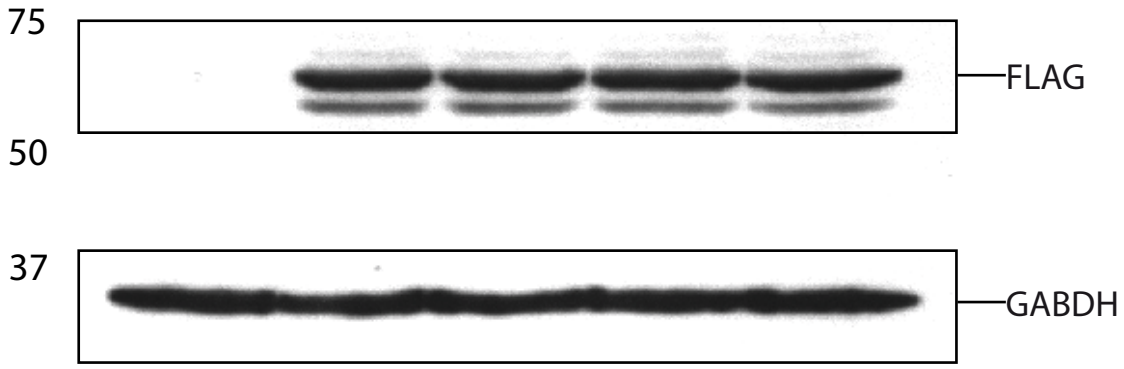
(153 % (basal) vs. 109 % (*IMP*^{Y408A}), N=3, p: < 0,01)

(153 % (basal) vs. 58 % (*IMP*^{S574A}), N=3, p: < 0,001)

Außerdem konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Beeinflussung der B-*RAF*/*MEK*-Interaktion durch die *IMP*^{T308A}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-*IMP* gezeigt werden (100 % (*IMP*) vs. 62 % (*IMP*^{T308A}), N=3, $p<0.05$) (siehe Abb. 3.2.4 Seite: 84). Das gleiche gilt für die *IMP*^{S574A}-Mutante (100 % (*IMP*) vs. 58 % (*IMP*^{S574A}), N=3, $p<0.05$) (siehe Abb. 3.2.4 Seite: 84). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Aktivität, mit der *IMP* die Interaktion von B-*RAF* und *MEK* beeinflusst, über Phosphorylierungsschritte reguliert wird. Die Aminosäuren T308 und S574 der Primärstruktur von *IMP* bewirken im phosphorylierten Zustand anscheinend eine Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase *IMP*.

3.3 Vergleichende Untersuchung der Expression verschiedener *IMP*-Mutanten

Im Western Blot sollte die Expression der Mutanten im Vergleich zu *IMP* bestimmt werden.



	pDC-516-leer	pDC-516-IMP	pDC-516-IMP^{C264A}	pDC-516-IMP^{T308A}	pDC-516-IMP^{S574A}
FLAG/ GAPDH	0	0,590551181	0,598425197	0,6	0,559440559

Abb. 3.3. 1 Western Blot zum Vergleich der Expression von IMP mit der Expression der erstellten Mutanten

IMP und die Mutanten *IMP*^{C264A}, *IMP*^{T308A}, *IMP*^{S574A} wurden in COS-7-Zellen exprimiert. Dies sollte Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten bei den durchgeführten Transfektionen im Luciferase-Assay ermöglichen. Auf der für *IMP* aufgrund der Größe zu erwartenden Höhe konnte mit einem gegen Flag gerichteten Antikörper für *IMP* und für die untersuchten Mutanten ein Bandenmuster nachgewiesen werden. Der Western Blot zeigte eine vergleichbare Expressionsstärke der verschiedenen

Mutanten. Daher ist es nicht zu erwarten, dass die Ergebnisse des Luciferase-Assays auf Unterschiede im Ausmaß der Expression der verwendeten Vektoren zurückzuführen sind.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die E3-Ubiquitin-Ligase *IMP* hinsichtlich posttranskriptionaler Veränderungen untersucht werden.

Im Vorfeld der Arbeit konnten durch 2D-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse innerhalb von *IMP* mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie wurde daraufhin eine massenspektrometrische Analyse des Präzipitats durchgeführt, die zu der Identifikation von mehreren phosphorylierten Peptiden führte. Bei Peptiden mit mehr als einer potentiell phosphorylierbaren Aminosäure wurde auf der Basis der Sequenz die mit der größten Wahrscheinlichkeit phosphorylierte Aminosäure mittels Algorithmus (MASCOT-Programm) berechnet (Grebe, 2008).

Zunächst wurden die Aminosäure-Sequenzen von *IMP* bei verschiedenen Spezies verglichen. Dies war ein Anhaltspunkt, um anhand des hohen evolutionären Konservierungsgrades einzelner Aminosäuren eine Eingrenzung phosphorylierbarer Aminosäuren von funktioneller Bedeutung vorzunehmen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Bereiche mit einem hohen Grad an Konservierung auf Regionen mit hohem Einfluss auf die Funktion des Proteins hinweisen. Auf diese Weise wurden zehn Aminosäuren gewählt und mittels Mutagenese derart verändert, dass posttranskriptionale Modifikationen an diesen Stellen unmöglich wurden. Die DNS-Sequenzen der erstellten Mutanten wurden im Bereich des *IMP*-Gens mittels Sequenzierung vollständig überprüft und konnten als eindeutig hinsichtlich des Mutationserfolges beurteilt werden.

IMP ist wahrscheinlich in der Lage, die ERK1/2-Kaskade durch eine *KSR*-abhängige Reduktion der Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* zu hemmen (Matheny et al., 2004). Es existieren mehrere Isoformen von *RAF* mit nicht redundanten Funktionen. B-*RAF* hat eine hohe basale *MEK*-Kinase-Aktivität, dagegen ist c-*RAF* wenig aktiv. Deshalb wurde c-*RAF* in Form der konstitutiv aktiven c-RAF^{BXB}-Mutante untersucht. Zunächst wurde der Einfluss von Wildtyp-*IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* sowie c-RAF^{BXB} und *MEK* in *Mammalian Two-Hybrid Assay* verglichen. Hier konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es ergaben sich also keine Hinweise auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* bzw. c-RAF^{BXB} und *MEK* durch *IMP*. Die weitere Charakterisierung der Mutanten erfolgte anhand der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK*.

Durch die Mutation *IMP*^{C264A} wurde die posttranskriptionale Ubiquitinylierung von *IMP* unmöglich gemacht. Es zeigte sich, dass die Mutante in vergleichbarer Weise wie Wildtyp-*IMP* in der Lage ist, die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* zu hemmen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von *RAS*^{V12} die Mutante *IMP*^{C264A} im Gegensatz zu Wildtyp-*IMP* weiterhin in der Lage ist, diese Interaktion statistisch signifikant zu inhibieren. Das bedeutet, dass die Ubiquitinylierung an der Position 264 *RAS*-abhängig die Fähigkeit von *IMP*, die *RAF*-*MEK*-Interaktion zu hemmen, beeinflußt. Dieser Befund ist konsistent zu einer früheren Publikation (Matheny et al., 2004).

Bei der Untersuchung der weiteren Mutanten konnten durch *IMP*^{T308A} und *IMP*^{S574A} zwei Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, deren Inaktivierung einen im Vergleich zu Wildtyp-*IMP* statistisch signifikant stärkeren regulatorischen Einfluss auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* hatte. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die durch *IMP* reduzierte Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* über posttranskriptionale Modifikationen, speziell über Phosphorylierungen, reguliert wird.

Im Westernblot konnte abschließend gezeigt werden, dass das unterschiedliche Verhalten der Mutanten im Luciferase-Assay nicht auf Unterschiede in der Transfektionseffizienz der verwendeten Mutanten zurückzuführen ist, weil vergleichbare Überexpressionsniveaus für Wildtyp-*IMP* und die Mutanten *IMP*^{T308A}, *IMP*^{S574A} und *IMP*^{C264A} gezeigt werden konnten.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1 Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren

Im Vorfeld der Arbeit konnten mittels Massenspektrometrie für *IMP* zehn Peptide, die potentielle Phosphorylierungsstellen enthielten, identifiziert werden. Die identifizierten Phosphorylierungen sind über das gesamte Protein verteilt. Auffällig ist jedoch, dass sich im Bereich der hochkonservierten Ring-Domäne, der Zink-Finger-Domäne und der coiled-coil-Domäne keine der potentiellen Phosphorylierungsstellen befinden (Siehe Abb. 3.1.3 Steite: 71). Bei Peptiden mit mehr als einer potentiell phosphorylierbaren Aminosäure wurde auf der Basis der Sequenzierung die Aminosäure mit der größten Wahrscheinlichkeit für eine erfolgten Phosphorylierung mittels eines Algorithmus (MASCOT-Programm) berechnet. Darüber hinaus wurde die Untersuchung des evolutionären Konservierungsgrades der Aminosäuresequenz (engl.: *multiple sequence alignment*) von *IMP* unter anderem

dazu verwendet, eine weitere Eingrenzung der potentiellen Phosphorylierungsstellen vorzunehmen. Anhand dieser Auswahl wurde in der nachfolgenden Mutagenese (siehe Methoden 2.2.1 Seite: 41) eine posttranskriptionale Modifikation der potentiellen Phosphorylierungsstellen unmöglich gemacht. Es ist daher durchaus denkbar, dass weitere Phosphorylierungsstellen existieren, die von uns bisher nicht untersucht worden sind. An der Position S574 ist die evolutionäre Konservierung nicht in gleicher Weise ausgeprägt wie an den darüber hinaus untersuchten potentiellen Phosphorylierungsstellen (siehe Abb. 3.1.1 Seite: 66). Die nachgewiesene Reduktion der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* durch *IMP*^{S574A} lässt daher Zweifel daran aufkommen, ob der Konservierungsgrad als hinreichendes Kriterium zur Vorauswahl der Punktmutationen Verwendung finden darf. Daher ist ggf. darüber nachzudenken, auch die weiteren noch nicht untersuchten potentiell phosphorylierbaren Aminosäuren, die sich innerhalb der mittels Massenspektrometrie als phosphoryliert identifizierten Peptide von *IMP* befinden, durch Mutation zu verändern und diese im Luciferase-Assay zu untersuchen.

4.2.2 Mutagenese

Damit an den potentiellen Phosphorylierungsstellen die Bindung einer Phosphatgruppe bzw. die Ubiquitinylierung an der Position C264 ausgeschlossen werden konnte, musste die DNS – Sequenz so verändert werden, dass das entsprechende Basentriplet für eine Aminosäure codierte, die in ihrem spezifischen Rest keine OH – Gruppe bzw. S – Gruppe enthielt. Darüber hinaus sollte die alternativ verwendete Aminosäure möglichst wenig weitere Veränderungen in Struktur und Eigenschaft des Proteins bewirken. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden im Rahmen der Mutagenese die gewünschten Aminosäuren gezielt durch Alanin ersetzt. Bei einem Vergleich der Restgruppen der ersetzten Aminosäuren ergibt sich für die Mutanten, bei denen die Aminosäure Serin in der Primärstruktur von *IMP* ersetzt werden sollte, kaum eine Alternative zu Alanin. Alanin und Serin unterscheiden sich lediglich durch die für eine Phosphorylierung notwendige Hydroxygruppe. Im Falle von Threonin hätte auch eine Mutation in die Aminosäure Valin, die wie Alanin zu der Gruppe der aliphatischen Aminosäuren gehört, alternativ durchgeführt werden können. Bei den Mutationen mit dem Ziel, die Aminosäure Tyrosin aus der Primärstruktur zu ersetzen, wäre Phenylalanin statt Alanin möglicherweise eine gute Alternative gewesen, weil dadurch der aromatische Ring im spezifischen Rest hätte erhalten werden können. Im Rahmen des Luciferase-Assays konnten jedoch trotz dieser unter Umständen gravierenden Veränderung keine statistisch signifikanten

Unterschiede für diese Mutationen im Vergleich zu Wildtyp-*IMP* bezüglich des Einflusses auf die *RAF*/*MEK*-Interaktion festgestellt werden. Deshalb wurde auf die Herstellung und Untersuchung weiterer Mutanten verzichtet.

Um insbesondere vor dem Abbruch einer Sequenzierung auftretende Ungenauigkeiten und daraus resultierende Fehler zu minimieren, wurde die Sequenzierung ggf. mehrfach vom 5‘ Ende, vom 3‘ Ende sowie von der Mitte des *IMP*-Gens ausgehend nach antegrad und retrograd (antegrad in Abb. 3.1.3 S. 71 dargestellt) durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind hinsichtlich des Mutationserfolges eindeutig.

4.2.3 *Mammalian Two-Hybrid*

Die Experimente wurden mit höchstmöglicher Sorgfalt gemacht, jedoch ergaben sich gerade bei der Durchführung des komplexen Luciferase–Assays verschiedene Fehlerquellen, die trotz der Bemühung, so exakt wie möglich zu arbeiten, nicht vollständig ausgeschaltet werden konnten.

Zunächst war die exakte Bestimmung der DNS-Vektor-Konzentration im Transfektionsansatz von Bedeutung, um vergleichbare Überexpressionsniveaus erreichen zu können. Hierzu wurde der DNS-Gehalt der zuvor gereinigten Proben photometrisch bestimmt. Schwankungen bei der Doppelbestimmung einer Probe bis zu 10% mussten toleriert werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Ergebnisse abhängig waren von einer möglichst exakten Bestimmung des DNS-Gehaltes, ließen sich kleine Unterschiede im gemessenen Interaktionsverhalten nicht sicher identifizieren. Im Western Blot konnten jedoch vergleichbare Überexpressionsniveaus nachgewiesen werden, so dass die anhand des *Mammalian Two-Hybrid Assay* gewonnen Ergebnisse nicht auf unterschiedliche Überexpressionsniveau zurückzuführen sein dürften (siehe Ergebnisse 3.3 Seite: 85).

Darüber hinaus sind die einzelnen Versuche ohne eine weitere Normalisierung untereinander nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz, der Überlebensfähigkeit der Zellen und der Zell-Lyse-Effizienz innerhalb eines Versuchs ausgleichen zu können, wurde neben der Firefly-Luciferase die Aktivität der konstitutiv exprimierten und auf dem Reporter-Vektor kodierten Renilla-Luciferase gemessen. Diese wurde zur Normalisierung des Firefly-Signals verwendet. Dennoch zeigten sich bei vergleichender Betrachtung der einzelnen Versuche, insbesondere bei den Untersuchungen unter dem Einfluss von RAS^{V12}, zum Teil erhebliche Schwankungen des auf das Renilla-Signal normalisierte

Firefly-Lumineszenz-Signals. Möglicherweise spielt der Anteil an Transfektionsreagenz in diesem Zusammenhang eine Rolle. Um geringe Unterschiede an Transfektionsreagenz in den einzelnen Proben zu vermeiden, wird von Seiten des Herstellers auf die Verwendung eines Mastermixes ausdrücklich hingewiesen. Der Anteil an Transfektionsreagenz ist daher innerhalb eines Versuches soweit wie möglich identisch, wird sich aber zwangsläufig entsprechend geringfügiger Unterschiede in der Pipettiergenauigkeit in den Folgeversuchen minimal unterscheiden.

Daher wurden alle Messwerte eines Versuchs auf den Mittelwert der basal bzw. unter *IMP*-Einfluss bestimmten Messwerte desselben Versuchs normalisiert. Bei zum Teil größeren Differenzen der RLUs fanden sich regelmäßig nur geringe Unterschiede bei den dadurch normalisierten Messwerten. Um dennoch auch geringe Unterschiede sicher herausarbeiten zu können, erscheint eine Überprüfung der Ergebnisse durch andere Methoden notwendig.

4.2.4 Western Blot

Mit Hilfe der Untersuchung der Expressionsniveaus im Western Blot sollten ggf. vorhandene Unterschiede im Expressionsverhalten der Vektoren *IMP*, IMP^{C264A}, IMP^{T308A} und IMP^{S574A} gezeigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Vektoren hinsichtlich ihres Expressionsniveaus vergleichbar sind. Um eine im Westernblot nachweisbare Menge an Protein zu erhalten, musste jedoch das Volumen der Transfektionsansätze entsprechend vergrößert werden. Auch wurde auf eine gleichzeitige Transfektion der im Mastermix enthaltenen Vektoren verzichtet, weil der einzige Unterschied der Proben innerhalb eines Versuches des Luciferase-Assays in der Transfektion von *IMP* bzw. der jeweiligen Mutante bestand. Ein Einfluss des in allen Proben eines Versuchs zu gleichen Teilen enthaltenen Mastermixes auf das Expressionsniveau wurde daher von uns nicht angenommen.

4.3. Fragestellungen und Bewertung der Ergebnisse

4.3.1 Gibt es Unterschiede hinsichtlich des Einflusses von *IMP* auf die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* im Vergleich zu dem Einfluss von *IMP* auf die Interaktion zwischen c-*RAF* und *MEK*?

Wir konnten zeigen, dass sowohl die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* als auch die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* durch *IMP* reduziert werden kann. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Einzelversuche zu erzielen, wurden alle Messwerte (RLU) eines Versuchs jeweils auf den Mittelwert der Messwerte normalisiert, anhand derer die basale Interaktion zwischen B-*RAF* bzw. c-*RAF*^{BXB} und *MEK* bestimmt wurde. Dieser Quotient, der die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* bzw. B-*RAF* und *MEK* beschreibt, wurde gleich 100% gesetzt. *IMP* konnte dabei, über die gesamte Versuchsreihe (N=6) betrachtet, das Luciferase-Signal bei der Untersuchung der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* um 22,4 % verringern (siehe Abb. 3.2.1 Seite: 74). Die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* wurde um 25,6 % reduziert (siehe Abb. 3.2.1 Seite 74). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der inhibitorischen Funktion von *IMP* auf die beiden genannten Interaktionswege konnte von uns nicht festgestellt werden (siehe Ergebnisse 3.2.1 Seite: 72). Dieses Ergebnis legt einen vergleichbaren, evtl. sogar denselben Inhibitions-Mechanismus von *IMP* innerhalb der ERK1/2-Kaskade nahe.

Die Betrachtung der RLUs ohne Normalisierung (siehe Anhang 6.1 Seite: 97) deckte jedoch Unterschiede in der Signalintensität zwischen der Interaktion von B-*RAF* und *MEK* und der Interaktion von c-*RAF*^{BXB} und *MEK* auf. Die Bildung funktioneller *RAF*/*MEK*-Komplexe erfordert die Expression des „Ankerproteins" *KSR-1* (Claperon et al., 2007, Morrison, 2001). Zum einen kann eine *MEK*-Aktivierung über c-*RAF* erfolgen. *KSR-1*-vermittelt kann hier die c-*RAF*-Kinase-Aktivität über eine Heterooligomerisation von c-*RAF* mit B-*RAF* gesteigert werden, woraus eine vermehrte *MEK*-Aktivierung resultiert. Dies erfolgt unabhängig von der B-*RAF*-Kinase-Aktivität (Chen C et al., 2008). Zum anderen kann eine *MEK*-Aktivierung auch über B-*RAF* erfolgen. Durch die Homooligomerisation von *KSR* kann B-*RAF* an *MEK* gebunden werden und über seine Kinase-Aktivität zu einer *MEK*-Aktivierung führen (Chen C et al., 2008). Die gewonnen Ergebnisse könnten Ausdruck dieser unterschiedlichen Wege der *MEK*-Aktivierung sein (siehe Abb. 1.6 Seite: 26).

Beim Vergleich der Sequenzierungen des pACT-BXB Vektors und des pACT-B-*RAF* Vektors ergab sich zwischen dem c-*RAF*^{BXB} und dem VP16 Gen bei erhaltenem Leseraster ein längerer Abstand (>100AS/>300bp) als zwischen dem B-*RAF* und VP16 Gen. Der unterschiedliche Abstand findet sich auch in der Primärstruktur des Fusionskonstruktes wieder, und er könnte für die unterschiedliche Signalintensität

mitverantwortlich sein. Um Unterschiede in der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* und der Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* anhand der RLUs besser charakterisieren zu können, müssten der Abstand und die Sequenz zwischen den Genen in beiden Vektoren identisch sein.

4.3.2 Unterscheidet sich eine nicht ubiquitinylierbare *IMP*-Mutante von Wildtyp-*IMP* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen *RAF* und *MEK* im Luciferase-Assay?

Matheny et al. konnten 2004 zeigen, dass aktiviertes *RAS* in der Lage ist, den intrazellulären *IMP*-Gehalt durch Induktion einer Ubiquitinylierung zu beeinflussen. Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Stimulation der *RAS*-Aktivität in Kardiomyozyten zu einer Verringerung der detektierbaren *IMP*-Proteinmenge führt, entsprechend dem publizierten Mechanismus einer *RAS*-abhängig induzierten Autoubiquitinylierung und Degradation von *IMP*. Im Rahmen der Arbeit sollte dieser Mechanismus auch anhand des Luciferase-Assays nachvollzogen werden. Wir konnten nachweisen, dass die nicht ubiquitinylierbare Mutante im Gegensatz zu Wildtyp-*IMP* in der Lage ist, unter dem Einfluss von aktiviertem *RAS* (*RAS*^{V12}) die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* statistisch signifikant zu reduzieren. Dabei verhielten sich Mutante und Wildtyp-*IMP* statistisch signifikant unterschiedlich zu einander. Ohne eine Stimulation durch *RAS*^{V12} konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-*IMP* und *IMP*^{C264A} festgestellt werden. Beide waren in der Lage, die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* statistisch signifikant zu hemmen. Wir konnten also den beschriebenen regulatorischen Einfluss der Ubiquitinylisierungsstelle von *IMP* (Matheny et al., 2004) durch den Luciferase-Assay bestätigen und so dieses Assay-System für weitere Fragestellungen etablieren. Hier stellt sich die Frage, inwieweit die Ubiquitinylierung gleichbedeutend ist mit einer vollständigen Inaktivierung des Proteins auch schon vor dem dadurch vermittelten Abbau. Ggf. wären dann hohe Spiegel des Proteins nicht gleichzusetzen mit einer hohen Aktivität von *IMP*.

4.3.3 Gibt es Phosphorylierungsstellen der E3-Ubiquitin-Ligase *IMP*, die in der Lage sind, die Aktivität zu beeinflussen, mit der *IMP* die Signalfortleitung innerhalb der ERK1/2-Kaskade hemmt?

Mit Hilfe des *CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System* und des *Dual-Luciferase*

Reporter Assay System konnten wir zwei *IMP*-Phosphorylierungsstellen identifizieren, die für die Regulation der ERK1/2-Kaskade relevant sind. Die Mutanten *IMP*^{T308A} und *IMP*^{S574A} verhielten sich im Luciferase-Assay statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Wildtyp-*IMP*. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass *IMP* posttranskriptional über Phosphorylierungen reguliert wird. Eine Phosphorylierung von *IMP*^{T308A} und *IMP*^{S574A} wurde in dem durch Mutation veränderten Bereich unmöglich gemacht. Beide Mutanten hemmten jedoch die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* statistisch signifikant stärker als dies für Wildtyp-*IMP* gezeigt werden konnte. Das Ergebnis deutet daraufhin, dass die Aktivität, mit der *IMP* die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* hemmt, über eine Phosphorylierung an der Position T308 sowie an der Position S574 verringert werden kann. Wir gehen deshalb davon aus, dass *IMP* im Hinblick auf die Beeinflussung der ERK1/2-Kaskade in phosphorylierter Form inaktiv ist.

4.4. Perspektiven

Die ERK1/2-Kaskade ist in einer Vielzahl von Organsystemen von großer Bedeutung für die Zell-Proliferation, die Zell-Differenzierung, die Zell-Migration, die Zellteilung und für den Zelltod (Lewis et al., 1998; Schaeffer and Weber 1999) und sie stellt auch im Rahmen von kardiologisch orientierten Fragestellungen wegen ihrer zentralen Bedeutung für die Entstehung der Herzhypertrophie (Heineke and Molkentin, 2006) einen wichtigen Signalweg dar. Innerhalb des komplexeren Netzwerkes dieser Signalkaskade könnte die E3-Ubiquitin-Ligase *IMP* ein entscheidender Regulator sein (Matheny et al., 2004). In dieser Arbeit konnten erste Erkenntnisse über die Auswirkungen von posttranskriptionalen Modifikationen von *IMP* auf die ERK1/2-Kaskade gewonnen werden. Dabei erfolgten die bisherigen Experimente bisher nur in COS-7-Zellen. Eine primäre Untersuchung in Kardiomyozyten mittels konventioneller Methoden der transienten Transfektion, wie etwa der Lipofektion, hätte lediglich zu einer geringen Anzahl transfizierter Zellen geführt und ggf. bei den weiterführenden Untersuchungen keine aussagekräftigen Ergebnisse ermöglicht. Es wäre daher interessant zu überprüfen, inwieweit die identifizierten Phosphorylierungsstellen auch in anderen Zellen, insbesondere in Kardiomyozyten, von biologischer Relevanz sind. Es ist durchaus möglich, dass man hier je nach Zelltyp Unterschiede feststellen kann, zumal auch die für die Phosphorylierung an den Stellen T308 und S574 verantwortlichen Kinasen noch nicht identifiziert sind. Mit dem Programm NetPhosK 1.0 wurde für die Position T308 die p38-Kinase vorgeschlagen und mit dem Programm Phosida ergaben sich für die Position S574 Hinweise auf die *cell kinase* 1 (CK1) und die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) (siehe Anhang 5.2

Seite: 98). Auch die durch kardiale Überexpression von *IMP* induzierte erhöhte p38-Kinase-Aktivität (Grebe, 2008) weist auf eine mögliche regulatorische Funktion der p38-Kinase hin. Über die Aktivierung der p38-Kinase kann die basale Kontraktilität von Kardiomyozyten reduziert werden (Liao P et al., 2002).

Diese Vorhersagen sind jedoch noch mit großer Vorsicht zu bewerten. Daher ist unser nächstes Ziel, die gewonnen Ergebnisse an Kardiomyozyten mittels adenoviraler Transduktion (Meyer and Dillmann, 1998) nachzuvollziehen und die für die Position T308 und S574 verantwortlichen Kinasen zu identifizieren, um die übergeordneten Regulationsmechanismen von *IMP* besser verstehen zu können.

Bisher erfolgte die Untersuchung der Mutanten lediglich im Rahmen der ERK1/2-Kaskade und zwar speziell über die Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK*. Eine erste Untersuchung (N=1) des Einflusses der Mutanten auf die Interaktion zwischen c-*RAF*^{BXB} und *MEK* erbrachte bisher keine Unterschiede im Vergleich zu der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* (siehe Anhang 6.3 Seite: 100). Hier sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können.

Darüber hinaus wäre eine Untersuchung posttranskriptionaler Modifikationen von *IMP* auch im Hinblick auf einen regulatorischen Einfluss der „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“ (NF-κB) abhängigen und mit Entzündung assoziierten Signalkaskade interessant, zumal gezeigt werden konnte, dass unterschiedliche Expressionsniveaus von *IMP* in der Lage sind, die Expression von Genen dieses Signalweges zu beeinflussen. So konnte in HCAEC-Zellen nachgewiesen werden, dass die Expression von *IMP* mittels siRNA zu einer Hemmung der Aktivierung von NF-κB führte (Ozaki et al., 2009). Dabei wurde die Translokation von NF-κB in den Zellkern und nicht die intrazelluläre Konzentration beeinflusst (Liao Y et al., 2011). Auch konnte für *IMP* eine Interaktion mit zwei Mitgliedern der „*inhibitor of κB* (*IκB*)“-Familie, *IκB*β und *IKBβ*, nachgewiesen werden. Aktuell wird davon ausgegangen, dass der im *IMP*-Gen beschriebene *SNP* rs11066001 (Intron 3, 270 A>G), der als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Myokardinfarktes beschrieben worden ist, über eine erhöhte Expression von *IMP* mit einer Hemmung der NF-κB-Signalkaskade assoziiert ist (Ozaki et al., 2009).

Auch wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit eine Kombination der einzelnen Mutationen sich möglicherweise unterschiedlich zu den einzelnen bisher untersuchten Mutanten verhält. Die Herstellung weiterer Mehrfach-Mutanten und deren Untersuchung ist daher ebenfalls ein zukünftiges Projekt.

5. Zusammenfassung

Die ERK1/2-Kaskade reguliert entscheidende zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Zellteilung und Apoptose und ihr wird eine wesentliche Rolle bei der kardialen Signaltransduktion zugesprochen. In Vorarbeiten konnte die Bedeutung von *impedes mitogenic signal propagation* (*IMP*) im Hinblick auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie und eines Myokardinfarktes gezeigt werden. Für *IMP* konnte eine *RAS*-abhängige Hemmung der Signaltransduktion von c-*RAF* zu *MEK* nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung posttranskriptionaler Veränderungen von *IMP* in COS-7-Zellen untersucht. Grundlage für die Untersuchungen stellte die *IMP* vermittelte Inhibition der ERK1/2-Kaskade auf Höhe der MAPK(K) dar, die anhand der Interaktion zwischen B-*RAF* und *MEK* bzw. anhand der Interaktion zwischen konstitutiv aktivem c-RAF^{BXB} und *MEK* im *Mammalia Two-Hybrid System* charakterisiert wurde. Dabei konnte für *IMP* eine vergleichbare Hemmung für die c-RAF^{BXB} als auch für die B-*RAF* abhängige *MEK*-Aktivierung nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Wildtyp-*IMP* war bei der Untersuchung der nicht ubiquitinierbaren Mutante IMP^{C264A} in mittels RAS^{V12} stimulierten COS-7-Zellen der regulatorische Einfluss von *IMP* erhalten. Dies stimmt mit dem publizierten Mechanismus einer *RAS*-abhängig induzierten Autoubiquitinylierung und Degradation von *IMP* überein (Matheny et al., 2004).

Für die Untersuchung der potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden nicht phosphorylierbare Mutanten erstellt und im Luciferase-Assay charakterisiert. Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von *IMP* auf die ERK1/2-Kaskade über Phosphorylierungen an den Positionen T308 und S574 reguliert wird.

6. Anhang

6.1 Relativ Light Units zu 3.2.3

	Basal (B-*RAF*/*MEK*)	*IMP* (B-*RAF*/*MEK*)	Basal (c-*RAF*^{BXB}/*MEK*)	*IMP* (c-*RAF*^{BXB}/*MEK*)
N1	1,4529268	1,20044893	0,02689832	0,01469531
	0,92379631	1,11313702	0,02095929	0,01680278
	1,50589221	0,97276505	0,02340974	0,01628213
Mittelwert	1,29420511	1,09545033	0,02375578	0,01592674
N2	1,18488	0,75376596	0,01735623	0,01909452
	1,10758332	0,60538747	0,02085427	0,01380809
	1,18590131	0,48626513	0,01802675	0,01766759
Mittelwert	1,15945488	0,61513952	0,01874575	0,01685673
N3	1,31658241	0,92378956	0,01655869	0,00968922
	1,46813579	1,30457372	0,00998635	0,00809158
	1,36461384	1,07891346	0,01113025	0,00670371
Mittelwert	1,38311068	1,10242558	0,01255843	0,0081615
N4	1,7223043	1,14237362	0,01327258	0,00747268
	1,58908174	1,05178596	0,01348024	0,00529357
	1,246362	1,13000171	0,01035071	0,00834963
Mittelwert	1,51924935	1,10805376	0,01236785	0,00703863
N5	1,38430424	1,10130032	0,01706009	0,01533837
	1,54636526	0,98798467	0,01890274	0,01076042
	1,0059016	1,36275491	0,02123221	0,01649456
Mittelwert	1,31219037	1,15067997	0,01906501	0,01419779
N6	1,38317846	1,15093534	0,01213779	0,01234197
	1,32064949	1,14531673	0,00869917	0,00541652
	1,46268165	1,25498711	0,00698746	0,00959212
Mittelwert	1,38883653	1,18374639	0,00927481	0,00911687

Tab. 6.1.1 Gemessene RLU in COS-7-Zelllysaten in Abhängigkeit der Expression von IMP

6.2 Auswertung durch Phosida und NetPhosK 1.0

NetPhosK 1.0 Server - prediction results
Technical University of Denmark
(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq1 **S94; T99**
KRSSEASPTAQRS

Site Kinase Score

S-3 PKG 0.50
S-4 PKC 0.53
S-4 PKA 0.78
S-4 cdc2 0.51
S-7 p38MAPK 0.52
S-7 GSK3 0.50
S-7 *CDK*5 0.61
S-13 PKG 0.51

Highest Score: **0.78 PKA at position 4**

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq2 **S117; S119**
KECINAAPDSPSKQ

Site Kinase Score

S-10 GSK3 0.52
S-10 *CDK*5 0.50

Highest Score: 0.52 **GSK3 at position 10**

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq3 **Y218; T220**
RAQADADSFYMTCNGRQ

Site Kinase Score

S-8 cdc2 0.50
Y-10 EGFR 0.55

Highest Score: 0.55 **EGFR at position 10**

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq4 S252
KSEDGASLPVMDLTELPKC
Site Kinase Score

Highest Score: no score above threshold (0.500000)
Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq5 **T308**
RYCQTPEPVEENKC

Site Kinase Score

T-5 p38MAPK 0.60

Highest Score: 0.60 **p38MAPK** at position 5

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq6 **S380**

Phosida:
UNSPECIFIED
S32 CK2 (S/T-X-X-E)
T40 Aurora (R/K-X-S/T-I/L/V)
S43 CK1 (S/T-X-X-X-S)
S52 CK2 (S/T-X-X-E)
T70 CAMK2 (R-X-X-S/T)
T86 CK2 (S/T-X-X-E)
T87 CK2 (S/T-X-X-E) Aurora (R/K-X-S/T-I/L/V) NEK6 (L-X-X-S/T)
S93 PKA (R-X-S/T) GSK3 (S-X-X-X-S)
S94 PKA (R-R/K-X-S/T) CAMK2 (R-X-X-S/T)
S97 CK1 (S-X-X-S/T, S/T-X-X-X-S)
S103 CK1 (S/T-X-X-X-S) GSK3 (S-X-X-X-S)
S107 CK1 (S/T-X-X-X-S)
S117 *CDK*2 (S/T-P-X-K/R) ERK (P-X-S/T-P) *CDK*1 (S/T-P-X-K/R)
S130 CK1 (S-X-X-S/T) GSK3 (S-X-X-X-S)
S134 CK1 (S/T-X-X-X-S)
T147 NEK6 (L-X-X-S/T)
S152 CK2 (S/T-X-X-E)
S160 PKA (R-X-S/T)
S197 PKA (R-X-S/T)
T198 CAMK2 (R-X-X-S/T) PKD (L/V/I-X-R/K-X-X-S/T) CHK1 (M/I/L/V-X-R/K-X-X-S/T)
Y202 ALK (Y-X-X-I/L/V/M)
T265 Aurora (R/K-X-S/T-I/L/V)
S274 PLK1 (E/D-X-S/T-F/L/I/Y/W/V/M)
S289 CK1 (S-X-X-S/T) DNA damage response kinase (S/T-Q)
S342 CAMK2 (R-X-X-S/T)
T352 DNA damage response kinase (S/T-Q)
Y373 EGFR (D/P/S/A/E/N-X-Y-V/L/D/E/I/N/P)
S380 NEK6 (L-X-X-S/T)
T395 CK2 (S/T-X-X-E)
Y408 ALK (Y-X-X-I/L/V/M)
S409 PLK1 (E/D-X-S/T-F/L/I/Y/W/V/M) NEK6 (L-X-X-S/T)
Y410 SRC (E/D-X-X-Y-X-X-D/E/A/G/S/T)
S414 CK2 (S/T-X-X-E) GSK3 (S-X-X-X-S) NEK6 (L-X-X-S/T) DNA damage response kinase (S/T-Q)
S418 CK1 (S/T-X-X-X-S) DNA damage response kinase (S/T-Q)
T434 CK2 (S/T-X-X-E)
T448 Aurora (R/K-X-S/T-I/L/V)
S468 Aurora (R/K-X-S/T-I/L/V)
T474 PKA (R-R/K-X-S/T) CAMK2 (R-X-X-S/T) PKD (L/V/I-X-R/K-X-X-S/T) CHK1 (M/I/L/V-X-R/K-X-X-S/T) DNA damage response kinase (S/T-Q)
T518 NEK6 (L-X-X-S/T)
T527 NEK6 (L-X-X-S/T)
T542 DNA damage response kinase (S/T-Q)
T553 CK2 (S/T-X-X-E)
S570 GSK3 (S-X-X-X-S)
S571 CK1 (S-X-X-S/T) GSK3 (S-X-X-X-S)
S574 CK1 (S-X-X-S/T, S/T-X-X-X-S) GSK3 (S-X-X-X-S)
S575 CK1 (S/T-X-X-X-S)
S578 CK1 (S-X-X-S/T, S/T-X-X-X-S)

RLVASKTDGKI

Site Kinase Score

T-7 PKC 0.57

Highest Score: 0.57 **PKC at position 7**

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq7 **T395**
KIVQYECEGDTCQEEKI

Site Kinase Score

T-11 CKII 0.66

Highest Score: 0.66 **CKII at position 11**

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq8 **Y408; S409**
KIDALQLEYSYLLTSQLESQRI
Site Kinase Score

S-10 cdc2 0.54
T-14 PKC 0.52
S-15 ATM 0.51
S-15 cdc2 0.57
S-19 DNAPK 0.50
S-19 ATM 0.58
S-19 PKC 0.68

Highest Score: 0.68 **PKC** at position 19

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq9 **Y539**
RDVMFYLETQQKI
Site Kinase Score

Y-6 EGFR 0.50
T-9 PKC 0.72

Highest Score: 0.72 **PKC** at position 9

Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: >Seq10 **S574; S575; S578;S583**
RQEIQEGQINIAMASASSPASSGG**S**GKLPSRKG

Site Kinase Score

S-15 cdc2 0.51
S-17 PKC 0.73
S-18 CKI 0.56
S-18 p38MAPK 0.54
S-18 GSK3 0.51
S-18 *CDK*5 0.59
S-21 CKI 0.59
S-21 PKC 0.59
S-25 PKC 0.86
S-30 PKC 0.72

Highest Score: 0.86 **PKC** at position 25

6.3 Untersuchung der Phosphorylierungsmutanten anhand der c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion

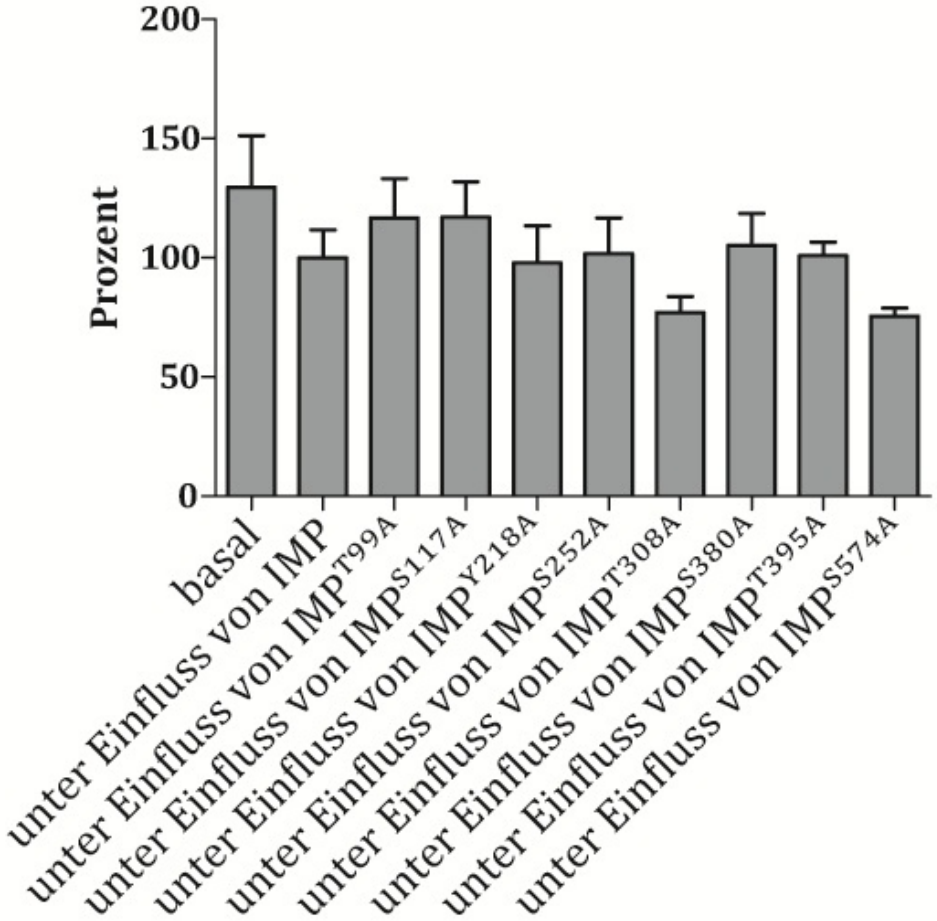


Abb. 6.3. 1 Untersuchung des Einflusses der erstellten Mutationen von *IMP* auf die c-*RAF*^{BXB}/*MEK*-Interaktion
Es wurde die Höhe der interaktions-spezifischen Lichtemissionen bestimmt. Verglichen mit der Lichtemission unter basalen Bedingungen (basal) war die interaktionsspezifische Luciferase-Aktivität in darüber hinaus mit *IMP* transfizierten Zelllysaten (*IMP*) bzw. in darüber hinaus mit den Mutanten transfizierten Zelllysaten (*IMP*^{T99A}… *IMP*^{S574A}) reduziert. Der Versuch wurde bisher ein Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

7. Literaturverzeichnis

Alessi D, Cohen P (1998): Mechanism of activation and function of protein kinase B. Curr Opin Genet Dev **8**, 55

Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Seiichi S, Yuo A, Suzuki H, Mizutani S (2004): BRAP2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. Mol Cell Biol **24**, 8236-8243

Avruch J, Khoklatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang X (2001): RAS activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. Recent Prog Horm Res **56**, 127–155

Barbacid M (1987): Ras genes. Annu Rev Biochem **56**, 779-827

Birnboim H, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmide DNA. Nucleic Acids Res **7**, 1513-1519

Bottazzi M, Zhu X, Böhmer R, Assoian R (1999): Regulation of p21cip1 expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. J Cell Biol **146**, 1255-1264

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

Bueno O, De Windt L, Tymitz K, Witt S, Kimball T, Klevitsky R, Hewett T, Jones S, Lefer D, Peng C, et al., (2000): The MEK-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. EMBO J **19**, 6341-6350

Bumeister R, Rosse C, Anselmo A, Camonis J, White M (2004): CNK2 couples NGF signal propagation to multiple regulatory cascades driving cell differentiation. Curr Biol **14**, 439-445

Cai J, Yi F, Bian Z, Shen D, Yang L, Yan L, Tang Q, Yang X, Li H (2009): Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1/2 signalling pathway. J Cell Mol Med **13,** 909-925

Chen C, Lewis R, White M (2008): IMP modulates KSR-*1*-dependent multivalent complex formation to specify ERK1/2 pathway activation and response Thresholds. J Biol Chem **9**, 12789-12796

Chen J, Fujii K, Zhang L, Roberts T, Fu H (2001): Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK–ERK independent mechanism. Proc Natl Acad Sci USA **98**, 7783–7788

Cheng M, Olivier P, Diehl J, Fero M, Roussel M, Roberts J, Sherr C (1999): The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. EMBO J **6**,1571-83

Clapéron A, Therrien M (2007): KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. Oncogene **26**, 3143-3158

Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Berdel W, Böhm M, Schmiegel W: Innere Medizin. 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2004

DeSilva D, Jones E, Favata M, Jaffee B, Magolda R, Trzaskos J, Scherle P (1998): Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. J Immunol **160**, 4175-4181

Dower W, Miller J, Ragsdale C (1988): High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res **16**, 6127-6145

Downward J (1996): Control of Ras activation. Cancer Surv **27**, 87-100

Erdmann E: Klinische Kardiologie. 8. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2011

Erhardt P, Schremser E, Cooper G (1999): B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrom c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. Mol Cell Biol **19**, 5308-5315

Esteban L, Vicario-Abejon C, Fernandez-Salgzero P, Fernandez-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, Mc Kay R, Ward J, Pellicar A et al., (2001): Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. Mol Cell Biol **21**, 1444-1452

Frödin M, Gammeltoft S (1999): Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Mol Cell Endocrinol **151**, 65-77

Fueller J, Becker M, Sienerth A, Fischer A, Hotz C, Galmiche A (2008): c-RAF activation promotes BAD poly-ubiquitylation and turn-over by the proteasome. Biochem Biophys Res Commun **370**, 552-556

Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, Kong F, Shi H, Zhao L (2009): Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. Cancer Sci **100**, 389-395

Garnett M, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R (2005): Wild-type and mutant B-Raf activate c-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. Mol Cell **20**, 963-969

Garrington T, Johnson G (1999): Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr Opin Cell Biol **11**, 211-218

Gijon MA, Leslie CC (1999): Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. J Leukoc Biol, **65**, 330-336

Grebe C (2008): Die Bedeutung von BRCA1-assoziiertem Protein in der Entwicklung der last-induzierten Myokardhypertrophie. Rer. nat. Diss. Göttingen

Grund K, Ahmadi R, Jung F, Funke V, Gdynia G, Benner A, Sykora J, Walczak H, Joos S, Felsberg J et al., (2008): Troglitazone-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis is regulated by proteasome-dependent degradation of FLIP and ERK1/2-dependent phosphorylation of BAD. Cancer Biol Ther **7**, 1982-90

Heineke J, Molkentin J (2006): Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. Nat Rev Mol Cell Biol **7**, 589-600

Hipskind R, Bilbe G (1998): MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. Front Biosci **3**, 804-816

Hunter J, Tanaka N, Rockmann H, Ross J, Chien K (1995): Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. J Biol Chem **270**, 23173–23178

Hunter T, Pines J (1994): Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell **79**, 573-582

Hüser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun X, Brown J, Marais R, Pritchard C (2001): MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. EMBO J **20**, 1940-1951

Jin S, Zhuo Y, Guo W, Field J (2005): P21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent

phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD und Bcl-2 association. J Biol Chem **280**, 24698-24705

Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson R, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R et al., (1997): K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. Genes Dev **11**, 2468-2481

Kannel W, Cupples A (1988): Epidemiology and risk profile of cardiac failure. Cardiovasc Drugs Ther **1**, 387-395

Koera K; Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M (1997): K-ras is essential for the development of the mouse embryo. Oncogene **15**, 1151-1159

Kolch W (2005): Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. Nature Rev **6**, 827-837

Kortum R, Lewis R (2004): The molecular scaffold KSR-*1* regulates the proliferative and oncogenic potential of cells. Mol Cell Biol **24**, 4407-4416

La-Baer J, Garrett M, Stevenson L, Slingerland J, Sandhu C, Chou H, Fattaey A, Harlow E (1997): New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. Genes Dev, **11**, 847–862

Lämmli U (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685

Leon J, Guerrero I, Pellicer A (1987): Differential expression of the ras gene family in mice. Mol Cell Biol **7**, 1535-1540.

Lewis T, Shapiro P, Ahn N (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res **74**, 49-139

Li S, Ku C, Farmer A, Cong Y, Chen C, Lee W (1998): Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs. J Biol Chem **273,** 6183-6189

Liang Q, Bueno O, Wilkins B, Kuan C, Xia Y, Molkentin J (2003): c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin–NFAT signaling. EMBO J **22**, 5079-5089

Liao P, Wang S, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang S, Cheng H, Wang Y, Xiao R (2002): P38 mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. Circ Res **90**, 190-196

Liao Y, Wang Y, Guo Y, Ozaki K, Tanaka T, Lin H, Chang M, Chen K, Yu M, Sheu S et al., (2011): BRAP Activates Inflammatory Cascades and Increases the Risk for Carotid Atherosclerosis. Mol Med **17**, 1065

Lorenz K, Schmitt J, Schmitteckert E, Lohse M (2009): A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. Nat Med **15**, 75-83

Marais R, Light Y, Paterson H, Mason C, Marshall C (1997): Differential regulation of Raf-1, A-Raf and B-Raf by oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. J Biol Chem **272,** 4378-4383

Marshall M (1995): Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. Mol Reprod Dev **42,** 493-499

Matheny S, White M (2009): Signaling threshold regulation by the Ras effector IMP. J Biol Chem **284**, 11007-110011

Matheny S, Chen C, Kortum R, Razidlo G, Lewis R, White M (2004): Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. Nature **427,** 256-260

McBride L, Caruthers M (1983): An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. Tetrahedron Lett **24**, 245–248

Meyer M, Dillmann W (1998): Sarcoplasmic reticulum Caq-ATPase overexpression byadenovirus mediated gene transfer and in transgenic mice. Cardiovasc Res **37**, 360 - 366

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

Molkentin J (2004): Calcineurin–NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. Cardiovasc Res **63,** 467-475

Morrison D (2001): KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?
J Cell Sci **114**, 1609-1612

Morrison D, Davis R (2003): Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. Annu Rev Cell Dev Biol **19**, 91-118

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA n vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51**, 263–273

Nguyen A, Burack R, Stock J, Kortum R, Chaika O, Afkarian M, Muller W, Murphy K, Morrison D, Lewis R et al., (2002): Kinase Suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. Mol Cell Biol **22**, 3035-3045

Nishida K, Yamaguchi O, Hirotani S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, Takeda T, Osuka S, Morita T, Kondoh G et al., (2004): P38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. Mol Cell Biol **24**, 10611-10620

Ohmachi M, Rocheleau C, Church D, Lambie E, Schedl T, Sundaram M (2002): C. elegans KSR-1 and KSR-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. Curr Biol **12**, 427-433

Ozaki K, Sato H, Inoue K, Tsunoda T, Sakata Y, Mizuno H, Lin T, Miyamoto Y, Aoki A, Onouchi Y et al., (2009): SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. Nat Genet. **41,** 329-333

Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard J, Meloche S, Poussegur J (1993): Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. Proc Natl Acad Sci USA **90**, 8319-8323

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev **22**, 153-183

Petrich B, Molkentin J, Wang Y (2003): Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. FASEB J **17**, 749-751

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002): Fidelity and spatio-temporal control

in MAP kinase (ERKs) signalling. Biochem Pharmacol **64,** 755-763

Pritchard C, Samuels M, Bosch E, McMahon M (1995): 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

Pritchard C, Bolin L, Slattery R, Murray R, Mc Mahon M (1996): 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

Pumiglia K, Decker S (1997): Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 448-452

Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrançois M, Sicheri F, Therrien M (2009): A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. Nature **24**, 461-542

Raman M, Chen W, Cobb M (2007): Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene **26,** 3100-3112

Remes J, Reunanen A, Aromaa A, Pyörälä K (1992): Incidence of heart failure in eastern Finland: a population-based surveillance study. Eur Heart J **13,** 588-593

Reyes-Turcu F, Horton J, Mullally J, Heroux A, Cheng X, Wilkinson K (2006): The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. Cell **124**, 1197-1208

Roberts R, Belfort M, Bestor T, Bhagwat A, Bickle T, Bitinaite J, Blumenthal R, Degtyarev S, Dryden D, Dybvig K (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. Nucleic Acids Res **31**, 1805-1812

Roovers K, Assoian R (2000): Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. Bio Essays **22**, 818-826

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988): GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. Nature **6**, 563-564

Sanna B, Bueno O, Dai Y, Wilkins B, Molkentin J (2005): Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. Mol Cell Biol **25**, 865-878

Schaeffer H, Weber M (1999): Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. Mol Cell Biol **19**, 2435-2444

Schott P, Singer S, Kögler H, Neddermeier D, Leineweber K, Brodde O, Regitz-Zagrosek V, Schmidt B, Dihazi H, Hasenfuss G (2005): Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteome. Proteomics **5**, 1372-1381

Sewing A, Wiseman B, Lloyd A, Land H (1997): High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. Mol Cell Biol **17**, 5588-5597

Sharrocks A (2001): The ETS-domain transcription factor family. Nat Rev Mol Cell Biol **2**, 827-837

Sherr C (1994): The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. Trends Cell Biol **1**, 15-18

Sherr C, Roberts J (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev **9**, 1149-1163

Smith M (1985): In vitro mutagenesis. Ann. Rev. Genet. **19**:423-462

Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provnazano M, Fujimoto E, Goeke N, OLSON B, Klank D (1985): Mesurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem **150**, 75-85

Sugden P, Clerk A (1998): Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. J Mol Med **76**, 725-746

Swift H (1937): A simple method for preserving bacterial cultures by freezing and drying. J Bacteriol **33**, 411-421

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001): Small GTP-binding proteins. Physiol Rev **81**, 153–208

Teijido O, Dejean L (2010): Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. FEBS Lett **584**, 3305-3310

Therrien M, Michaud N, Rubin G, Morrison D (1996): KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. Genes Dev **10**, 2684-2695

Thorburn A, Thorburn J, Chen S, Powers S, Shubeita H, Feramisco J, Chien K (1993): H-Ras dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. J Biol Chem **268:** 2244–2249

Vanhaesebroeck B, Alessi D (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. Biochem J **346**, 561–576

Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA **76**, 615-619

Wan PT, Garnett M, Roe S, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good V, Jones C, Marshall C, Springer C, Barford D, et al., (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf. Cell **116**, 855-867

Wang H, Rapp U, Reed J (1996): Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. Cell **87**, 629-638

Waring M (1965): The effects of antimicrobial agents on ribonucleic acid polymerase. Mol Pharmacol **1**, 1-13

Weber J, Hu W, Jefcoat S, Raben D, Baldassare J (1997a): Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27. J Biol Chem **272**, 32966-32971

Weber J, Raben D, Phillips P, Baldassare J (1997b): Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. Biochem J **326**, 61-68

Weinberg R (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell **81**, 323-330

White H, Norris R, Brown M, Brandt P, Whitlock R, Wild C (1987): Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. Circulation **76**, 44-51

Whitehurst A, Cobb M, White M (2004): Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways. Mol Cell Biol **24**, 10145-10150

Wojnowski L, Zimmer A, Beck T, Hahn H, Bernal R, Rapp U, Zimmer A (1997): Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. Nat Genet **16**, 214-215

Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotani S, Asahi M, Taniike M (2004): Cardiac-specific disruption of the c-Raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. J Clin Invest **114**, 937-943

Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y (1998): Signalling pathways for cardiac hypertrophy. Cell Signal **10**, 693-698

Zaccolo M, Gherardi E (1999): The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. J Mol Biol **285**, 775

Zaccolo M, Williams D, Brown D, Gherardi E. (1996): An Approach to Random Mutagenesis of DNA Using Mixtures of Triphosphate Derivatives of Nucleoside Analogues. J Mol Biol **255**, 589

Danksagung:

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß bedanken, dass ich die Möglichkeit erhielt, in seiner Abteilung forschen zu dürfen, und für sein Interesse an dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Privatdozent Dr. med. Tim Seidler bedanken. Ich danke Ihm für die Überlassung des Themas, die vielen Anregungen und Ideen sowie die von Ihm investierte Zeit und sein Engagement im Labor.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. rer. nat. Cornelia Grebe, die maßgebend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und die immer ein offenes Ohr und meist auch die Lösung für die Tücken und Probleme des Laboralltages hatte. Ihr Rat war eine nicht zu ersetzende Unterstützung.

Bei Jessica, Elisabeth, Carina und Nadine möchte ich mich für Ihre Hilfestellung und Einarbeitung im Labor bedanken. Außerdem danke ich Simon und Sebastian für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank gilt Vanessa Barberi. Ich danke Ihr für Ihre moralische Unterstützung, für das Verständnis bezüglich der zahllosen Stunden im Labor und insbesondere auch Ihre Aufmunterung, wenn eine Mutagenese auch beim x-ten Mal nicht geklappt hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern für ihren Rückhalt und ihre Korrekturen bedanken.

Lebenslauf

Geburt

1982

Am 19. November 1982 wurde ich als Sohn von Dr. med. Klaus Böcker, Facharzt für Innere Medizin, Kardiologie, Angiologie, und Brigitte Böcker, geborene Schneider, medizinisch technische Assistentin, in Andernach geboren.

Schulausbildung

1989 – 1990

1989 begann meine Schulausbildung in der Kloster-Grundschule Bielefeld.

1990 – 1993

Nach der ersten Klasse erfolgte ein Schulwechsel in die Maximilian-Kolbe-Grundschule in Schermbeck infolge eines Umzuges meiner Eltern.

1993 – 2002

Von 1993-2002 besuchte ich das Gymnasium Petrinum in Dorsten und erlangte die Allgemeine Hochschulreife.

Begonnene Ausbildung zum BMA

2003-2004

2003 begann ich am Rheinischen Bildungszentrum in Köln eine Ausbildung zum BMA. Nach Erhalt eines Studienplatzes im Fach Humanmedizin an der Georg-August Universität in Göttingen beendete ich die Ausbildung zugunsten des Studienplatzes.

Akademische Ausbildung

2004-2011

Von 2004-2011 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August Universität in Göttingen und erlangte die Approbation.

Dissertation

2009-2013

2009-2013 wurde von mir die Dissertation zu dem Thema „Posttranskriptionale Veränderungen der E3-Ubiquitin-Ligase IMP (*impedes mitogenic signal propagation*)“ in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen angefertigt.

Beruf

2011-2013

Seit dem 01.08.2011 arbeite ich in der I. medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim als Assistenzarzt.

Christian Böcker