

**Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in der
Ras-vermittelten Signaltransduktion mittels bimolekularer
Fluoreszenzkomplementation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie und Biotechnologie
an der Internationalen Graduiertenschule Biowissenschaften
der Ruhr-Universität Bochum

angefertigt am
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Strukturelle Biologie

vorgelegt von
Corinna Ottmann
aus Essen

Bochum
Oktober 2008

**Analysis of protein-protein-interactions in Ras-mediated
signal transduction via bimolecular fluorescence
complementation**

Dissertation

to obtain the degree

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

at the faculty of biology and biotechnology

Ruhr-University Bochum

**International Graduate School of Biosciences
Ruhr-University Bochum**

Max-Planck-Institute of Molecular Physiology

Department Structural Biology

submitted by

Corinna Ottmann

from Essen, Germany

Bochum

October 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturelle Biologie (Prof. Dr. Alfred Wittinghofer) am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Jürgen Kuhlmann und Herrn Prof. Dr. Alfred Wittinghofer angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Alfred Wittinghofer
Regulation von kleinen und großen GTP-bindenden Proteinen
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

PD Dr. Mathias Lübben
Lehrstuhl für Biophysik
Ruhr-Universität Bochum

Danksagung

Mein Dank gilt...

... PD Dr. Jürgen Kuhlmann, der diese Arbeit zu Beginn wissenschaftlich betreut hat und jederzeit zu Diskussionen bereit war sowie stets Anregungen und Ideen parat hatte. Bedauerlicherweise verstarb Jürgen völlig unerwartet im September 2007. Ein Verlust, der nicht in Worte zu fassen ist.

... Prof. Dr. A. Wittinghofer für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung für Strukturelle Biologie anzufertigen, sowie die unkomplizierte Übernahme des Erstgutachtens und die Unterstützung beim Abschluss dieser Arbeit.

... PD Dr. Mathias Lübben für die Übernahme des Zweitgutachtens.

... der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung.

... allen Kollegen der Abteilung 1 im Labor und im Büro für eine gute Zusammenarbeit, Diskussionen wissenschaftlicher Art und auch darüber hinaus. Dabei insbesondere Robin Vetter, Benjamin Schumacher, Christine Nowak, Susanne Löcke, Elena Mucha, Manuela Molzan, Malgorzata Skwarczynska, Nina Runte, Antje Berken, Antje Schäfer, Ania Kosubek, Marco Bürger.

... den Kollegen des Chemical Genomics Center für die Kooperation, insbesondere Beate Aust, Michael Weyand und Alexander Wolf.

... meinen Eltern für die Unterstützung und tatkräftige Hilfe, insbesondere nach der Geburt meines Sohnes.

... meinem Mann, Christian, der sowohl wissenschaftlich, als auch sonst immer hinter mir stand.

There is no harm in doubt and skepticism, for it is through these that new discoveries are made.

*Richard Feynman (1918 - 1988) Letter to
Armando Garcia J, December 11, 1985
American physicist and Nobel Prize in Physics 1965.*

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Ras vermittelte Signaltransduktion	1
1.1.1 Ras-Proteine - Regulatorische G-Proteine	1
1.1.2 Regulation der G-Proteine: Funktion als Schaltermoleküle	2
1.1.3 Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade	4
1.1.4 Die Raf1 Kinase	5
1.1.5 Aktivierung von Raf1 und Regulation durch 14-3-3 Proteine	6
1.2 Fluoreszenzbasierte Techniken	8
1.2.1 Fluoreszierende Proteine	8
1.2.2 Fluoreszenz in Proteininteraktionsanalysen	10
1.2.3 Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	11
II. Problemstellung	14
III. Diskussion	17
3.1 Expression und Aufreinigung von BiFC Fusionsproteinen	19
3.2 Strukturaufklärung der „ <i>superfolder</i> “ Variante von YFP	22
3.3 Strukturelle Hinweise auf die verbesserte Stabilität von „ <i>superfolder</i> “ YFP	23
3.4 <i>In vitro</i> Rekonstitution von „ <i>superfolder</i> “ YFP mittels BiFC	24
3.5 <i>In vivo</i> BiFC Analysen	29
3.6 Raf1 Lokalisation in Abhängigkeit der Bindung an 14-3-3 Proteine	31
IV. Zusammenfassung	33
V. Summary	35
VI. Publikationen	37
6.1 Applicability of <i>superfolder</i> YFP bimolecular fluorescence complementation <i>in vitro</i>	38
6.2 Impaired binding of 14-3-3 to Raf1 in Noonan and LEOPARD syndromes implies new ways of therapeutic intervention in diseases with increased Ras signaling	66
VII. Literatur	95
VIII. Abkürzungsverzeichnis	106
Lebenslauf	107
Erklärung	108

I. Einleitung

Jede lebende Zelle enthält zahlreiche Proteine, die immer wieder miteinander interagieren. Auf diese Art und Weise werden viele biologische Funktionen gesteuert. Wissenschaftler haben eine ganze Palette von chemischen und biochemischen Methoden entwickelt um das wer, wie, wann, wo und warum dieser Interaktionen verstehen zu lernen. In klassischen Beschreibungen findet man häufig ein vereinfachtes Beispiel, wie die genetischen Informationen weitergeleitet werden. Die Informationen liegen auf den Chromosomen verankert und gelangen über die RNA zu ihren aktiven, ausführenden Molekülen: den Proteinen. Doch aus dem Gemisch einer Vielzahl und Vielfalt von Proteinen und Enzymen muss nun ein organisiertes, aktives Leben entstehen. Der Bedarf nach einer exakten Regulation wird zum großen Teil über Protein-Protein-Interaktionen dirigiert. Wird zum Beispiel ein externes Signal ins Innere der Zelle bis hin zum Zellkern übermittelt, so finden dort vom membranständigen Rezeptorprotein, über cytosolische Kinasen bis hin zu Regulatorproteinen der Transkription zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen statt. Dieser Prozess der Signaltransduktion spielt eine fundamentale Rolle in biologischen Prozessen wie Zellteilung, Zellwachstum und Differenzierung, aber auch in vielen Krankheiten, bei denen die Regulation dieser Prozesse verändert ist. So kann beispielsweise eine unkontrollierte Zellteilung zu einem Tumor führen. Eine entscheidende Rolle innerhalb der Signaltransduktion spielen die Ras-Proteine.

1.1 Ras vermittelte Signaltransduktion

1.1.1 Ras-Proteine - Regulatorische G-Proteine

Ras-Proteine gehören mit einer Masse von 21 kDa zu den kleinen monomeren G-Proteinen und wurden zuerst in Ratten Sarkomen nachgewiesen, die durch Retroviren ausgelöst werden (Shih et al. 1979, Chien et al. 1979). Die Entdeckung zellulärer Homologe des Genproduktes und die Tatsache, dass in 30 % aller humanen Krebsarten eine Mutation im Ras-Gen festzustellen ist (Chong et al. 2003), zeigt die zentrale Bedeutung des Ras-Gens in der Krebsentstehung. Aber auch in verschiedenen Entwicklungsstörungen, die als Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome zusammengefasst werden, konnten Veränderungen in der Ras Regulation

identifiziert werden (Karnoub und Weinberg 2008). Unter diesen wird z. B. Neurofibromatosis Typ-1 durch eine Mutation im NF1-Gen verursacht, dessen Genprodukt Neurofibromin-1 als RasGAP (siehe Punkt 1.2) fungiert (Martin et al. 1990), während das Costello-Syndrom durch mutiertes H-Ras verursacht wird (Aoki et al. 2005) und auch im Noonan-Syndrom wurden in Patienten, die keine Mutation in PTPN11 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type11*) aufweisen, K-Ras Mutationen gefunden, die eine erhöhte Aktivität verursachen (Schubbert et al. 2006). Innerhalb der Familie der kleinen G-Proteine sind die eben schon erwähnten Isoformen des Ras-Proteins H(arvey)-Ras, K(irsten)-Ras und N(euroblastoma)-Ras, die am besten charakterisierten. Sie sind an der Weiterleitung externer Stimuli durch Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Neurotransmitter beteiligt und wichtige Regulatoren von Prozessen der Zellteilung und –differenzierung (Medema und Bos 1993). Die Ras-Superfamilie kann in fünf Unterfamilien unterteilt werden (zur Übersicht: Wennerberg et al. 2005). Die drei genannten Ras-Isoformen gehören zur Familie der Ras/Rap-Proteine, während Proteine der Rho-Familie, bei der Organisation des Cytoskeletts von Bedeutung sind (Mackay und Hall 1998), Proteine der Rab- und Arf-Familien, sind in den vesikulären Transport involviert (Schimmöller et al. 1997 und 1998) und die Mitglieder der Ran-Familie sind am Kernimport beteiligt (Moore 1998). Die Proteine der Familie der regulatorischen G-Proteine besitzen demnach, trotz einer weitgehend konservierten Struktur, eine große funktionelle Diversität (Bourne et al. 1990).

1.1.2 Regulation der G-Proteine: Funktion als Schaltermoleküle

Die biologische Aktivität der Ras-Proteine als molekulare Schalter beruht auf ihrer Fähigkeit sowohl Guanosindiphosphat (GDP) als auch Guanosintriphosphat (GTP) unter Einnahme unterschiedlicher Konformationen zu binden. Die konformellen Unterschiede in der GDP- bzw. GTP- gebundenen Form haben Konsequenzen für die Interaktion mit nachgeschalteten Effektormolekülen. Wie alle G-Proteine durchlaufen auch die Ras-Proteine einen unidirektionalen Zyklus, der durch drei Zustände charakterisiert werden kann (Bourne et al. 1991). Die inaktive Form des Proteins ist an GDP gebunden. Nach Abdissoziation des Nukleotids gelangt Ras in einen transienten nukleotidfreien Zustand. Der Bindung von GTP folgt eine Konformationsänderung in den aktiven Zustand. Im Cytoplasma einer Zelle liegt ein 10facher Überschuss an GTP über GDP vor und die meisten G-Proteine weisen

zusätzlich eine höhere Affinität gegenüber dem Nukleotridtriphosphat auf, was dazu führt, dass der Nukleotidaustausch zugunsten von GTP ausfällt. Die strukturelle Veränderung nach Bindung des jeweiligen Nukleotids konnte durch Analyse der dreidimensionalen Kristallstruktur von H-Ras in der aktiven und inaktiven Konformation detailliert beschrieben werden (de Vos et al. 1988; Pai et al. 1989). Die irreversible Hydrolyse des GTP zu GDP terminiert den aktiven Zustand des G-Proteins. Die intrinsische Hydrolyse- sowie Austauschrate ist bei den meisten G-Proteinen klein und daher von geringer Bedeutung für die Signalweiterleitung. Diese beiden Prozesse können aber durch regulatorische Proteine beschleunigt werden. Die Guanosinnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) beschleunigen die Dissoziation des gebundenen GDPs durch Stabilisierung des nukleotidfreien Zustandes (Lenzen et al. 1998). Dieser binäre Komplex wird durch Bindung von GTP wieder aufgelöst. Das GTP-gebundene, aktive Ras kann nun an Effektormoleküle binden und so das Signal weiterleiten. Zur Kontrolle der Dauer der Signalübertragung dienen im Wesentlichen die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs). Diese regulatorischen Proteine katalysieren die Hydrolyse des GTP und somit den Abbruch der Signalübertragung. In einer Vielzahl von Tumoren wurden onkogene Varianten der Ras-Proteine gefunden. Die transformierende Wirkung wird durch Punktmutationen in den Codons für Glycin 12, Glycin 13 oder Glutamin 61 vermittelt. Die G12V Mutation führt z. B. zu einer 90 % verlangsamten GTP Hydrolyse, welche sich auch durch Interaktion mit einem GAP-Protein nicht mehr beschleunigen lässt (Bos 1989). Diese Daueraktivierung kann zu unkontrollierter Zellteilung und somit zu Krebs führen.

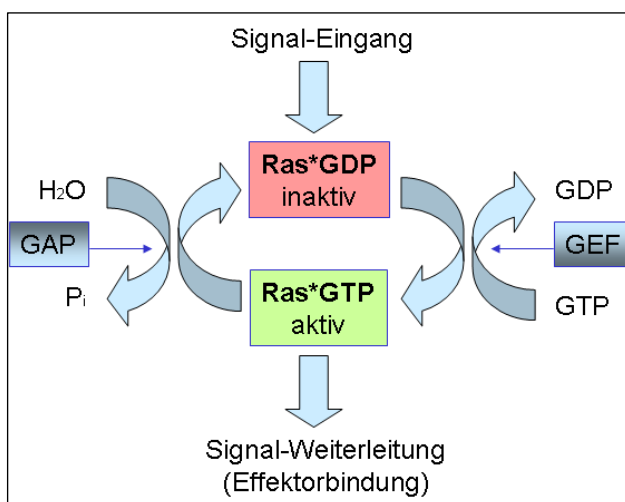


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Regulation der G-Proteine. Der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP wird von Guanosinnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Aktives Ras*GTP bindet Effektorproteine und leitet die Signalkaskade ein. Die Inaktivierung von Ras wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) vermittelt, welche die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat katalysieren.

1.1.3 Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade

Die Aktivität von Ras und damit die Komplexbildung mit GTP wird durch eine Vielzahl externer Stimuli reguliert. Nach der Bindung eines extrazellulären Liganden, wie z. B. EGF (*epidermal growth factor*), an das entsprechende Rezeptorprotein, kommt es zu seiner Dimerisierung und Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinase. Es folgt eine Autophosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten in intrazellulären Regionen des Rezeptors und die Bindung von Adapterproteinen wie z. B. Grb2 (*growth factor receptor binding protein*), welches im Komplex mit Sos (*son of sevenless*) vorliegt. Über ein weiteres Adapterprotein Shc (*SH2 domain containing α 2-collagen-related*) kann der Grb2-Sos Komplex an die Phosphorylierungsstelle des Rezeptors binden und wird so vom Cytoplasma an die Membran rekrutiert. Ras bindet zunächst mit einer geringen Affinität an Sos, welches die Abdissoziation von GDP bewirkt. Dadurch entsteht ein hochaffiner Ras-Sos Komplex. Nach der Bindung von GTP an Ras wird Sos verdrängt und Ras liegt in der aktiven Konformation vor. In diesem Zustand kann Ras durch die Bindung an unterschiedliche Effektorproteine verschiedene Signaltransduktionswege regulieren. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Effektoren gehört die Signalweiterleitung an die Serin/Threonin-Kinase Raf1 (*rapid fibrosarcoma*). Dieses Effektormolekül ist ein Teil der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade, welche einen entscheidenden Signaltransduktionsweg für zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Transformation darstellt (van Biesen et al. 1996). In Bezug auf Tumorzellen bedeutet dies, dass konstitutiv aktives Ras permanent die Raf-MEK-ERK-Kaskade stimuliert und somit zu einer verstärkten Proliferation der Zellen beiträgt. Die durch die Phosphorylierung aktivierte Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), ein Protein der Familie der mitogen-aktivierenden Protein Kinasen (MAPK), gelangt in den Nukleus, aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, die wiederum zur Erhöhung der DNA-Synthese und einer vermehrten Zellproliferation führen (Graves et al. 1997).

Den Beginn der Signalweiterleitung in der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade stellt die Aktivierung der Raf1-Kinase dar. Bei Säugern sind drei Isoformen dieses Proteins bekannt: A-Raf, B-Raf und C-Raf (auch Raf1 genannt) (Rapp et al. 1988). Im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten Raf1 werden A-Raf und B-Raf gewebespezifisch exprimiert. Aufgrund des überwiegenden Vorkommens von Raf1 in humanen Zellen wurde diese Isoform für die Untersuchungen in dieser Arbeit gewählt. Mitogene Stimulation von Raf1 ist ein komplexer und bisher nicht vollständig

charakterisierter Mechanismus. Es kommt zu einer Dephosphorylierung von Raf1 an Serin259 (Kubicek et al. 2002) und Phosphorylierung weiterer Reste, unter anderem von Serin338 und Tyrosin341 (Mason et al. 1999). In den weiteren Reaktionen sind ferner Lipid-Modulatoren wie z. B. Phosphatidyl-Serin involviert. Sie sind an der Entfernung von im inaktiven Zustand gebundenem 14-3-3 Protein beteiligt (McPherson et al. 1999) und ihre Bindung an die Cystein-reiche Domäne (CRD) wird als Grundlage für eine Ras-unabhängige Membranverankerung von Raf1 diskutiert (Hekman et al. 2002). Aktiviertes Raf1 assoziiert über seine katalytische Domäne mit MEK, dabei wird MEK an Serin218 und Serin222 innerhalb seiner katalytischen Domäne phosphoryliert (Seger und Krebs 1995, Denhardt 1996). MEK phosphoryliert seinerseits die beiden Kinasen ERK-1 und ERK-2, auch bekannt unter den Namen p42 bzw. p44 mitogen-aktivierende Protein Kinasen, an Tyrosin- und Threonineresten innerhalb eines TEY-Motivs (Seger und Krebs 1995, Denhardt 1996, Campbell et al. 1998). Nach der Aktivierung kann ERK sowohl nukleäre als auch nicht-nukleäre Effektoren phosphorylieren, wie z. B. Rsk (*ribosomal S6 kinase*), Mikrotubuli-assoziierte Proteine, cytosolische Phospholipase A2 und die Transkriptionsfaktoren Elk-1 (Graves et al. 1997), c-Jun und c-Fos, welche zusammen das aktivierende Protein 1 (AP1) bilden, welches wiederum Cyclin D1 induziert und dadurch die Proliferation von Zelle stimuliert (Shaulian und Karin 2001). ERK kann aber auch durch die Phosphorylierung von Raf1 und/oder MEK selbstregulierend in die Kaskade eingreifen (Davis 1993).

1.1.4 Die Raf1 Kinase

Raf1 besitzt eine regulatorische und eine katalytische Domäne mit Serin/Threonin spezifischer Kinaseaktivität. Im viralen raf Onkogen ist die regulatorische Domäne deletiert und durch Sequenzen des retroviralen gag Proteins ersetzt (Rapp et al. 1983). Dies führt zu einer Deregulation der Kinasedomäne und zur Zelltransformation. Strukturell besteht Raf1 aus den drei hochkonservierten Regionen CR1, CR2 und CR3 (*conserved regions* 1, 2 und 3). Der initiale Ablauf der Raf1 Aktivierung beinhaltet die Interaktion von aktivem GTP-gebundenem Ras mit der Ras Bindedomäne (RBD) und der Cystein-reichen Domäne (CRD) der CR1, und anschließender Rekrutierung von Raf1 an die Plasmamembran zur vollen katalytischen Aktivierung (Morrison et al. 1997, Nassar et al. 1995). Die Rolle der Serin/Threonin-reichen CR2 ist weniger aufgeklärt, aber der Phosphorylierungsstatus

der CR2 und verschiedene Protein-Protein-Wechselwirkungen über CR2 scheinen die Lokalisation und Aktivierung von Raf1 zu beeinflussen (Yao et al. 1995, Zimmermann und Moelling 1999). Deletion (Ishikawa et al. 1988) oder Mutation (Heidecker et al. 1990) dieser Sequenz führt zur onkogenen Aktivierung von Raf1, was die negative Regulation von Raf1 durch diese Regionen vermuten lässt. Neben der hauptsächlich *in vitro* Autophosphorylierungsstelle T268, enthält die CR2 Region mit S259 auch eine der drei wichtigsten *in vivo* Phosphorylierungsstellen (neben S43 und S621) (Morrison et al. 1993). Der Serin-Rest S259 ist sowohl für die Aktivierung von Raf1 als auch für die Bindung von 14-3-3 Proteinen von Bedeutung (siehe Kapitel 1.1.5). CR3 entspricht im Wesentlichen der katalytischen Kinase Domäne. Sie ist sowohl innerhalb der Raf-Familie als auch im Vergleich mit anderen Serin/Threonin Proteinkinase hochkonserviert (Hagemann und Rapp 1999) und wird ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert. Demzufolge ist die Regulation der Raf1 Kinase ein komplexer Prozess bestehend aus inter- und intramolekularen Interaktionen wie auch Phosphorylierung von spezifischen Aminosäureresten der regulatorischen und katalytischen Domänen des Proteins (Chong et al. 2003).

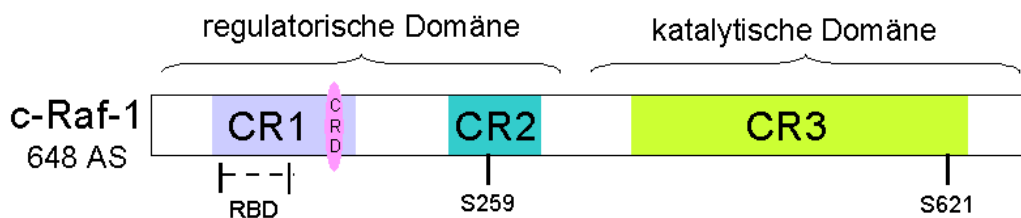


Abb. 1.2: Domänenstruktur der Raf1 Kinase (648 Aminosäuren). Die konservierten Regionen (CR) sind hervorgehoben. Die Cystein reiche Domäne (CRD) in CR1 ist durch eine Ellipse dargestellt. Die katalytische und die regulatorische Domäne sind gekennzeichnet, ebenso wie die Bindedomäne für Ras (RBD) und zwei Serine (S259 und S621) an die 14-3-3 Proteine binden.

1.1.5 Aktivierung von Raf1 und Regulation durch 14-3-3 Proteine

Die Phosphorylierung von Raf1 an spezifischen Aminosäureresten ist ein wichtiger Mechanismus über den die Aktivität dieser Kinase reguliert wird. Die Aktivitätsstimulierenden Phosphorylierungsstellen liegen auf dem C-terminalen Teil des Proteins. Darunter befinden sich die konservierten Threonin und Serin Reste, die für die Aktivierung von Raf1 und B-Raf notwendig sind (S338, Y341, T491, S494) (Chong et al. 2003) und die Serin und Tyrosin Reste, die relevant für die Aktivierung von Raf1 und A-Raf sind (S338 und Y341 in Raf1) (Mason et al. 1999). Die Identität

der Kinasen, die diese Phosphorylierungen als physiologische Antwort auf eine Stimulation durch einen Wachstumsfaktor übernehmen, ist bis heute kontrovers diskutiert (zur Übersicht: Wellbrock et al. 2004). Zusätzlich ist im C-Terminus auch noch ein konservierter konstitutiv phosphorylierter Serin Rest (S621) zu finden, der die Interaktion zwischen Raf1 und 14-3-3 Proteinen vermittelt und notwendig für die Raf1 Aktivität *in vivo* ist. Im Gegensatz dazu spielen Phosphorylierungen im N-terminalen Teil der Raf1 Kinase eine Rolle in der Repression der Kinase Aktivität. Konkret enthält diese Region sieben von insgesamt acht negativen Phosphorylierungsstellen: die inhibitorischen Serine S43, S233 und S259, die von PKA (Proteinkinase A) oder PKB (Proteinkinase B) phosphoryliert werden, wobei die phosphorylierten Serine 233 und 259 als 14-3-3 Bindestellen nachgewiesen wurden (Dumaz und Marais 2003, Muslin et al. 1996) und fünf neu entdeckte ERK Phosphorylierungsstellen (S29, S43, S289, S296 und S301) (Dougherty et al. 2005). Die Entdeckung dieser Phosphorylierungsstellen weist auf die Existenz eines negativ regulierenden Rückkopplungsmechanismus hin, der ERK Stimulation und Raf1 Deaktivierung verbindet und somit möglicherweise die Aktivierung von ERK limitiert. Das derzeitige Model der Raf1 Regulation postuliert eine Bindung zwischen der N-terminalen Domäne und der Kinase-Domäne, welche die katalytische Aktivität des Enzyms unterdrückt. Diese intramolekulare Autoinhibition begünstigt die Bindung von 14-3-3 Proteinen an die Phosphorylierungsstellen von Raf1. Diese Bindung muss aufgehoben werden damit eine Aktivierung von Raf1 möglich wird. Hierfür dephosphoryliert die Protein Phosphatase 2A (PP2A) S259 und ermöglicht so die Membranrekrutierung von Raf1 und dessen Interaktion mit Ras (Abraham et al. 2000). Die Aktivierung wird durch eine negative Rückkopplungsschleife terminiert, in welcher ERK und PKB die inhibitorischen Reste von Raf1 phosphorylieren. Derzeit kann eine Vielzahl von Proteinen aufgeführt werden, die mit Raf1 interagieren bzw. assoziiert vorliegen (Übersicht: Kolch 2000). Für diese Arbeit ist die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen von besonderem Interesse, da diese wie schon erwähnt mit inaktivem Raf1 im Komplex vorliegen und somit möglicherweise einen Gegenspieler der Raf1/Ras Interaktion darstellen. 14-3-3 Proteine sind eine Familie ubiquitär exprimierter Proteine, welche ursprünglich als Regulatoren der Biosynthese von Neurotransmittern beschrieben wurden (Ichimura et al. 1988). Eine enzymatische Funktion von 14-3-3 Proteinen ist bisher nicht überzeugend belegt, jedoch ist eine Assoziation von 14-3-3 Proteinen mit einer Vielzahl von Protein

Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und anderen beschrieben (Übersicht: Aitken et al. 2002). Aufgrund dieser Vielfalt in der Wahl der Bindungspartner wurden 14-3-3 Isoformen gemeinhin als Adapterproteine beschrieben.

Die 14-3-3 Familie umfasst sieben humane, mit griechischen Buchstaben benannte Isoformen, von denen ζ (zeta) relevant für diese Arbeit ist. Die Isoformen sind hoch konserviert in verschiedenen Säugerspezies und auch die Bindungspräferenzen sind sehr ähnlich. 14-3-3 Proteine finden sich *in vivo* und *in vitro* zu Homo- und Hetero-Dimeren zusammen, die einen amphipatischen Kanal ausbilden (Liu et al. 1995, Xiao et al. 1995). Eine Dimerisierung scheint eine unabdingbare Voraussetzung für die Aktivität von 14-3-3 zu sein (Tzivion et al. 1998). Am C-Terminus von Raf1 liegen die 14-3-3 Bindestellen S259 und S621 in ruhenden Zellen konstitutiv phosphoryliert vor. Die Bindung von 14-3-3 an S259 schützt vor Dephosphorylierung durch PP2A. Auf diese Weise kann eine Loslösung von 14-3-3 eine Dephosphorylierung ermöglichen (Abraham et al. 2000). Dephosphorylierung von Raf1 erhöht den Anteil von Membran-rekrutiertem Raf1 (Kubicsek et al. 2002). Diese Erkenntnisse legen die Hypothese nahe, dass die Repression der Kinase Domäne von Raf1 durch die regulatorische Domäne nach Abdissoziation von 14-3-3 aufgehoben wird und nachfolgend die Membranrekrutierung und Bindung an Ras ermöglicht.

1.2 Fluoreszenzbasierte Techniken

1.2.1 Fluoreszierende Proteine

Die Pionierarbeit im Bereich der fluoreszierenden Proteine gelang 1962 Shimomura und Kollegen mit der erfolgreichen Isolierung des Photoproteins Aequorin aus einer biolumineszenten Qualle der Gattung *Aequorea* (Shimomura et al. 1962). Nach Zugabe von Calciumionen emittiert Aequorin aus *A. victoria* *in vitro* Lichtquanten mit einer Wellenlänge von 470 nm, weswegen es auch als blau fluoreszierendes Protein bezeichnet wird. Die Qualle *A. victoria* bioluminesziert allerdings nicht blau, sondern grün, da Aequorin die Energie der Biolumineszenzreaktion strahlungslos an das sogenannte grün fluoreszierende Protein (GFP) überträgt (Shimomura et al. 1962). Duoglas Prasher und Kollegen isolierten, klonierten und sequenzierten 1992 die cDNA von GFP. Die Primärstruktur besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,888 kDa (Prasher et al. 1992). Die Kristallstrukturen von GFP

und seinem Dimer wurden 1996 gelöst (Ormö et al. 1996, Yang et al. 1996). GFP ist ein interessantes Werkzeug für vielfältige biologische Studien, da es in verschiedenen Umgebungsbedingungen stabil ist und das fluoreszierende Zentrum spontan und autokatalytisch gebildet werden kann, das heißt es wird kein externes Enzym benötigt und die Chromophorausbildung kommt vollständig ohne zellspezifische Prozessierungssysteme zustande. Der Chromophor ist in der Mitte einer zentralen α -Helix platziert und entsteht durch autokatalytische Zyklisierung und Dehydrierung des Tripeptids Ser65-Tyr66-Gly67 (Cody et al. 1993). Dabei bildet sich aus Gly67 und Ser65 ein Imidazolring, der durch mehrere Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Im Anschluss erfolgt eine Oxidation der Tyr66-Seitenkette durch freien Sauerstoff (Ormö et al. 1996). Die chromophore Sequenz wird von einem 11strängigen β -Fass umgeben. Mutagenese der chromophoren Sequenz sowie der umgebenden Fass-Struktur des grün fluoreszierenden Proteins lieferten viele Varianten mit verschiedenen Emissions- und Absorptionsspektren (zur Übersicht: Olenych et al. 2007).

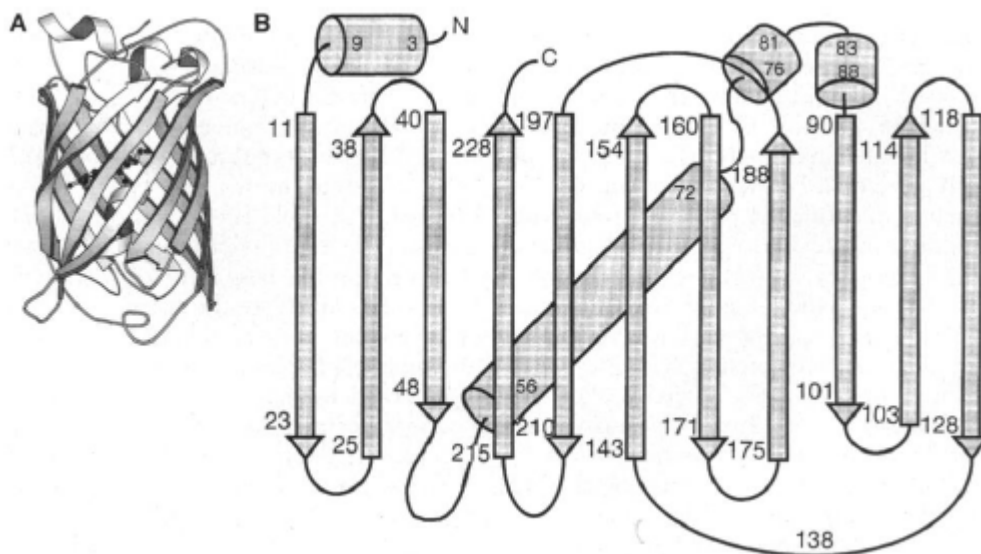


Abb. 1.3: A) Schematische Abbildung der Struktur von GFP. B) Schematische Darstellung der Faltung von GFP. Die Nummern der Aminosäuren bezeichnen die Reste an denen die sekundären Strukturelemente ungefähr beginnen und enden (Graphik aus Ormö et al. 1996).

Eine der weitverbreitetsten Varianten des GFP ist das eGFP (*enhanced GFP*), welches eine Punktmutation an Position 65 trägt. Dort ist das Serin durch ein Threonin (S65T) ersetzt was zu einem definierteren Absorptionsprofil mit einem einzelnen Höchstwert bei 484 nm führt (Heim et al. 1995). eGFP gehört zu den

hellsten und photostabilsten Proteinen aus *Aequorea victoria* (Shaner et al. 2005). Verglichen mit vielen traditionellen synthetischen Fluorophoren, die oft toxisch oder photoreaktiv sind, ist der Einsatz von fluoreszierenden Proteinen nur minimal invasiv für lebende Zellen und ermöglicht Visualisierung und Aufzeichnung von zeitaufgelösten Sequenzen über einen längeren Zeitraum (Lippincott-Schwartz und Patterson 2003, Day 2005).

Durch eine Punktmutation an Position 203 (T203Y) verschiebt sich sowohl das Anregungs- als auch das Emissionsspektrum von GFP um fast 20 nm zu längeren Wellenlängen hin und führt so zu einem gelb fluoreszierenden Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) (Ormö et al. 1996, Wachter et al. 1998). Durch verschiedene weitere Aminosäuresubstitutionen entstanden unterschiedliche gelb fluoreszierende Proteine mit Anregungsmaxima zwischen 508 und 516 nm und Emissionsmaxima zwischen 518 und 529 nm (zur Übersicht: Tsien 1998). Auch von YFP wurde eine heller fluoreszierende Variante (eYFP) durch ein Lysin statt eines Glutamins in Position 69 (Q69K) konstruiert. eYFP emittiert besonders intensiv und ist stabil in einem pH-Bereich zwischen etwa 8 und 11. Die pH-Sensitivität äußert sich bei YFP durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei niedrigeren pH-Werten (Miyawaki et al. 2001). Durch vielfältigen Einsatz dieser Fluorophore zur Markierung von Proteinen eröffnet sich ein breites Spektrum zur Untersuchung molekularbiologischer und biochemischer Fragestellungen.

1.2.2 Fluoreszenz in Proteininteraktionsanalysen

Im Hinblick auf die Aufklärung der biochemischen Eigenschaften von Proteinen, deren Interaktionen und deren Rolle in zellulären Prozessen ist es wichtig, Werkzeuge für die Charakterisierung *in vitro* und *in vivo* zur Verfügung zu haben. Einen weit verbreiteten Ansatz stellen fluoreszenzbasierte Techniken dar, bei denen die Zielproteine mit Fluorophoren markiert werden. Insbesondere die Einführung der oben beschriebenen fluoreszierenden Proteine hat die Möglichkeiten der intrazellulären Lokalisations- und Interaktionsanalyse revolutioniert (Zimmer 2002).

Der Einsatz fluoreszierender Proteine zur *in vivo* Markierung von Proteinen birgt den Vorteil, dass die Einführung der entsprechenden cDNA in einen eukaryotischen Transfektionsvektor die direkte Herstellung von fluoreszenzmarkierten Proteinen über die zelleigene Expressionsmaschinerie ermöglicht. So hat die Fusion des GFP mit Ras-Proteinen bei der Aufklärung der intrazellulären Lokalisation von Ras-

Proteinen wichtige Erkenntnisse geliefert. Die Lokalisation von N- und H-Ras an Endomembranen konnte erstmalig bei Verwendung der entsprechenden GFP-Konstrukte beobachtet werden (Choy et al. 1999). Auch die Aktivierung von Ras-Proteinen an Endomembransystemen konnte erstmals durch Rekrutierung eines GFP-Raf1RBD Konstruktes an den Golgi-Apparat gezeigt werden (Chiu et al. 2002). Die Lokalisation am Golgi-Apparat konnte in dieser Studie zusätzlich über FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer)-Detektion zwischen CD8-YFP, einem molekularen Marker des Golgi-Apparates, sowie CFP (*cyan fluorescent protein*)-Raf1RBD abgesichert werden. Die Detektion der Ras-Aktivierung über FRET war auch schon in einer vorherigen Arbeit gelungen. Hier wurde eine eYFP-Ras-Raf1RBD-eCFP Chimäre eingesetzt, die nach intramolekularer Bindung die beiden Fluorophore näher aneinander bringt. Die Verringerung des Abstandes der beiden Fluorophore führte zu einer Erhöhung der FRET-Effizienz (Mochizuki et al. 2001). Hier konnte jedoch nur eine Aktivierung an der Plasmamembran beobachtet werden. Das GFP ist ein weit verbreiteter Fluoreszenzmarker in der Zellbiologie, Interaktionsstudien mit rekombinanten bakteriell exprimierten fluoreszierenden Fusionsproteinen sind dagegen eher selten durchgeführt worden. Es bestünde die Möglichkeit Proteinwechselwirkungen auch *in vitro* über FRET nachzuweisen. Da aber eine Vielzahl von Vorbehalten gegenüber intrazellulären FRET-Messungen mit Hilfe von eCFP/eYFP publiziert sind (Karpova et al. 2003), und diese Einschränkungen zum Großteil auch für *in vitro* Messungen bestätigt werden konnten (Dissertation Kahms 2004), liegt die Überlegung nahe nach einer alternativen Methode zur Interaktionsanalyse zu suchen.

1.2.3 Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Eine elegante Alternative für intrazelluläre Bindungsstudien ist die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Die Idee ein Protein in zwei nicht-funktionale Hälften zu zerteilen, um diese zu einer funktionellen Einheit komplementieren zu lassen ist schon mehr als 40 Jahre alt. Ullmann und Kollegen beschrieben 1967 die erfolgreiche Zerteilung der β -Galactosidase in zwei Fragmente, die bei gleichzeitiger Expression in der Zelle die Aktivität des Enzyms wiederherstellen konnten. Hierbei war der N-terminale Teil auf einem Plasmidvektor kodiert und der C-terminale Teil lag auf dem Bakterienchromosom verankert. Nach erfolgreicher Einschleusung des Plasmidvektors in die Zelle wurden beide Teile exprimiert und die Proteinfragmente

besaßen eine ausreichend hohe Affinität zueinander, dass sie das funktionale Enzym rekonstituieren konnten (Ullmann et al. 1967). Später wurde die Komplementation von zwei Fragmenten der Luciferase beschrieben (Nealson und Markovitz 1970, Meighen und Bartlet 1980). Das Enzym Luciferase besitzt die Fähigkeit Luciferin zu oxidieren wobei es zur Biolumineszenz kommt. Das entstandene Licht kann leicht detektiert werden, was die Luciferase zu einem interessanten Werkzeug in der Molekularbiologie gemacht hat. Jedoch wurde mit beiden Komplementsystemen nur die Coexpression der zwei Fragmente in der Zelle und somit die erfolgreiche Einschleusung von DNA in die Zelle nachgewiesen.

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation beruht auf dem Prinzip der Komplementation zweier für sich allein nicht funktionaler Fragmente des gelb fluoreszierenden Proteins zum intakten und funktionstüchtigen Protein (Hu et al. 2002). Die BiFC bietet jedoch die Möglichkeit zum Nachweis von Proteininteraktionen, da die beiden Hälften des YFP einzig durch räumliche Annäherung die Fähigkeit zur Rekonstruktion des funktionalen Fluorophors besitzen und allein keine Fluoreszenz aufweisen. Hierbei gilt, dass die Affinität der beiden Fragmente nicht ausreichend groß sein darf, um eine Assoziation ohne Interaktion der Fusionspartner zu ermöglichen. Diese Voraussetzungen sind gegeben, wenn YFP zwischen den Aminosäuren 154/155 in zwei Hälften geteilt wird.

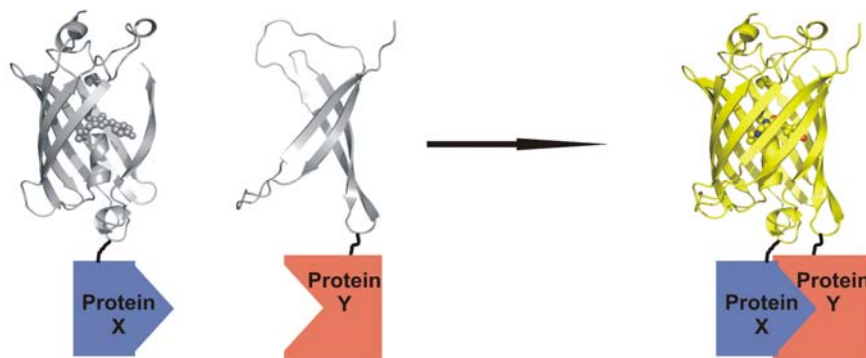


Abb. 1.4: Prinzip der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Zwei nicht funktionale Fragmente des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) sind mit den interagierenden Proteinen fusioniert. Bei Interaktion ihrer Fusionspartner werden die YFP-Fragmente in räumliche Nähe gebracht und bilden einen fluoreszierenden Komplex aus.

Die spektralen Eigenschaften des bimolekularen fluoreszierenden Komplexes aus den beiden YFP-Fragmenten sind dabei identisch mit denen von intaktem YFP (Hu et al. 2002). Die BiFC wurde für die Interaktion zwischen den

Dimerisierungsdomänen der beiden Transkriptionsfaktoren bFos und bJun etabliert (Hu et al. 2002). Hierbei konnte die Lokalisation dieser Interaktion im Zellkern der lebenden Zelle visualisiert werden. Mit dieser Methode können Proteininteraktionen *in vivo* mit einem einfach detektierbaren Fluoreszenzsignal direkt in der Zelle nachgewiesen, lokalisiert und visualisiert werden. BiFC birgt ein hohes Potenzial zur Aufklärung von vielerlei Fragestellungen bezüglich Proteininteraktionen und deren Lokalisation in der lebenden Zelle.

Bislang wurden allerdings keine Studien veröffentlicht, welche die BiFC Methode auf ihr Potenzial als *in vitro* Analyseverfahren von Protein Wechselwirkungen hin untersucht haben. Eigene, nicht veröffentlichte Ergebnisse zeigten eine hohe Unlöslichkeit der in *E. coli* überexprimierten Fusionsproteine. Diese beruht vermutlich auf einer schwerwiegenden Faltungsproblematik der YFP-Hälften. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) hat eine bemerkenswerte Geschichte der Protein Entwicklung zur Verbesserung der Fluoreszenz, Stabilität und Faltung hinter sich. Angefangen mit den „*cycle 3*“- Mutationen F99S, M153T und V163A (Cramer et al. 1996) über die Mutationen F64L und S65T zum eGFP (Patterson et al. 1997) bis hin zum Faltungsreporter GFP, in dem die vorher genannten Mutationen kombiniert wurden (Waldo et al. 1999). In späteren Studien wurde ein geteiltes GFP eingesetzt, um die Löslichkeit von markierten Proteinen zu analysieren (Cabantous et al. 2005). In diesem Fall wurde GFP an Position 214 in zwei Hälften geteilt, so dass die N-terminale Hälfte die ersten 10 β -Stränge (GFP 1-10) enthält und die C-terminale Hälfte (11ter β -Strang, GFP 11) wird an ein Protein gekoppelt, dessen Löslichkeit in Frage steht. Ist das Protein löslich, so komplementieren die GFP Hälften zum funktionalen Fluorophor. Um eine optimale Expression des GFP 1-10 in *E. coli* zu erreichen, wurden 11 zusätzliche Mutationen (S30R, Y39I, N105K, E111V, I128T, Y145F, K166T, I167V, I171V, S205T, A206V) eingeführt, woraus das Konstrukt GFP 1-10 OPT entstand (Cabantous et al. 2005). Darüber hinaus veröffentlichte die gleiche Gruppe im Jahr 2006 eine Variante des GFP, die verbesserte Faltungseigenschaften aufwies (Pédelacq et al. 2006). Dieses „*superfolder*“ GFP unterscheidet sich in den Aminosäurepositionen Y39N und N105T von der oben genannten GFP 1-10 OPT Variante.

II. Problemstellung

Nachdem in einer vorangegangenen Diplomarbeit die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) erfolgreich auf die Ras/Raf1 Interaktion *in vivo* übertragen werden konnte, stellte sich die Frage nach erweiterten Einsatzmöglichkeiten der BiFC zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen. Die Identifizierung von interagierenden Proteinen ermöglicht oft einen Einblick in die Funktionsweisen von zellulären Prozessen. Viele solcher Prozesse laufen unter Beteiligung von stabilen oder auch transienten Protein-Protein-Komplexen ab. Diese Protein-Komplexe spielen nicht nur im gesunden Organismus eine Rolle, sondern sind auch von großer Wichtigkeit in der Entwicklung von Krankheiten, da eine Deregulation von Zellprozessen schwerwiegende Folgen für den Organismus haben können. Daher besitzt die Modulation der Berührungsflächen zweier interagierender Proteine erhebliches therapeutisches Potenzial, obgleich die Suche nach kleinen Molekülen, die als Medikament eingesetzt werden könnten, eine enorme Herausforderung darstellt (Wells und McClendon 2007). Dabei kann eine Modulation solcher Interaktionen sowohl eine Unterbrechung als auch eine Stabilisierung von existierenden Protein Komplexen bedeuten. Im Beispiel der deregulierten Ras/Raf1 Signalkaskade wäre ein Inhibitor der Interaktion zwischen Ras und dem ersten Effektormolekül Raf1 denkbar, um unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern. Aber auch die Stabilisierung der Bindung von 14-3-3 Proteinen an Raf1, womit Raf1 im Cytoplasma gehalten würde und somit nicht aktivierbar wäre, könnte aus therapeutischer Sicht interessant sein. Es wurden bisher verschiedene Ansätze realisiert, um kleine Modulatormoleküle von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu identifizieren. Zum Beispiel wurden Inhibitoren für die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren Myc und Max über ein auf FRET basierendes Rasterverfahren identifiziert (Berg et al. 2002). Der Einsatz einer Fluoreszenz Polarisations-Analyse (FP) ermöglichte aus einer Bibliothek mit 250.000 Substanzen die Identifizierung von 29 Verbindungen, welche die Interaktion zwischen FtsZ und ZipA unterbrechen, die für die Zellteilung in *E. coli* essenziell ist (Kenny et al. 2003). Auch wenn diese Techniken erfolgreich eingesetzt wurden, so haben diese Methoden einige Fallstricke wie z. B. die hohen technischen Anforderungen und die Gefahr der falsch-positiven Treffer (bei FRET) sowie die

Notwendigkeit der nachträglichen Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen (bei FP). Es wäre daher erstrebenswert eine einfach durchführbare Methode für die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* mit einem eindeutigen Ja/Nein Signal zu finden, die sich als Hochdurchsatz Rasterverfahren (*high-throughput screening*, HTS) durchführen lässt.

In dieser Arbeit wurde die Bewertung der *in vitro* Verwendungsmöglichkeiten der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation für die Analyse von Protein-Protein Interaktionen angestrebt sowie deren Weiterentwicklung zur Einsetzbarkeit als HTS Verfahren zur Identifikation von Kleinmolekülen. Wie bereits erwähnt, können diese Moleküle dabei einen existierenden Protein-Protein Komplex entweder unterbrechen oder stabilisieren. Die Interaktion zwischen Ras und der Ras Bindedomäne der Raf1 Kinase (Raf1RBD) sowie die Bindung von 14-3-3 Proteinen an den regulatorischen C-Terminus (CT52) der pflanzlichen Plasmamembran Protonen-ATPase (PMA2) wurden als Modellsysteme für die Entwicklung des BiFC *in vitro* Verfahrens ausgewählt. Nachdem ausführliche Löslichkeitstests der BiFC Fusionsproteine mittels unterschiedlicher Puffer (Hochsalz, Detergenzien, Denaturierung) fehlschlugen, wurde die Strategie dahingehend geändert, die getrennten YFP Hälften durch Mutationen in ihrer Faltung zu stabilisieren sowie ihre hydrophobe Oberfläche zu verändern.

Ergänzend wurden für diese Arbeit weitere *in vivo* Studien der Ras/Raf1RBD Interaktion sowie der 14-3-3/CT52 Interaktion in eukaryotischen Zelllinien eingeplant. Hierbei wurde nicht nur der Einsatz entsprechender BiFC Fusionsproteine vorgesehen, sondern auch zelluläre Lokalisationsstudien mit GFP-fusionierten Raf1 Proteinen, die durch verschiedene Mutationen in der 14-3-3 Bindedomäne, Aufschluss über die Abhängigkeit der Lokalisation von Raf1 und der Bindung an 14-3-3 Proteine liefern sollten.

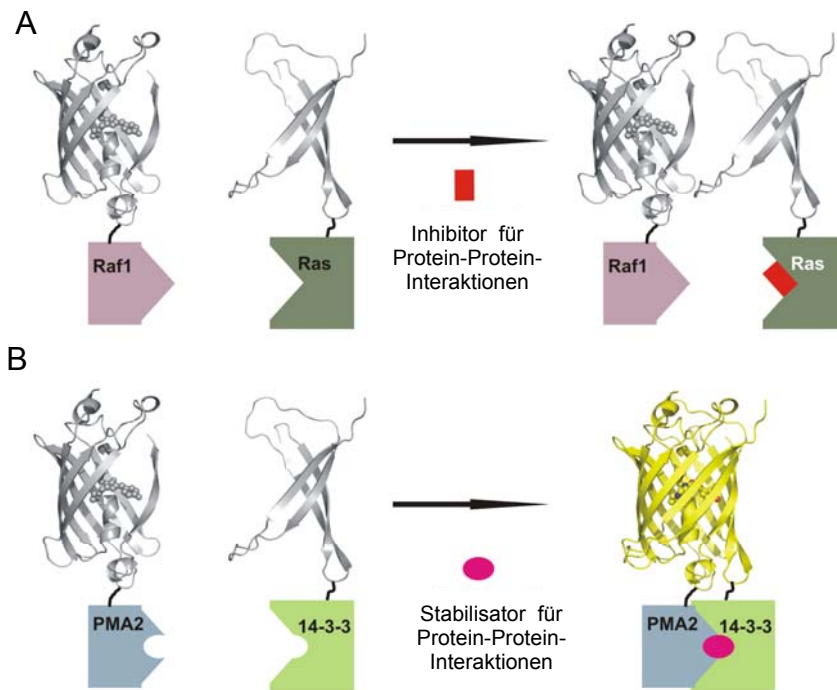


Abb. 2.1: BiFC als Testsystem für Kleinmoleküle. A) für Inhibitoren (Beispiel Ras/Raf1 Interaktion) oder B) für Stabilisatoren (Beispiel: Fusicoccin stabilisiert 14-3-3/PMA2 Interaktion). Ein Fluoreszenzsignal kann nur im Falle einer Interaktion detektiert werden.

III. Diskussion

Das grün fluoreszierende Protein und seine farblich veränderten genetischen Derivate haben innerhalb des vergangenen Jahrzehnts eine neue und beispiellose Ära der Zellbiologie eingeläutet, indem sie es den zeitgenössischen Forschern ermöglichen diese optischen Sonden mittels routinemäßiger molekularer Klonierungsmethoden an eine Vielzahl von Zielproteinen und –enzymen zu fusionieren, um zelluläre Prozesse in lebenden Systemen über Fluoreszenzmikroskopie und ähnliche Methoden zu beobachten (zur Übersicht: Shaner et al. 2005, Prescott et al. 2006). Das Spektrum der Anwendungen für fluoreszierende Proteine reicht von Reportern der transkriptionalen Regulation bis hin zur Detektion der Lokalisation von Fusionsproteinen an Zellorganellen und anderen subzellulären Strukturen, sowie der Aufzeichnung ihrer Motilität und Dynamik. Diese faszinierenden Fluorophore haben das Potenzial Biosensoren hervorzubringen um zahlreichen intrazellulären Phänomenen auf die Spur zu kommen, darunter z. B. pH- und Ionen-Konzentrationsschwankungen, Kinaseaktivitäten, und Apoptose, um nur einige wenige zu nennen (Zhang et al. 2002, Miyawaki 2003, Zacco 2004). Die Markierung von Zielproteinen mit fluoreszierenden Proteinen bietet hierbei einige Vorteile gegenüber der Markierung mit synthetischen Fluorophoren. So können die GFP-Fusionskonstrukte direkt in der Zelle exprimiert werden, womit eine nachträgliche Kopplungsreaktion von Protein und Fluorophor obsolet wird. Das ideale Resultat ist ein Fusionsprotein, das seine normalen Funktionen und Lokalisationen des Ursprungproteins behält, aber nun fluoresziert (Tsien 1998). GFP-Derivate eignen sich aufgrund ihrer Spektraleigenschaften und ihrer Stabilität unter verschiedenen Umgebungsbedingungen in besonderem Maße für intrazelluläre Untersuchungen (Prasher 1995). Sie scheinen dabei in vielen Fällen nicht mit zelleigenen Prozessen zu interferieren (Misteli und Spector 1997). Allerdings sind GFP-Fusionsproteine meist in der Zellbiologie für Transfektionsstudien eingesetzt worden. *In vitro* Studien mit bakteriell überexprimierten rekombinanten GFP-Fusionsproteinen wurden dagegen eher selten durchgeführt.

Die Kristallstruktur des GFPs zeigt eine hydrophobe, zentrale α -Helix umgeben von 11 β -Strängen (Ormö et al. 1996). Der Chromophor liegt in der Mitte dieser α -Helix und entsteht durch autokatalytische Zyklisierung und Dehydrierung des Tripeptids

Ser65-Tyr66-Gly67 (Cody et al. 1993). Anhand des Fluoreszenzsignals des angeregten GFP kann die Lokalisation des Fusionspartners in der lebenden Zelle verfolgt werden. Mit GFP-Fusionsproteinen konnte beispielsweise die unterschiedliche Ausprägung der Lokalisation von N-Ras, H-Ras und K-Ras4B an Plasmamembran, Golgi-Apparat und in Vesikeln eukaryotischer Zellen nachgewiesen werden (Choy et al. 1999). Neben der Möglichkeit die intrazelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen zu verfolgen, können darüber hinaus auch Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle über Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) nachgewiesen werden. Beim FRET wird die Energie eines Fluorophors (Donor) nicht als Licht emittiert, sondern strahlungslos an einen zweiten Fluorophor (Akzeptor) abgeben, welcher hierdurch zur Fluoreszenz angeregt wird. Der Energietransfer setzt voraus, dass sich die Emissionswellenlänge des Donors mit der Anregungswellenlänge des Akzeptors überlagern und zusätzlich beide Fluorophore räumlich nahe genug beieinander liegen (Förster 1948). Als chromophores Paar für FRET werden häufig eYFP und eCFP eingesetzt (Tsien 1998). Bei FRET-Analysen können allerdings einige Schwierigkeiten auftreten. Zum einen kann es zum Durchsickern der Fluoreszenz des einen Fluorophors in den Kanal des anderen Fluorophors kommen und zum anderen kann auch eine direkte Anregung des zweiten Fluorophors durch die Anregungswellenlänge des ersten Fluorophors auftreten (Karpova et al. 2003). Außerdem gehören zu den Schwierigkeiten bei FRET Messungen auch optisches Hintergrundrauschen, oder vom Detektor verursachtes Hintergrundrauschen, sowie auch das Ausbleichen des Fluorophors (Periasamy 2001). Außerdem kann bei FRET ein Hintergrundsignal durch die Dimerisierung von GFP-Varianten auftreten, was ihre Fluoreszenzeigenschaften verändert (DeAngelis et al. 1998, Graham et al. 2001). FRET Messungen sind somit nur mit sehr vielen Positiv- und Negativkontrollen sowie einem hohen instrumentellen Aufwand durchführbar.

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) bietet eine attraktive Alternativmethode, bei der die eben genannten Probleme nicht auftreten können. Die BiFC ermöglicht die direkte Visualisierung eines Protein-Protein-Komplexes am Ort des Geschehens innerhalb der Zelle. Hierbei muss nur ein einfaches Fluoreszenzsignal detektiert werden, welches *in vivo* direkt als Bindungssignal interpretiert werden kann. BiFC ist innerhalb der letzten Jahre zu einer etablierten Methodik der Zellbiologie geworden, während allerdings bisher keine Arbeiten über *in*

in vitro BiFC mit nativ aufgereinigten Proteinen veröffentlicht wurden. Dies liegt vermutlich an der starken Unlöslichkeit der Fusionsproteine mit den entsprechenden YFP Fragmenten (eigene unveröffentlichte Ergebnisse, Hu et al. 2002), die durch unvollständige oder falsche Faltung zustande kommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die BiFC als *in vitro* Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu etablieren und auf ihr Potenzial als Hochdurchsatz Rasterverfahren zur Identifikation von Kleinmolekülen hin zu untersuchen. Hierfür wurden 15 Mutationen in die YFP Fragmente eingeführt, welche eine stabilere Faltung und somit eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen vermitteln sollten. Die sogenannten „*superfolder*“ YFP Fusionsproteine konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert und anschließend nach Standardprotokollen aufgereinigt werden. Die zugehörige Kristallstruktur des „*superfolder*“ YFP konnte zu einer Auflösung von 2.7 Å bestimmt werden und gibt Aufschluss über die verbesserten Faltungseigenschaften. Nach der Trennung der YFP Fragmente auf genetischer Ebene, konnte ihre *in vitro* Rekonstitution zum funktionalen Fluorophor auf Proteinebene gezeigt werden. Hierfür wurden zwei voneinander unabhängige Protein-Interaktionspaare verwendet (Ras/Raf1RBD und 14-3-3/CT52).

3.1 Expression und Aufreinigung von BiFC Fusionsproteinen

Im Jahre 2002 beschrieben Hu und Kollegen erstmalig die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (Hu et al. 2002). In ihrer Studie zeigten sie mittels BiFC die Interaktion der bZIP Domänen der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun. Hierunter befanden sich auch Ergebnisse einer *in vitro* Komplementation der entsprechenden Fusionsproteine (bFos-YC und bJun-YN). Diese wurden in *E. coli* exprimiert und aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Einschlusskörperchen deponiert. Nach der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidin), wurden beide Proteine gemeinsam für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend zügig 60-fach verdünnt und die Fluoreszenz bei 25°C gemessen. Die Entwicklung des Fluoreszenzsignals konnte mit $t_{1/2} = 3000$ s beobachtet werden. Die Konkurrenz durch Zugabe eines entsprechenden unmarkierten Interaktionspartners konnte die Entwicklung des Fluoreszenzsignals signifikant verringern. Eine Deletion des „Leucin

Zipper“ Motivs, welche die Interaktion zwischen Fos und Jun verhindert, führte zum Ausbleiben eines Fluoreszenzsignals (Hu et al. 2002).

Nach Klonierung der entsprechenden BiFC Fusionsproteine mit unmodifiziertem YFP für die Untersuchung der HRas/Raf1RBD Interaktion (HRas-YC und Raf1RBD-YN) wurde auf ähnliche Art und Weise versucht die *in vitro* Rekonstitution des YFPs zu erreichen. Obgleich sich durch Expression in *E. coli* ausreichende Mengen an Protein exprimieren ließen, so zeigte sich auch hier eine starke Unlöslichkeit und somit die Deponierung in zellulären Einschlusskörperchen. Nachdem beide Proteine durch Denaturierung in Lösung gebracht wurden, gelang es jedoch weder mit der zügigen Verdünnungsmethode noch mit schonenderer Dialyse gegen physiologische Puffer ein Fluoreszenzsignal zu detektieren, weil beide Proteine unter allen getesteten Bedingungen präzipitierten (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Aus diesem Grund entstand das Vorhaben die Löslichkeit der YFP-Fragmente durch die Einführung von Faltungs-verbessernden Mutationen zu steigern, wie sie für „*superfolder*“ GFP publiziert wurden (Cabantous et al. 2005, Pédelacq et al. 2006). Im Jahr 2005 entwickelten Cabantous und Kollegen lösliche GFP Fragmente, die spontan zur Komplementation befähigt sind. Diese können zur Markierung und Detektion von löslichen bzw. unlöslichen Proteinen in lebenden Zellen oder auch Zelllysaten eingesetzt werden. Die Größe der Fragmente für diese Art von Löslichkeitstest unterscheidet sich von der Größe der Fragmente, welche zu Interaktionsanalysen mittels BiFC verwendet werden. Das entscheidende Kriterium für die Wahl der Fragmente beim Einsatz als Löslichkeitsindikator ist sowohl eine ausreichend hohe Affinität zur selbstständigen Komplementation als auch die Zielsetzung das Fragment, welches an das Zielprotein gekoppelt werden soll, möglichst klein zu halten (Cabantous et al. 2005) und natürlich dürfen beide Fragmente einzeln nicht fluoreszieren. Daher wurde das „*superfolder*“ GFP an Aminosäureposition 214 getrennt. Das Fusionsfragment 214-238 entspricht dem letzten β -Strang (GFP11) des GFP, während die ersten 10 Stränge (1-214, GFP1-10) sowie der Chromophor dem größeren Komplementärfragment entsprechen. Mit dieser Methode wurden 18 verschiedene Proteine von *Pyrobaculum aerophilum* als Fusionsprotein mit GFP11 in *E. coli* exprimiert und auf ihre Löslichkeit hin untersucht. Dabei wurden entweder die löslichen Lysate oder die unlöslichen Sediment Fraktionen mit isoliertem GFP1-10 vereinigt und die Fluoreszenzentwicklung beobachtet. Obwohl die Autoren dieser Studie feststellten, dass 50 % des GFP1-10

in löslicher Form vorlagen, benutzten sie dennoch das unlösliche GFP1-10 aus den Einschlusskörperchen und brachten dieses durch Denaturierung mit 9 M Harnstoff in Lösung. Die Renaturierung der Proteine wurde durch zügiges Verdünnen der Harnstoff-Protein-Lösung erreicht.

Beim Einsatz der Komplementationsanalyse zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen, dürfen die nicht fluoreszierenden Fragmente keine ausreichend hohe Affinität zueinander besitzen, dass sie spontan zusammenfinden können. Die Komplementation darf erst dann möglich werden, wenn die Fragmente durch ihre interagierenden Fusionsproteine in räumliche Nähe gebracht werden. Dieses Kriterium wird erfüllt, wenn YFP an Aminosäureposition 155 oder 173 getrennt wird (Hu et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die Fragmente 1-154 (YN) und 155-238 (YC) des gelb fluoreszierenden Proteins für die Komplementationsanalyse verwendet. In diese Fragmente wurden die folgenden „*superfolder*“ Mutationen mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt: S30R, Y39I, F64L, F99S, N105K, E111V, I128T, Y145F, M153T in YN und V163A, K166T, I167V, I171V, S205T, A206V in YC (siehe Kapitel 6.1). Diese 15 Mutationen ergeben sich aus einer Kombination der „*cycle-3*“ Mutationen (Cramer et al. 1996), der Mutation F99S aus eGFP (Patterson et al. 1997) und den „*superfolder*“ Mutationen aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe Waldo (Cabantous et al. 2005, Pédelacq et al. 2006). So entstand ein neuartiges, geteiltes „*superfolder*“ YFP, welches zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit BiFC eingesetzt wurde. Die obengenannten Faltungsverbessernden Mutationen ermöglichten eine gute Expression der BiFC Fusionsproteine in *E. coli* in zumindest teilweise (ca. 40 %) löslicher Form. Eine anschließende Aufreinigung der mit einem N-terminalen Histidin Hexapeptid versehenen Fusionsproteine war unter nativen Bedingungen über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie möglich und erzielte Ausbeuten von zwei bis zehn mg/L. Unter diesen Bedingungen wurden folgende „*superfolder*“ BiFC Fusionsproteine in löslicher Form, nativ aufgereinigt: HRas-YC und Raf1RBD-YN sowie 14-3-3-YC und YN-CT52 (siehe Kapitel 6.1). Die Proteine waren über mehrere Zyklen des Einfrierens und Auftauens stabil und wurden bis zu ihrem Einsatz für die *in vitro* BiFC bei -80°C verwahrt. Darüber hinaus wurde ein „*superfolder*“ YFP bestehend aus einer einzigen Aminosäurekette exprimiert, bei dem die beiden Fragmente YN und YC durch eine 24 Aminosäuren lange, flexible Verbindungssequenz getrennt waren. Dieses Protein weist die gleichen Anregungs- und Emissionsspektren wie normales

YFP auf (siehe Kapitel 6.1), was zeigt, dass die 15 Mutationen die spektralen Eigenschaften des Proteins nicht verändert haben. Um die strukturellen Veränderungen aufzuklären, welche die verbesserte Löslichkeit des „*superfolder*“ YFPs vermitteln, wurde dieses Konstrukt für die Kristallisation eingesetzt.

3.2 Strukturaufklärung der „*superfolder*“ Variante von YFP

Das im vorherigen Kapitel beschriebene Konstrukt des „*superfolder*“ YFP, bei dem die zwei BiFC Fragmente YN und YC durch eine 24 Aminosäuren lange, bewegliche Verbindungssequenz getrennt sind, ließ sich problemlos als lösliches, bereits gelb fluoreszierendes Protein exprimieren. Kristallisationsansätze mit dem unbehandelten Protein bildeten zwar Kristalle, deren Röntgenbeugung jedoch keine höhere Auflösung als 4 Å erreichte. Daher wurde das „*superfolder*“ YFP zunächst mit Proteinase K behandelt und anschließend erneut kristallisiert. Die Kristallstruktur des so vorbehandelten Proteins konnte zu einer Auflösung von 2.7 Å gelöst werden. Im Gegensatz zum „*superfolder*“ GFP (Pédelacq et al. 2006) kristallisierte „*superfolder*“ YFP als Dimer. Die Aminosäuresubstitution A206V, welche die Dimerisierung von „*superfolder*“ GFP verhindern soll, ist in der vorliegenden „*superfolder*“ YFP Struktur mit einer Dimerisierung vereinbar. Die Berührungsfläche von F223 und A206 wurden als kritische Position für Mutationen, welche die Dimerbildung von GFP unterbrechen identifiziert (Zacharias et al. 2002). In der erwähnten GFP Struktur (Pédelacq et al. 2006) wurde ein sehr geringer Abstand (1.97 Å) zwischen V206 und F223 gefunden, welcher unter Umständen die Dimerbildung blockiert. In der hier gelösten „*superfolder*“ YFP Struktur liegen die Atome der Seitenkette V206 mindestens 3.5 Å von der Phenylgruppe von F223 entfernt, so dass hier eine Behinderung der Dimerisierung ausgeschlossen wird. Dies stimmt mit dem Elutionsverhalten des Konstruktes bei einer Gelfiltration überein (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Wesentlichen entspricht die „*superfolder*“ YFP Struktur der Struktur von unmodifiziertem YFP mit einer mittleren quadratischen Abweichung (rmsd, *root mean square deviation*) von 0.5 Å (Vergleich von 224 C α -Atomen der beiden Strukturen). Interpretierbare Elektronendichte konnte für 228 der 238 Reste gefunden werden. Von den 24 Aminosäuren der Verbindungssequenz konnten lediglich vier identifiziert werden konnten. Dies begründet sich entweder in der hohen Beweglichkeit dieser

Sequenz oder in der Möglichkeit, dass dieser Teil der Aminosäurekette durch die Behandlung mit Proteinase K degradiert wurde.

3.3 Strukturelle Hinweise auf die verbesserte Stabilität von „*superfolder*“ YFP

Die Bestimmung der Kristallstruktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse von „*superfolder*“ YFP ergab verschiedene Hinweise auf die Auswirkungen der 15 eingeführten Mutationen bezüglich der Stabilität und Löslichkeit des Proteins. Die wichtigste Mutation ist in dieser Hinsicht der Austausch des Serins gegen ein Arginin an Position 30 (S30R) auf dem zweiten β -Strang. Im Falle des „*superfolder*“ GFPs zeigte sich ein intramolekulares, ionisches Netzwerk aus fünf spezifischen Aminosäureresten: R30, E17, E32, E115, R122 (Pédelacq et al. 2006). Ein derartiges Netzwerk trägt mutmaßlich zur allgemeinen Stabilität bei, weil die Organisation von Ionenpaaren in Netzwerken thermodynamisch bevorzugt wird gegenüber einzelnen Ionenpaaren (Yip et al. 1995). In der hier gelösten YFP „*superfolder*“ Struktur befindet sich ein ähnliches Netzwerk, mit der Ausnahme, dass D19 anstelle von E32 involviert ist (siehe Kapitel 6.1). Diese Seitenkette von D19 steht in Verbindung mit R30 über dessen η Stickstoffatome. Gleichzeitig steht R30 über sein ϵ Stickstoffatom in Kontakt mit der Seitenkette von E17. Interessanterweise ist Arginin die einzige natürliche Aminosäure, die solch eine bidirektionale, simultane Verbindung mit einer Glutamat und einer Aspartat Seitenkette eingehen kann. In der Verbindungsschleife zwischen dem zweiten und dritten β -Strang wurde ein Tyrosin zu einem Isoleucin mutiert. Hier fand also der Austausch einer größeren, aromatischen Seitenkette gegen eine kleinere, nicht aromatische Seitenkette statt, was möglicherweise die Windung der Verbindungsschleife stabilisiert. Die Aminosäuresubstitution F99S verbessert mutmaßlich die Löslichkeit, da das hydrophobe Phenylalanin normalerweise der wässrigen Umgebung ausgesetzt ist und hier gegen das hydrophilere Serin ausgetauscht wurde. Auf ähnliche Weise tragen die Mutationen V163A, I167V und I171V zur verbesserten Expression und Stabilität des YC Fragmentes bei, da die Seitenketten dieser Reste Teile des hydrophoben Kerns sind und in Folge der Zerteilung des YFPs der wässrigen Umgebung zugewandt werden. Durch den Austausch hin zu kleineren

Seitenketten minimieren diese Substitutionen die hydrophobe Oberfläche des C-terminalen Fragmentes und führen so zu einer verbesserten Löslichkeit (siehe Kapitel 6.1).

3.4 *In vitro* Rekonstitution von „*superfolder*“ YFP mittels BiFC

Für die BiFC *in vitro* Analysen wurden zwei von einander unabhängige Protein-Interaktionspaare ausgewählt. Das kleine monomere G-Protein HRas und die Bindedomäne ihres Effektors, der Raf1 Kinase (Raf1RBD), sind gut charakterisiert und eine Bindung zwischen ihnen ist eindeutig nachgewiesen (Vojtek et al. 1993). Aufgrund ihrer maßgeblichen Beteiligung an der Entstehung von 30 % der humanen Krebsarten (Chong et al. 2003), ist diese Interaktion auf der Suche nach einem Hochdurchsatz Rasterverfahren für inhibitorische Kleinmoleküle von besonderem Interesse. Zusätzlich wurde als Interaktionspaar ein 14-3-3 Protein und der regulatorische C-Terminus der Pflanzen Plasmamembran Protonen-ATPase (CT52) ausgewählt. Der Komplex aus der aktivierten Protonen-ATPase und dem 14-3-3 Protein kann durch das Toxin Fusicoccin (aus dem Pilz *Fusicoccum amygdali*) stabilisiert werden, was die dauerhafte Öffnung der Stomata der Pflanze und somit ihr Austrocknen zur Folge hat (Oecking et al. 1997, Würtele et al. 2003). Für die Entwicklung eines Hochdurchsatz Rasterverfahrens eignet sich diese Wechselwirkung gut als Beispiel-Interaktion für die Suche nach stabilisierenden Kleinmolekülen. Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung der „*superfolder*“ BiFC Fusionsproteine wurde die Rekonstitution des funktionalen Fluorophors in Folge der Bindung der Fusionspartner getestet. Da für diese Analyse keine vergleichbaren Studien vorlagen, wurden zunächst die Pufferbedingungen optimiert. Hierfür wurden verschiedene Puffersysteme, unterschiedliche pH-Werte sowie variierende Salzkonzentrationen getestet. Beide Interaktionspaare entwickelten keine Fluoreszenz bei einem pH-Wert von 7.2 (siehe Kapitel 6.1). Eine graduelle Erhöhung des pH-Wertes steigerte die Fluoreszenzentwicklung und somit die Komplementationeffizienz, wobei ein Maximum bei pH 8.8 für beide Reaktionen erreicht wurde. Diese Tendenz stimmt in etwa mit den Beobachtungen der pH-Sensitivität von YFP Fluoreszenz überein (Miyawaki et al. 1999). In der genannten Studie tritt bei pH 6 erstmals Fluoreszenz auf, erreicht einen halb-maximalen Wert

bei pH 7 und ihr Maximum bei einem pH von 8.5. In dieser Hinsicht unterscheidet sich das „*superfolder*“ BiFC YFP also von normalem YFP durch ein sensitiveres Verhalten gegenüber niedrigeren pH-Werten. Hierbei gilt es zu bedenken, dass das in diesem Test verwendete „*superfolder*“ YFP erst dann komplementiert und sein Chromophor ausbildet, wenn die beiden fusionierten Proteine in Interaktion treten. Somit hängt die Fluoreszenzentwicklung auch von der Sensitivität der fusionierten Interaktionspaare gegenüber unterschiedlichen pH-Werten ab. Diese Überlegung wird gestützt durch die Tatsache, dass eine im Verhältnis betrachtete größere Steigerung der Fluoreszenzentwicklung bei der HRas-YC/Raf1RBD-YN zwischen pH 7.2 und 7.4 zu beobachten ist, während die signifikant größte Steigung der 14-3-3-YC/YN-CT52 Interaktion zwischen pH 7.4 und 7.6 festzustellen ist. Gleichwohl liegt allerdings die Vermutung nahe, dass die pH-Abhängigkeit zum größten Teil von der Chromophorbildung bestimmt wird, da die eigentlichen pH-Optima der untersuchten Interaktionen eher im physiologischen, bis leicht sauren Bereich liegen. Als optimales Puffersystem wurde ein Tris/HCl Puffer gewählt mit einem pH-Wert von 8.8. Dieser Puffer wurde auch für beide Interaktionspaare eingesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Bei der Auswahl des besten Puffersystems ist die Salzkonzentration nicht zu vernachlässigen. Hier zeigten die zwei untersuchten Interaktionspaare überraschenderweise gegenteilige Ergebnisse. Während sich die Fluoreszenzentwicklung bei HRas-YC/Raf1RBD-YN mit steigenden NaCl Konzentrationen verbesserte, so wurde selbige unter gleichen Bedingungen bei den Messungen mit 14-3-3-YC/YN-CT52 schlechter. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der pH-Abhängigkeit bestärkt dieses Ergebnis die Interpretation, dass zumindest für bestimmte Parameter die Interaktion der Fusionspartner entscheidend ist, damit sich das funktionale „*superfolder*“ YFP aus den BiFC Fragmenten ausbilden kann. Zusammenfassend kann man zu den Ergebnissen der Pufferoptimierung sagen, dass es keinen universell einsetzbaren optimalen Puffer für die BiFC *in vitro* Analyse gibt, sondern für die jeweilig untersuchte Interaktion eine individuelle Optimierung der Pufferbedingungen ratsam erscheint.

Das Prinzip der BiFC beruht auf der Tatsache, dass die beiden Hälften des YFPs nicht spontan komplementieren können, sondern zunächst in räumliche Nähe gebracht werden müssen. Transfektionsexperimente in eukaryotische Zellen mit den Fragmenten allein, das heißt ohne Fusion an interagierende Proteine zeigten keine Fluoreszenzentwicklung (eigene unveröffentlichte Ergebnisse), was diese These

unterstützen würde. Ebenso zeigten *in vivo* Experimente mit Fusionsproteinen, welche in ihrer Bindedomäne mutiert sind, keine Fluoreszenzentwicklung (Hu et al. 2002, siehe Kapitel 6.1). Ob jedoch die fusionierten YFP-Hälften die Affinitäten der zu untersuchenden Interaktionspartner zueinander verändern, ist bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Frage mit Hilfe von Wettbewerbsversuchen adressiert. Hierfür wurde jeweils ein vierfacher Überschuss an unmarkiertem Protein (HRas, Raf1RBD, 14-3-3, CT52) zu dem entsprechenden Interaktionspaar hinzugegeben und die Fluoreszenzentwicklung aufgezeichnet. In keinem Fall bewirkte die Konkurrenz durch unmarkiertes Protein eine signifikante Veränderung der Fluoreszenzentwicklung. Auch wenn die erreichten Maximalwerte sich scheinbar unterscheiden, so liegt dies wohl eher an sekundären Effekten wie z. B. Quenching oder ungenauen Proteinkonzentrationen. Eine effektive Konkurrenz würde in erster Linie die Kinetik der Fluoreszenzentwicklung verändern, nicht ihren Maximalwert. Die erwartete verzögerte Fluorophorausbildung mit einer geringeren Steigung, des Fluoreszenzsignals konnte in keinem der vier getesteten Fälle beobachtet werden (siehe Kapitel 6.1). Da die Konkurrenz der Komplexbildung mit unmarkierten Proteinen nicht möglich ist, lässt das auf eine erhöhte Affinität der BiFC Fusionsproteine zueinander schließen. Darüber hinaus wurde durch die Zugabe des RasGAPs Neurofibromin-1 (NF-1) erwartet, dass die HRas/Raf1RBD Interaktion terminiert wird, da die Hydrolyse des Nukleotids Ras in die inaktive Konformation bringt und somit die Bindung an das Effektorfragment Raf1RBD lösen sollte. Dies konnte jedoch nicht anhand eines veränderten Fluoreszenzsignals festgestellt werden. Daher wird vermutet, dass die komplementierenden YFP Fragmente einen irreversiblen Komplex ausbilden. Im Gegensatz dazu publizierten Hu et al., dass die Interaktion von bFos-YC und bJun-YN, welche aus Einschlusskörperchen isoliert und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden, erfolgreich mit unmarkiertem Protein kompetitiert werden konnte (Hu et al. 2002). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass die Fluorophorausbildung verhindert werden konnte, wenn ein Konstrukt mit mutierter Bindedomäne verwendet wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden BiFC Konstrukte verwendet, welche durch gezielte Mutation nur noch mit verringerter Affinität an Ras binden (Raf1RBD K84A) oder gar nicht mehr (Raf1RBD R89L) (Block et al. 1996). Beide Mutationen zeigten im Test mit HRas-YC überraschenderweise keine Veränderung der Fluoreszenzentwicklung (siehe Kapitel 6.1). Diese Diskrepanz basiert unter Umständen darauf, dass Hu und

Kollegen YFP verwendet haben und die Interaktionspartner gemeinsam renaturiert wurden, während in dieser Arbeit „*superfolder*“ YFP und nativ aufgereinigte Proteine benutzt wurden. Nichtsdestotrotz geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anlass zu der Vermutung, dass die „*superfolder*“ YFP Fragmente die Bindungsaffinitäten der Fusionsproteine verändern. Dies wäre ein gravierender Nachteil für die Anwendbarkeit der *in vitro* BiFC Analyse.

Für die 14-3-3-YC/YN-CT52 Interaktion gibt es ein stabilisierendes Kleinmolekül, Fusicoccin (Würtele et al. 2003), das aus einem Pflanzenpathogen isoliert wurde. Fusicoccin festigt die Bindung von 14-3-3 an CT52 sogar unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von CT52 (Ottmann et al. 2007), obwohl 14-3-3 normalerweise nicht an unphosphoryliertes CT52 bindet. Da die BiFC Fusionsproteine in dieser Arbeit in *E. coli* exprimiert wurden, lagen sie in unphosphorylierter Form vor. Deshalb wurde erwartet, dass die Zugabe von Fusicoccin notwendig sei, um eine Bindung von 14-3-3 an CT52 und somit die Ausbildung des fluoreszierenden BiFC Komplexes zu detektieren. Erstaunlicherweise hatte die An- oder Abwesenheit von Fusicoccin keinerlei Effekt auf die Fluoreszenzentwicklung bei Beobachtung der 14-3-3-YC/YN-CT52 Interaktion. Dieses Ergebnis zusammengekommen mit den Ergebnissen der Competitionstests und der Unwirksamkeit der Bindungsmutationen von Raf1RBD (K84A, R89L), führte zu dem bedenklichen Schluss, dass die „*superfolder*“ YFP Komplementation ausschließlich durch die Interaktion der beiden YFP Fragmente herbeigeführt wird. Um der Frage, ob die „*superfolder*“ YFP Fragmente unspezifische Bindungen und somit falsch-positive Ergebnisse in BiFC *in vitro* Interaktionsstudien produzieren, auf den Grund zu gehen, wurden schließlich HRas-YC und YN-CT52 bzw. 14-3-3-YC und Raf1RBD-YN gemeinsam auf Fluoreszenz hin untersucht. Im Falle von HRas-YC und YN-CT52 konnte keinerlei Fluoreszenzentwicklung beobachtet werden. Dahingegen lieferte 14-3-3-YC/Raf1RBD-YN jedoch ein deutliches Fluoreszenzsignal, wenn auch mit einer zeitlich verzögerten Kinetik (siehe Kapitel 6.1). 14-3-3 Proteine binden nachgewiesenermaßen an den N-Terminus von Raf1 über verschiedene Phosphorylierungsstellen (Dumaz und Marais 2003, Muslin et al. 1996). Auch wenn das hier verwendete Raf1RBD Konstrukt nur die Reste 53-131 enthält, so ist eine Bindung dieses Teils von Raf1 mit geringer Affinität an 14-3-3 denkbar, da die Bindung von Ras und 14-3-3 an Raf1 sich offenbar gegenseitig ausschließen (siehe Kapitel 6.2). Dennoch wurde eine solche Interaktion zwischen

der Ras-Bindedomäne von Raf1 an 14-3-3 bisher noch nicht beschrieben und stellt daher wahrscheinlich ein Artefakt der „*superfolder*“ BiFC *in vitro* dar. Andererseits scheint die Ausbildung des Fluorophors jedoch nicht ausschließlich, zumindest nicht in jedem Fall, durch die YFP Hälften vermittelt zu werden, da keinerlei Fluoreszenz detektiert werden konnte, wenn HRas-YC und YN-CT52 gemessen wurden. Eine sterische Behinderung der Komplementation ist in diesem Fall nahezu auszuschließen, da CT52 ein eher kleines Peptid darstellt und zusammengenommen mit einer ausreichend langen Verbindungssequenz zwischen den Fusionspartnern eine Komplementation zwischen HRas-YC und YN-CT52 durchaus denkbar wäre, wenn die Affinität der YFP Fragmente ausreichen würde, um spontan zu komplementieren. Die YFP Fragmente 1-154 und 155-238 wurden deshalb für die BiFC Analyse ausgewählt, da diese Fragmente *in vivo* keine ausreichend hohe Affinität zueinander aufweisen, um spontan komplementieren zu können (Hu et al. 2002 und 2003). Ob dies allerdings auch für nativ aufgereinigten „*superfolder*“ BiFC Fusionsproteine im *in vitro* Versuch gilt, ist nicht bekannt. Komplementationsversuche mit den Fragmenten allein könnten Aufschluss darüber geben, jedoch ist die Expression der Fragmente allein höchstwahrscheinlich problematisch.

In allen Messungen mit dem optimalen Puffer erreichte die relative Fluoreszenz ihren halb-maximal Wert nach etwas drei bis vier Stunden. Dieser Zeitverlauf lässt sich mit der Oxidation des Chromophors erklären, welche notwendig ist, um ein Fluoreszenzsignal zu generieren (Cody et al. 1993). Wenn die *in vitro* BiFC als Methode für ein qualitatives Rasterverfahren zur Detektion von Proteinkomplex inhibierenden oder stabilisierenden Kleinmolekülen in Betracht gezogen wird, ist die Frage nach der Geschwindigkeit der Chromophorausbildung vielleicht nicht entscheidend. Nichtsdestotrotz muss darauf hingewiesen werden, dass dynamische Prozesse mit dieser Methode nicht beobachtet werden können. Die *in vitro* BiFC kann lediglich Auskunft über Bindung oder nicht Bindung zweier Proteine geben. Hu und Kollegen berichten die halb-maximale Fluoreszenz nach etwa 50 Minuten detektiert zu haben (Hu et al. 2002). Dieses Ergebnis gibt Hinweise darauf, dass der Zyklisierungsprozess des chromophoren Tripeptides (Ser65-Tyr66-Gly67) im N-terminalen Teil des YFP Fragmentes bereits abgeschlossen ist und zur Ausbildung der Fluoreszenz nur noch die Komplementation durch das C-terminale Fragment notwendig ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen jedoch eher dafür,

dass die Chromophorausreifung erst nach der Komplementation stattfindet, da die hier beobachteten Zeitverläufe der Chromophorausbildung des „*superfolder*“ YFPs in etwa mit der Reifung des GFP Chromophors übereinstimmen (Heim et al. 1994).

Abschließend lässt sich zu dem Unterfangen, die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation auf ein *in vitro* Verfahren zu adaptieren, sagen, dass sich einige Nachteile dieses Ansatzes im Laufe der vorliegenden Arbeit herauskristallisiert haben. Auch wenn die *in vitro* BiFC eventuell das Potenzial birgt sehr schwache oder transiente Protein-Protein-Komplexe nachzuweisen, so muss der allgemeine Einsatz dieser Methode z. B. zur Etablierung eines Hochdurchsatz Rasterverfahrens zur Identifizierung von Kleinmolekülen in Frage gestellt werden. Zumindest sollte die Anwendbarkeit durch aussagekräftige Negativkontrollen für jede einzelne zu untersuchende Protein-Protein-Wechselwirkung überprüft werden.

3.5 *In vivo* BiFC Analysen

Die BiFC ist für die Beobachtung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen inzwischen gut etabliert. Dabei konnte sie in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien angewendet werden (Grinberg et al. 2004), in Pflanzenzellen (Bracha-Drori et al. 2004), in *E.coli* (Magliery et al. 2004) und auch in Pilzen (Bardiya et al. 2008). Zur Kontrolle der hier erstellten BiFC *in vitro* Ergebnisse wurden beide verwendeten Interaktionspaare (YC-HRas/Raf1RBD-YN und 14-3-3-YC/YN-CT52) auch *in vivo* getestet. Hierfür wurden YC-HRas und Raf1RBD-YN in COS 7 Zellen und 14-3-3-YC und YN-CT52 in HEK 293 Zellen transfiziert und die Zellen am folgenden Tag auf YFP Fluoreszenz hin untersucht. Die Transfektion von YC-HRas/Raf1RBD-YN zeigte eine deutliche Fluoreszenz an Plasmamembran und Golgi-Apparat. An diesen Lokalisationen wurde auch in früheren Studien schon aktiviertes Ras und Raf1RBD nachgewiesen (vergleiche: Choy et al. 1999, Chiu et al. 2002). 14-3-3 Proteine sind zwischen Pflanzen und Säugern hochkonserviert und normalerweise hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, daher zeigten die mit den löslichen Regionen der pflanzlichen Proteine 14-3-3-YC/YN-CT52 transfizierten humanen Zellen erwartungsgemäß eine Fluoreszenz des Cytoplasmas (siehe Kapitel 6.1). Zellen, die mit den Konstrukten YC-HRas/Raf1RBD-YN K84A oder R89L (Mutationen in der Kontaktregion von HRas und Raf1RBD) transfiziert wurden entwickelten keine Fluoreszenz. Gleichermäßen entwickelten Zellen, die mit YN-CT52 und YC-HRas

bzw. 14-3-3-YC und Raf1RBD-YN transfiziert wurden, kein Fluoreszenzsignal. Negativkontrollen mit den Fragmenten allein zeigten ebenfalls keine Fluoreszenz (z. B. YC-HRas und YN oder Raf1RBD-YN und YC).

Darüber hinaus wurde die BiFC *in vivo* als Nachweis dafür eingesetzt, dass die im Kapitel 3.6 besprochenen Lokalisationen von GFP-Raf1, auf der Interaktion von Raf1 mit entweder Ras oder 14-3-3, beruhen. Die Ras Bindedomäne (RBD) und die 14-3-3 Bindedomäne von Raf1 sind beide N-terminal lokalisiert. Da eine Interaktion von Raf1 mit HRas zur Aktivierung der Kinaseaktivität und somit zur Weiterleitung des Signals für Wachstum, Proliferation oder Differenzierung führt, während die Bindung von Raf1 an 14-3-3 den inaktiven Zustand der Kinase stabilisiert, liegt die Annahme nahe, dass Raf1 nur entweder mit HRas oder mit 14-3-3 Proteinen interagieren kann und sich die beiden Interaktionen gegenseitig ausschließen. Um diese Annahme zu überprüfen wurden HEK 293 Zellen mit YN-Raf1₁₋₂₆₄ und YC-14-3-3 ζ oder YC-HRas transfiziert. In beiden Fällen konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal und somit eine Interaktion detektiert werden. Die Interaktionen zeigten erwartungsgemäß unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Interagiert YN-Raf1₁₋₂₆₄ WT mit YC-14-3-3 ζ so kann die Fluoreszenz des BiFC Komplexes im Cytoplasma nachgewiesen werden, während eine Interaktion zwischen YN-Raf1₁₋₂₆₄ WT und YC-HRas an der Plasmamembran und am Golgiapparat lokalisiert sind (siehe Kapitel 6.2). Die Mutation der 14-3-3 Bindestelle von Raf1 an Serin 259 zu Phenylalanin (S259F) verhindert die Bindung an YC-14-3-3 ζ und entwickelt daher keine Fluoreszenz in der BiFC Analyse. Das gleiche Konstrukt interagiert dabei unverändert mit YC-HRas (siehe Kapitel 6.2). Andererseits konnte die Interaktion zwischen Raf1 und HRas unterbunden werden, durch den Austausch von Arginin 89 (R89L) in der Ras Bindedomäne von Raf1 (vergleiche: Block et al. 1996), wobei diese Mutation keinerlei Effekt auf die Bindung an 14-3-3 ζ zeigte. Ein Raf1 Konstrukt, welches beide Mutationen trägt (S259F, R89L) zeigte weder mit 14-3-3 ζ noch mit HRas eine Interaktion. Weitere Mutationen im Bereich der 14-3-3 Bindedomäne (S257L, T260R, P261S, P261L, V263A) zeigten den gleichen Effekt wie die Mutation S259F indem die Interaktion mit 14-3-3 verhindert wurde, die Bindung an HRas davon aber nicht beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse befürworten die Hypothese, dass die Konkurrenz von Ras und 14-3-3 Proteinen um die Bindung an Raf1 entscheidend ist, ob der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg aktiviert oder inhibiert wird.

3.6 Raf1 Lokalisation in Abhängigkeit der Bindung an 14-3-3 Proteine

Die Entwicklungsstörungen Noonan und LEOPARD Syndrom sind durch eine erhöhte Aktivität in der Ras-Raf-MEK-ERK Signalübertragung charakterisiert. Als Ursache hierfür wurden neun Mutationen in der Umgebung von Serin 259 der Raf1 Kinase gefunden. Serin 259 ist einer der kritischen Reste, die für die Interaktion der Raf1 Kinase mit 14-3-3 Proteinen und somit der inhibitorischen Regulation verantwortlich ist. Eine Modulation der Raf1/14-3-3 Interaktion könnte in therapeutischer Hinsicht interessant sein was Krankheiten mit einem verstärkt aktivierten Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg betrifft. In der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der Raf1 Kinase in Abhängigkeit von der Bindung an Ras oder 14-3-3 Proteine mit Hilfe von GFP Fusionsproteinen in HEK 293 Zellen untersucht. Raf1 wird aktiviert durch die Ras-vermittelte Rekrutierung an die Plasmamembran (Stokoe et al. 1994, Marais et al. 1995). Diesem Prozess wirkt die Bindung von 14-3-3 Proteinen an den N-Terminus von Raf1 entgegen, indem die Kinase im Cytoplasma gehalten wird (Dumaz und Marais 2003, Light et al. 2002). Hierbei liegen zwei inhibitorische 14-3-3 Bindestellen auf dem N-Terminus von Raf1 (S233 und S259) und einer dritten Bindestelle, S621, wird eine aktivierende Funktion zugeschrieben (Tzivion et al. 1998, Yip-Schneider et al. 2000). Der Aktivitätsstatus von Raf1 wird also im Wesentlichen über die Bindung an Ras oder 14-3-3 Proteine widergespiegelt. In der vorliegenden Arbeit wurden GFP-Raf1 Fusionsproteine verwendet, welche die ersten 264 Aminosäuren der Raf1-Kinase, und somit auch die Ras Bindedomäne sowie die beiden inhibitorischen 14-3-3 Bindestellen enthalten. Die C-terminale Domäne von Raf1, welche die Kinase Aktivität vermittelt, fehlt in dem verwendeten Konstrukt, da eine starke Überexpression einer aktiven Kinase erhebliche Schwierigkeiten bezüglich der Vitalität der Zellen mit sich bringen kann. Mit diesen Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die in Noonan und LEOPARD Syndrom auftretenden Mutationen um S259, die Lokalisation von Raf1 in der lebenden Zelle signifikant verändern. So kann Raf1 durch eine Deregulation der Bindung an 14-3-3 Proteine infolge von Mutationen in der Kontaktregion nicht mehr effizient im Cytoplasma gehalten werden und wird vermehrt an die Plasmamembran rekrutiert. Damit einher geht eine erhöhte Interaktion mit Ras und eine möglicherweise verstärkte Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges. Die vorliegende Arbeit untermauert somit die Hypothese, dass eine Bindung von 14-3-3

Proteinen an den N-Terminus von Raf1 die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade abschwächt, da sie die Lokalisation von Raf1 im Cytoplasma festlegt. Hinsichtlich der Tatsache, dass die Ras Bindedomäne (RBD) ebenso wie zwei der 14-3-3 Bindestellen auf dem N-Terminus von Raf1 lokalisiert sind und angesichts dessen, dass eine Interaktion von Raf1 mit Ras oder 14-3-3 Proteinen gegensätzliche funktionale Auswirkungen hat, liegt die Interpretation nahe, dass sich die Assoziation mit diesen beiden Raf1 Interaktionspartnern gegenseitig ausschließt. Die hier gezeigten Lokalisationsstudien illustrieren die Relevanz der subzellulären Verteilung der Raf1 Protein Kinase für seine biologische Aktivität. Darüber hinaus weisen Patienten mit Noonan oder LEOPARD Syndrom nicht nur Störungen in ihrer Entwicklung auf, sondern entwickeln auch eine erhöhte Neigung zu verschiedenen malignen Erkrankungen (Schubbert et al. 2007). Dies ist nicht verwunderlich, da in 30 % aller humanen Tumore der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg eine erhöhte Aktivität aufweist (Downward 2003). Es wurden einige Mutationen von Raf1 mit humanen Krebsarten in Verbindung gebracht (Emuss et al. 2005). Zudem ist die Aminosäuresubstitution S259A eine von zwei Raf1 Mutationen, die in der COSMIC Datenbank zu finden sind (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/). Zusätzlich zu der Aufklärung, wie die Raf1 Mutationen der 14-3-3 Binderegion den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg in einigen Patienten mit Noonan und LEOPARD Syndrom aktivieren, lässt sich als Schluss dieser Ergebnisse folgern, dass ein Eingreifen in diese regulatorischen Proteinkomplexe durchaus von therapeutischem Interesse ist. Diese Intervention könnte durch die Stabilisierung eines existierenden Raf1/14-3-3 Komplexes mittels eines spezifischen Kleinmoleküls erreicht werden. Wie die strukturelle Analyse des Pflanzenpathogens Fusicoccin auf die regulatorische Interaktion von 14-3-3 und der pflanzlichen Protonen ATPase gezeigt hat (Würtele et al. 2003, Ottmann et al. 2007) können solche kleinen Moleküle drastische physiologische Folgen nach sich ziehen. Die entscheidende Frage in dieser Hinsicht ist die Eignung eines Raf1/14-3-3 Protein Komplexes für eine entsprechende Stabilisierung. Dieses Molekül müsste kleiner sein als Fusicoccin, da in der Kontaktregion zwischen Raf1 und 14-3-3 weniger Platz frei bleibt als im Falle von 14-3-3 und der Protonen-ATPase (siehe Kapitel 6.2). Mit Hilfe eines geeigneten Rasterverfahrens könnte man die Suche nach einem solchen Molekül adressieren. Die Bemühung in dieser Arbeit ein solches Verfahren durch die Adaption der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation für die *in vitro* Analyse zu entwickeln ließ sich nur teilweise realisieren.

IV. Zusammenfassung

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen ist von elementarer Bedeutung für das Verständnis der Regulation zellulärer Prozesse im gesunden wie im kranken Organismus. Denn erst nach dem Verstehen, wie eine veränderte Protein-Protein-Wechselwirkung den Krankheitsverlauf bestimmt, können Ansätze entwickelt werden, um diese Wechselwirkungen therapeutisch zu beeinflussen. Somit sind Nachweismethoden, die eine unkomplizierte Auswertung ermöglichen, insbesondere auch bei der Suche nach Möglichkeiten, in solche zellulären Regelprozesse einzugreifen z. B. durch kleine Wirkstoffmoleküle von besonders hohem Interesse. Solche Methoden sollten sich für ein Hochdurchsatz Rasterverfahren (HTS – *high throughput screening*) eignen, damit ganze Substanzbibliotheken nach geeigneten Wirkstoffkandidaten durchsucht werden können.

In den letzten Jahren hat sich die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zu einer erfolgreichen *in vivo* Nachweismethode für Protein-Protein-Interaktionen etabliert. *In vitro* BiFC Studien sind dagegen bisher nicht veröffentlicht worden. Dies mag an der Unlöslichkeit der Fusionsproteine liegen, die durch die Fragmente des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die BiFC auf *in vitro* Anwendungen übertragen, mit der Absicht sie eventuell für den Einsatz als HTS Methode weiterzuentwickeln. Hierfür wurden die Fragmente des YFPs durch Mutationen, welche die Faltungseigenschaften verbessern, in lösliche Form gebracht und für die *in vitro* BiFC eingesetzt. Anhand von zwei Interaktionen (siehe nächster Abschnitt) wurde überprüft, ob sich die *in vitro* BiFC für die Suche nach modulatorischen Molekülen eignet. Die Ergebnisse der *in vitro* BiFC ernüchterten jedoch das Bestreben, aus dieser Methode ein HTS Verfahren für die Suche nach modulatorischen Kleinmolekülen zu entwickeln, da die Bindungsaffinitäten der Interaktionspartner, durch die Komplementation verändert werden. Konkurrenzexperimente mit unmarkierten Proteinen konnten die Fluoreszenzentwicklung und somit die betrachtete Interaktion ebenso wenig beeinflussen, wie die Verwendung von bekanntermaßen bindungsschwächenden Mutationen in der Kontaktfläche der interagierenden Proteine. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass BiFC Fusionsproteine *in vitro* unspezifische Bindungen erzeugen und somit falsch positive Ergebnisse liefern können. Der

Einsatz der BiFC *in vivo* zeigte davon abweichend gute Ergebnisse und bestätigt die Anwendbarkeit dieser Methode in lebenden Zellen.

Für die BiFC *in vitro* und *in vivo* wurden jeweils zwei Interaktionen gewählt. Eine davon ist die Interaktion von HRas mit der Raf1 Kinase. Sie stellt den Beginn der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade dar, die in Krankheiten wie Krebs oder Entwicklungsstörungen wie dem Noonan Syndrom eine erhöhte Aktivität aufweist. Der Einsatz von kleinen Molekülen, welche diese Interaktion inhibieren, könnte von therapeutischem Nutzen sein. Bei der anderen untersuchten Interaktion handelt es sich um die Wechselwirkung von 14-3-3 Proteinen und dem regulatorischen C-Terminus der Pflanzen Plasmamembran Protonen-ATPase. Diese Interaktion liefert ein gutes Beispiel für die Wirkung von modulatorischen Molekülen, da sie durch das kleine Molekül Fusicoccin stabilisiert wird.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit auch Lokalisationsstudien der intrazellulären Lokalisationsänderung der Raf1 Kinase in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes durchgeführt. Hierbei half der Einsatz von GFP Fusionsproteinen und der *in vivo* BiFC Analyse den Regulationsmechanismus des Aktivitätsstatus der Raf1 Kinase durch Bindung an 14-3-3 Proteine oder Ras aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Interaktion von Raf1 mit Ras oder 14-3-3 Proteinen gegenseitig ausschließen. Die Bindung von Raf1 an Ras bewirkt die Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran und zieht eine Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade nach sich. Ist Raf1 an 14-3-3 gebunden, verbleibt dieser Proteinkomplex im Cytoplasma und hemmt die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade. Das in der *in vitro* BiFC verwendete Molekül Fusicoccin zeigt, dass eine Stabilisierung eines 14-3-3-Protein Komplexes einen erheblichen physiologischen Einfluss ausüben kann. Daher könnte ein Molekül, welches die Raf1/14-3-3 Interaktion stabilisiert und somit eine erhöhte Aktivität des Signalweges vermindert von therapeutischem Nutzen sein. Die Anwendbarkeit der *in vitro* BiFC für die Suche nach einem solchen Molekül muss unter den hier getesteten Bedingungen allerdings in Frage gestellt werden.

V. Summary

Detecting protein-protein-interactions is of major importance for understanding the mechanisms of regulation of cellular processes in healthy and diseased organisms. Only the understanding of the influence of an altered protein-protein-interaction in the course of disease enables the development of methods to manipulate these interactions in a therapeutic manner. Therefore methods with a simple readout for detecting small molecules that might potentially modulate such intracellular regulated processes are of major interest. Methods of that ilk should qualify for high-throughput screening, in order to dissect whole substance libraries for adequate compound candidates.

Over the past years bimolecular fluorescence complementation (BiFC) has successfully been established as an *in vivo* detection method of protein-protein-interactions. In contrast no *in vitro* BiFC studies have been published so far. This might be due to the insolubility of the BiFC fusion proteins caused by fragments of the yellow fluorescent protein (YFP). In this study BiFC was adapted to *in vitro* analyses with the possible objective to develop a high-throughput screen. For this purpose the BiFC fragments of YFP were mutated to improve their folding and enhance their solubility to use them in *in vitro* BiFC analyses. Two different protein-protein-interactions (see below) were used to scrutinize the applicability of *in vitro* BiFC for the search of small molecule modulators. However the results of the *in vitro* reconstitution of the BiFC fusion proteins disillusioned the ambition to develop a BiFC-based HTS for small molecules, because the binding affinities of the interaction partners seem to be altered by the complementation complex. Competition experiments with unlabelled protein did not result in influencing the fluorescence development nor were applications of well-known affinity minimizing mutations in the interface of the interacting proteins. Therefore unspecific binding and thus false positive results caused by the BiFC fusion proteins cannot be ruled out. The use of *in vivo* BiFC on the other hand revealed good results and confirmed the applicability of this method in living cells.

Two interactions were chosen for *in vitro* and *in vivo* BiFC. One of them is the interaction of HRas with the Raf1 kinase. This interaction represents the first step of the Ras-Raf-MEK-ERK signaling cascade. Diseases like cancer or developmental disorders like the Noonan syndrome are characterized by an increased activity of this

cascade. Application of small molecules that inhibit the interaction between Ras and Raf1 might be of therapeutic use. The other interaction used was the binding of 14-3-3 proteins to the regulatory C-terminus of the plant plasma membrane proton-ATPase. This interaction is a good example for the effect of small molecule modulators, since it is stabilized via the small molecule Fusicoccin.

Moreover this work shows localization studies of changes of the intracellular localization of the Raf1 kinase depending on its activation status. Herein the use of GFP fusion proteins and *in vivo* BiFC provided insight into the mechanisms of regulation of the activation status of Raf1 kinase depending on its binding of 14-3-3 proteins or Ras. This study gives evidence that the interaction of Raf1 with either 14-3-3 or Ras are mutually exclusive. Interaction of Raf1 and Ras causes membrane recruitment of the kinase and results most likely in activation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway. The Raf1/14-3-3 complex remains in the cytoplasm thereby impairing the activation of the Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway. In the aforementioned *in vitro* BiFC assay the small molecule fusicoccin was used, which has shown before that a stabilization of a 14-3-3-protein complex can have significant physiological impact. In this regard, a molecule stabilizing the Raf1/14-3-3 interaction resulting in a reduced activity of the signaling pathway could be of therapeutic benefit. The applicability of *in vitro* BiFC for finding such small molecule modulators has to be called into question under the conditions tested in this study.

VI. Publikationen

Darlegung des Eigenanteils der nachfolgenden Publikationen:

Applicability of superfolder YFP bimolecular fluorescence complementation *in vitro*

Autoren	Planung (P) (Anteile in %)	Experimentelle Durchführung (E) (Anteile in %)	Verfassen des Manuskriptes (M) (Anteile in %)
Corinna Ottmann	40	90	70
Michael Weyand	-	5	-
Alexander Wolf	-	2	-
Jürgen Kuhlmann	30	-	-
Christian Ottmann	30	3	30

Dieses Manuskript wurde bei Biological Chemistry eingereicht und am 01.10.2008 angenommen.

Impaired binding of 14-3-3 to Raf1 in Noonan and LEOPARD syndromes implies new ways of therapeutic intervention in diseases with increased Ras signaling

Autoren	Planung (P) (Anteile in %)	Experimentelle Durchführung (E) (Anteile in %)	Verfassen des Manuskriptes (M) (Anteile in %)
Corinna Ottmann	25	45	20
Benjamin Schumacher	25	45	20
Michael Weyand	-	5	-
Jürgen Kuhlmann	5	-	-
Christian Ottmann	45	5	60

Dieses Manuskript wurde am 05.08.2008 bei Science Signaling eingereicht und befindet sich seit dem 25.08.2008 unter Berücksichtigung der Kommentare der Gutachter in Überarbeitung („*under revision*“).

6.1 Applicability of superfolder YFP bimolecular fluorescence complementation *in vitro*

**Corinna Ottmann¹, Michael Weyand², Alexander Wolf², Jürgen Kuhlmann^{1,#},
Christian Ottmann^{2*}**

1 Department of Structural Biology, Max Planck Institute of Molecular Physiology, Otto-Hahn-Str. 11, 44227 Dortmund, Germany.

2 Chemical Genomics Centre of the Max Planck Society, Otto-Hahn-Str. 15, 44227 Dortmund, Germany.

Jürgen Kuhlmann is deceased.

*Corresponding author:

Dr. Christian Ottmann

Chemical Genomics Centre of the Max Planck Society

Otto-Hahn-Str. 15

44227 Dortmund

christian.ottmann@cgc.mpg.de

Running title: *In vitro* use of BiFC

Abstract

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) using YFP is a widely employed method to study protein-protein interactions in cells. As yet, this technique has not been used *in vitro*. To evaluate a possible application of BiFC *in vitro*, we constructed a 'superfolder split YFP' system, where 15 mutations enhance expression of the fusion proteins in *E. coli* and enable a native purification due to improved solubility. We present the crystal structure of 'superfolder YFP' providing the structural basis for the enhanced folding and stability characteristics. Complementation between the two nonfluorescent YFP fragments fused to HRas and Raf1RBD or to 14-3-3 and PMA2-CT52 resulted in the constitution of the functional fluorophore. The *in vivo* BiFC with these protein interaction pairs was demonstrated in eukaryotic cell lines, as well. Here we present for the first time BiFC *in vitro* studies with natively purified superfolder YFP fusion proteins and show the potential and drawbacks of this method for analyzing protein-protein interactions.

Keywords: 14-3-3; BiFC; fusicoccin; protein-protein interactions; Raf; Ras

Introduction

Regulation of physiological processes via protein-protein interactions is one of the major principles in living organisms. Small molecules that modulate such interactions can be used as formidable tools in basic research and have a tremendous therapeutic potential. Several approaches have been realized to identify small molecule modulators of protein-protein interactions. For example, small molecule inhibitors of Myc/Max dimerization have been identified via a FRET (fluorescence resonance energy transfer)-based screen (Berg et al., 2002). Employing a FP (fluorescence polarization) assay, Kenny and co-workers screened a 250.000 compounds library and found 29 compounds that disrupt the FtsZ/ZipA interaction, which is critical for cell division in *E. coli* (Kenny et al., 2003). Furthermore, an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) has been used to identify small molecule antagonists of tumor necrosis factor α (TNF α), which induced subunit disassembly of this trimeric cytokine (He et al., 2005). Although applied successfully, these screening methods have some drawbacks like a limited dynamic range (FRET), the

need to label at least one of the protein partners (FP) or extensive washing procedures (ELISA). Therefore, it is desirable to find another *in vitro* assay to study protein-protein interactions that might be applied for high-throughput screening in a 'mix-and-ready'-manner.

One of the most successful and most elegant ways to study protein-protein interactions *in vivo* is bimolecular fluorescence complementation (BiFC, Hu et al., 2002). The basic principle of this technique is the complementation between two nonfluorescent fragments of the yellow fluorescent protein (YFP) that reconstitute the functional fluorophore when brought together by interaction of two proteins fused to each fragment (Figure 1A).

We were interested in evaluating the *in vitro* applicability of BiFC to study protein-protein interactions with the final goal to develop a high-throughput screen (HTS) for the identification of small molecules that are able to either disrupt (Figure 1B) or stabilize (Figure 1C) a given protein complex. As biological targets we chose the interaction of Ras with the Raf1 kinase, where the identification of an inhibiting molecule would be desirable and the binding of 14-3-3 proteins to the regulatory C-terminus of the plant plasma membrane H⁺-ATPase, where a natural compound – fusicoccin – is known to stabilize this protein complex (Würtele et al., 2003).

Unfortunately, BiFC is not easily adaptable to *in vitro* applications like HTS, basically for serious problems to express the complementary YFP halves in *E. coli* (own unpublished results). This is supposedly due to immanent folding problems and strongly decreased solubility of these halves in aqueous solutions. To obtain split-YFP constructs that can be expressed in *E. coli* and are stable in standard buffer systems, we introduced 15 mutations that have been shown to enhance folding and stability in the green fluorescent protein (GFP, Figure 2), among them the 'cycle-3' mutations (Cramer et al., 1996), the 'enhanced GFP' mutations (Patterson et al., 1997), and the GFP 1-10 OPT mutations (Cabantous et al., 2005). The resulting 'superfolder YFP' was used to analyze the applicability of BiFC for *in vitro* analysis and estimate its possible use in high-throughput screening for small molecule modulators of protein-protein interactions.

We successfully expressed, purified and complemented the N-terminal (residues 1-154, YN) and C-terminal (residues 155-238, YC) 'superfolder YFP' fusion proteins with partners from the aforementioned, well-described protein-protein interactions, the binding of Raf1 to HRas (Figure 1B) and the regulation of plant plasma

membrane H⁺-ATPase PMA2 (Plasma membrane ATPase 2) by 14-3-3 proteins (Ottmann et al., 2007B, Figure 1B). The X-ray structure of 'superfolder YFP' explains the enhanced expressibility and folding of the split-YFP constructs in *E. coli* (Figure 3).

Results

Expression and purification of YN-YC 'superfolder YFP' constructs

In order to evaluate the applicability of the 'superfolder YFP' BiFC for *in vitro* analyses of protein-protein interactions, we cloned the corresponding YN (residues 1-154) and YC (residues 155-238) halves in fusion with HRas and Raf1RBD (Ras binding domain) or with the regulatory C-terminus (CT52) of the plant H⁺-ATPase PMA2 and a 14-3-3 protein. To avoid sterical problems in the complementation process a linker is essential to ensure the possibility of complementation upon interaction. On this account, Raf1RBD (79 amino acids) and YN (154 amino acids) are separated by a linker of 10, HRas (188 amino acids) and YC (84 amino acids) by a linker of 17 amino acids. By adding the 31 vector-encoded residues (containing the His₆-tag) this leads to a Raf1RBD-YN construct of ~31 kDa and a HRas-YC fusion protein of ~37 kDa. The fusion protein between the regulatory C-terminus of the H⁺-ATPase (CT52, 52 amino acids) and YN (154 amino acids) was expressed as a ~25 kDa protein, including a 12 amino acid N-terminal tag (with six histidines) and a 10 amino acid linker. The interaction partner of the H⁺-ATPase, the 14-3-3 protein (260 amino acids), was expressed as fusion with YC (84 amino acids) and the aforementioned 12 amino acid N-terminal tag plus an eight amino acid linker. The molecular weight of this construct is ~41 kDa.

The corresponding His₆-tagged proteins were expressed in *E. coli* and purified via standard procedures. All four tested fusion constructs were partly (~40%) soluble, could be purified (Figure 2B) and concentrated up to 70 mg/ml (YN fusions) or 20 mg/ml (YC fusions) and were still useable after at least 5 thawing/freezing cycles.

Crystal structure of the 'superfolder YFP'

To elucidate the structural basis for the observed enhanced expressibility and stability of the 'superfolder YFP' fusion constructs compared to wild-type YFP, we solved the crystal structure of a 'superfolder YFP' where the two halves of YFP (YN-YC) are separated by a 24 amino acid linker and expressed as a single polypeptide

chain. This construct could be purified as a soluble and already yellow fluorescent protein whose emission spectrum was identical to YFP (Figure 2C). Since crystallization trials with unprocessed protein only yielded crystals that did not diffract beyond 4.0 Å, we added an overnight incubation of 'superfolder YFP' with proteinase K at room temperature prior to crystallization setups. The processed protein yielded crystals diffracting to 2.7 Å and the structure was solved by molecular replacement using a GFP structure (PDB code 1F0B) as starting model. Five molecules of the 'superfolder' YFP can be found in the asymmetric unit, four of them crystallizing as anti-parallel dimers (data not shown). The fifth molecule is set apart from the two other pairs but establishes the same anti-parallel dimer with a symmetry-related molecule. For the 'superfolder YFP' we found interpretable density for 228 out of 238 residues. Of the 24 amino acid linker we could identify density for only four amino acids, which would either be in line with its highly flexible nature or the possibility, that it had been degraded during the proteinase K treatment.

Altogether, the structure of 'superfolder YFP' is essentially the same as reported for YFP (Figure 3A) with a root mean square deviation (rmsd) of 0.5 Å over 224 compared backbone C α -atoms.

Structural hints for enhanced stability of 'superfolder YFP'

As reported by Pédelacq et al., of all the 'superfolder' mutations the substitution S30R contributes most to GFP folding when expressed as a ferritin fusion. The structural reason for this enhanced characteristic is reported to be a five-membered intramolecular ionic network established between R30, E17, E32, E115 and R122 (Pédelacq et al., 2006, Figure 3D). Such a network might be expected to contribute to global stability since organization of ion pairs in networks is thermodynamically favoured over single-ion pairs (Yip et al., 1995). A similar five-membered network can also be observed in our structure, with the notable exception that D19 instead of E32 is involved (Figure 3C). Whereas the terminal η nitrogens of R30 in the 'superfolder GFP' are hydrogen-bonded to the side chains of E17 and E32, in the 'superfolder YFP' structure the ϵ nitrogen of R30 is hydrogen-bonded to the side chain of E17 and the η nitrogen is contacting the side chain of D19. This results in the dislocation of the side chain of R30 by about 6 Å in the 'superfolder YFP' structure. The structure of YFP, which harbours a serine at position 30 (Figure 3E), displays a less well-defined picture in this area. Here, the side chains of E17, D19, E32 and R122 are not

completely visible and only the electrostatic interaction between the side chains of E115 and R122 are established (Figure 3E).

The mutations V163A, I167V and I171V are all situated in the first β -strand of the C-terminal fragment YC of the 'superfolder YFP' beginning with residue K158 (Figure 3F). Overall, these mutations contribute to reduce the hydrophobic surface of this region, which in full-length YFP would constitute part of the hydrophobic inner core of the β -barrel, but would most likely face the solvent, when part of the YC construct. It can be assumed that minimization of this probably solvent-exposed hydrophobic surface enhances the stability in aqueous solutions.

***In vitro* reconstitution of YN-YC 'superfolder YFP'**

After obtaining the purified YN-YC constructs (Figure 2B) we tested the optimal conditions for complexation and reconstitution of the active fluorophore. To this end, we mixed the corresponding interaction pairs fused to YN or YC and tested the parameters pH, buffer system and salt concentration. The results are summarized in Figure 4. In both interactions, a higher pH favours reconstitution and consequently fluorophore maturation (Figure 4A, D). The most suitable buffer system in case of binding of HRas to Raf1RBD was found to be Tris/HCl (Figure 4B) and for the 14-3-3/CT52 interaction to be BisTrisPropane (Figure 4E). Since a high pH value itself seemed to be more important than the choice of the buffer system, for reasons of comparability we used the same buffer system, Tris/HCl, for the study of both protein-protein interactions. When testing the influence of the salt concentration, the two reconstitution pairs displayed opposite behaviours. Whereas in respect to the HRas-YC/Raf1RBD-YN interaction increasing NaCl-concentrations are accompanied by an enhancement of the fluorescence signal (Figure 4C), higher salt concentrations seemed to have an inhibitory effect on fluorescence development (Figure 4F) in case of the 14-3-3-YC/YN-CT52 interaction. Under the optimal buffer conditions the half maximal fluorescence signal was obtained after approximately 3-4 hours. This is supposedly due to the duration of chromophore oxidation that is necessary to generate a fluorescence signal.

In order to address the question of altered affinities of the BiFC fusion proteins as well as the reversibility of the BiFC complex we performed competition assays and used Raf1RBD mutants which are known to bind Ras with a decreased affinity. In the competition assay we added a four fold excess of unlabelled protein as competitor to

each interaction pair (Figure 5A, 5B). The fluorescence signal of the HRas-YC/Raf1RBD-YN interaction showed only a small decrease when competed with an excess of unlabelled HRas or Raf1RBD protein. In the case of 14-3-3-YC/YN-CT52 the decrease of fluorescence upon competition with unlabelled protein is even smaller, leading to the assumption that the affinity of the BiFC fusion proteins is enhanced by the YFP fragments. Adding the neurofibromatosis type 1 (NF1) protein with RasGAP (GTPase activating protein) activity (Martin et al. 1990) was supposed to disrupt the HRas-YC/Raf1RBD-YN interaction as a consequence of nucleotide hydrolysis. But the development of the fluorescence signal seems to be all about undisturbed in comparison to the HRas-YC/Raf1RBD-YN interaction signal (Figure 5A), giving rise to the presumption that the BiFC complex is not likely to be able to dissociate once complementation has taken place. The Raf1RBD amino acid substitution K84A has been shown to decrease the affinity to bind Ras whereas the likelihood of R89L binding to Ras converges to zero (Block et al. 1996). Measurements with those mutations in our BiFC constructs showed only a slight decrease in the intensity of the fluorescence signal (Figure 5C) supporting the assumption that the affinity of the BiFC fusion proteins is enhanced by the YFP fragments. A significant albeit slower developing fluorescence signal could be detected when mixing 14-3-3-YC and Raf1RBD-YN, raising the question if 14-3-3 is able to bind to more than only two sites (S233/S259, S621) including (parts of) RBD of the Raf1 protein. However, we assume that although the YFP fragments are likely to change affinities they do not lead to unspecific binding since there was no fluorescence detectable when mixing HRas-YC and YN-CT52 (Figure 5C). The small molecule fusicoccin (FC) stabilizes the interaction between 14-3-3 and CT52 (Ottmann et al., 2007B). In our BiFC assay we could not detect any difference in fluorescence in presence or absence of FC for the 14-3-3-YC/YN-CT52 interaction (Figure 5B), leading to the presumption that the BiFC complex is stabilizing the interaction.

Bimolecular fluorescence complementation *in vivo*

The Raf1 kinase activation via Ras signaling mainly occurs on the plasma membrane. However the plasma membrane is not the exclusive platform from which Ras regulates signaling, it also proceeds on endomembranes (Chiu et al. 2002). The authors of that study used a fluorescent Raf1RBD construct that localized at

endomembranes after stimulation. This localization was interpreted as activated Ras on endomembrane systems especially on the golgi. In our studies, we transfected COS7 cells with our BiFC fusion constructs of HRas and Raf1RBD and performed live cell imaging after 24 hours in growth medium supplemented with foetal calf serum. Bright fluorescence of the plasma membrane and endomembranes was observed (Figure 6A), demonstrating HRas-dependent Raf1RBD localization at the plasma membrane and endomembrane systems like the golgi.

As an *in vivo* control for our *in vitro* measurements with 14-3-3 and CT52 we transfected HEK293 cells with the corresponding BiFC constructs. Fluorescence appears predominantly in the cytoplasm (Figure 6B). Since CT52 is as part of the H⁺-ATPase a plant protein, no specific localization in human cells was expected, whereas the 14-3-3 proteins that are highly conserved between plants and animals were anticipated to localize in the cytoplasm. Altogether, *in vivo* reconstitution of the fluorophore upon interaction of the well-known pairs of proteins could be shown.

Discussion

In the present study we evaluated the applicability of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) for *in vitro* analysis of protein-protein interactions. The initial motivation was the desire to implement a mix-and-ready screening method to identify small molecule modulators of the Ras/Raf1 and the 14-3-3/PMA2 protein-protein interactions. Ras is mutated in 30% of all human cancers (Chong et al., 2003) and since the vast majority of Ras mutations result in an activated Ras-Raf-MEK-ERK pathway, attenuation of this pathway can be expected to be therapeutically beneficial. Among others, one strategy to achieve this goal is to inhibit the interaction of activated Ras with Raf by the use of small molecules (Figure 1B).

Stabilization of a protein-protein interaction can also result in a desirable physiological effect. For example, the fungal phytotoxin fusicoccin stabilizes the activated complex of the plant plasma H⁺-ATPase and 14-3-3 proteins leading to wilting of plants (Würtele et al., 2003). In addition to its potential role in herbicide development, this interaction can be studied as a general model system for the stabilization of 14-3-3 protein-protein interactions, which have been implicated in a variety of human diseases. Besides their participation in diverse cancers (Hermeking, 2003) they have been found to play a role in the development of neurodegenerative diseases (Berg et al., 2003) and bind to proteins from human pathogenic organisms

like ExoS from *Pseudomonas aeruginosa* (Fu et al., 1993; Ottmann et al., 2007A). The identification of small molecules stabilizing specifically a given 14-3-3 protein-protein interaction would be of significant impact for basic research as well as for the development of novel drugs.

To produce split YFP constructs in *E. coli* we created a 'superfolder YFP' in which 15 mutations enhance expression and stability. The functional fluorophore could be reconstituted *in vitro* by mixing soluble, non-fluorescent 'superfolder YFP' fragments (YN and YC) in fusion with either Raf1RBD and HRas or H⁺-ATPase CT52 and 14-3-3.

In the original publication that introduced the bimolecular fluorescence complementation (Hu et al., 2002) the authors described the results of an *in vitro* complementation of the bZIP domains of Fos and Jun fused to the split YFP halves YN (1-154) and YC (155-238, bFosYC and bJunYN). These proteins were co-expressed in *E. coli* and due to their insolubility deposited in inclusion bodies. After purification in the presence of 6 M guanidine, the protein pair was heated to 95°C for 5 min and rapidly diluted 60-fold to measure the fluorescence at 25°C. Fluorophore formation could be competed upon addition of the corresponding unlabelled protein partners and was abrogated by leucine zipper deletions that render bFos and bJun unable to interact with each other. We tried a similar approach with the HRas-YC/Raf1RBD-YN interaction using – as Hu et al. – the unmodified YFP sequence for the split YFP fragments. Although we obtained significant amounts of our protein pair in inclusion bodies, we were not able to observe fluorophore formation with these proteins neither by the original rapid dilution methods nor by mildly dialyzing against more physiological buffers, since both proteins precipitated under all conditions tested (data not shown). Therefore, we decided to create split YFP constructs that can be purified from *E. coli* as natively folded proteins employing the 'superfolder' mutations that had been reported for GFP (Cabantous et al., 2005; Pédelacq et al., 2006).

To elucidate the structural basis for the enhanced solubility of the 'superfolder YFP' fragments, we solved its crystal structure to 2.7 Å. In contrast to 'superfolder GFP' (Pédelacq et al., 2006) our 'superfolder YFP' crystallized as dimer. The observed dimers overlay perfectly with the anti-parallel dimer found in the crystal structure of 'folding reporter GFP', but contrast with 'superfolder GFP' that crystallizes as monomer (Pédelacq et al., 2006). The authors who presented the monomeric

structure of 'superfolder GFP' generated a model of a hypothetical dimer of this protein and proposed the mutation A206V as a reason for the observed crystallization behaviour (Pédélecq et al., 2006). In their model, the side chain of V206 came into close contact (1.97 Å) to the phenyl group of F223, thereby possibly hindering the dimer formation. Although the interface of F223 and A206 has been identified as a 'hot spot' for mutations disrupting GFP dimer formation (Zacharias et al., 2002), in the dimers of our structure the side chain atoms of V206 and the phenyl group atoms of F223 are at least 3.5 Å apart, most probably ruling out the A206V mutation to impede dimerization in the structure of superfolder GFP. In agreement with Pédélecq et al., we observed an extensive ionic network induced by the mutation S30R (Figure 3C) and some mutations that help to minimize the hydrophobic surface of the YC construct (Figure 3F) as reasons for the improved folding characteristics of 'superfolder YFP'.

In order to optimize conditions for *in vitro* BiFC, we tested different pH values and salt concentrations. While in both studied interactions no development of fluorescence could be observed at pH 7.2, raising the pH gradually increased fluorescence reconstitution (Figure 4A, D). This tendency is roughly in line with the pH-sensitivity of YFP fluorescence (Miyawaki et al., 1999) with the exception that here fluorescence can already be observed at pH 6. The pH preference of the 14-3-3/CT52 and the HRas/Raf1 interaction, that lie in the range of about pH 6.5 and 7.5, respectively, favours the interpretation that the observed pH dependence is dominated by YFP formation.

Regarding the optimal salt concentration, the two protein pairs behaved in opposite manners. While fluorescence development was improved by increasing NaCl concentrations in the case of HRas-YC/Raf1RBD-YN, it was weakened with rising NaCl concentrations when measuring the 14-3-3-YC/YN-CT52 interaction (Figure 4C). In contrast to the pH-dependence this result supports the interpretation that at least for some parameters the constitution of functional YFP is determined by interaction between the fusion partners of 'superfolder split YFP'.

This hopeful appraisal was somewhat sobered by the results of subsequent experiments, where the influence of unlabelled protein as competitor was tested. As summarized in Figure 5A, neither the addition of unlabelled HRas nor unlabelled Raf1RBD in fourfold excess had a significant impact on fluorophore formation. Although the reached maxima differed considerably, this might be rather due to

secondary effects like quenching than to an actual competition effect. A true competition would affect the kinetic of the reaction, resulting in delayed fluorescence development and consequently a reduced slope. Furthermore, the addition of the RasGAP Neurofibromin-1 (NF-1), which is expected to terminate the HRas/Raf1RBD interaction due to stimulation of GTPase activity of Ras showed no effect on the fluorescence signal (Figure 5A). A very similar situation was observed with the 14-3-3-YC/YN-CT52 system. No significant alteration in fluorophore development could be observed in the presence of a fourfold excess of unlabelled 14-3-3 or CT52 (Figure 5B). This was disappointing, since Hu et al. showed that complementation of split YFP bFos/bJun constructs purified from inclusion bodies under denaturing conditions could efficiently be competed by adding unlabelled protein (Hu et al., 2002). In the same set of experiments, these authors showed that a bFos-YC construct could no longer interact with bJun-YN when devoid of a functional leucine zipper (bFos Δ Zip). To validate the influence of mutations impairing or abrogating the complexation of the protein partners we introduced the amino acid substitutions K84A and R89L into Raf1RBD-YN (Block et al., 1996) and tested its fluorescence complementation with HRas-YC. To our surprise these two mutations had no effect on fluorescence development (Figure 5C). Furthermore, the addition of the fungal toxin fusicoccin to the 14-3-3-YC/YN-CT52 pair had no effect either (Figure 5B). This was unexpected, since fusicoccin stabilizes the 14-3-3/CT52 complex even in the absence of phosphorylation of CT52 (Ottmann et al., 2007) when binding to 14-3-3 normally cannot be detected. Since our protein constructs were purified from *E. coli* and are therefore unphosphorylated (data not shown) it was expected to be necessary to induce the high affinity binding of 14-3-3 and CT52 by adding fusicoccin to enable complementation and fluorophore maturation of the 'superfolder YFP' in the first place. This result together with the competition experiments and the ineffectiveness of the Ras-binding mutations in Raf1RBD (K84A, R89L) suggested that 'superfolder YFP' complementation may exclusively be driven by interaction between the YFP fragments. To test this possibility, we finally mixed HRas-YC and YN-CT52 or 14-3-3-YC and Raf1RBD-YN. In the case of the combination HRas-YC/YN-CT52 no fluorescence could be observed whereas with 14-3-3-YC/YN-Raf1RBD constitution of the fluorophore albeit with a delayed time course occurred (Figure 5C). 14-3-3 proteins bind to the N-terminus of Raf1 via the phosphorylation sites S233 and S259 (Dumaz & Marais, 2003). Although our Raf1RBD construct (residues 53-131) did not

include these sites, it might be that part of Raf1RBD is binding with very low affinity to 14-3-3, since binding of Raf1 to Ras and 14-3-3 seems to be mutually exclusive. However, an interaction between Raf1RBD and 14-3-3 has to the best of our knowledge not been reported before and may therefore rather be an artefact of the *in vitro* BiFC of 'superfolder YFP'. We observed, on the other hand, no complementation in case of the HRas-YC/YN-CT52 pair (Figure 5C). This result implies that the observed interactions might not, at least not in every case, be driven solely by the affinity of the split YFP halves to each other. An alternative explanation for the missing fluorescence development in the HRas-YC/YN-CT52 pairing would be an inhibitory activity of the fusion partners to YFP complementation due to, for example, sterical restraints. As the fusion partner of the N-terminal YFP part is in this case a rather short peptide (52 amino acids), an impairment of the complementation due to sterical hindrances is improbable.

In order to verify the feasibility of *in vivo* BiFC with the interaction partners of this study, we transfected COS7 or HEK293 cells with YC-HRas/Raf1RBD-YN or 14-3-3-YC/YN-CT52, respectively (Figure 6). As expected, fluorescence complementation could be observed at the plasma membrane and the golgi with YC-HRas/Raf1RBD-YN (Figure 6A) or in the cytoplasm, as seen with 14-3-3-YC/YN-CT52 (Figure 6B). No fluorescence developed in cells co-transfected with K84A- or R89L-mutated Raf1RBD-YN and YC-HRas (COS7) or 14-3-3-CY and YN-Raf1RBD (HEK293, Figure 6C, D). Negative controls with fragments alone did not show any fluorescence (e.g. YC-HRas and YN or Raf1RBD-YN and YC, data not shown).

In summary, we tested the applicability of BiFC for *in vitro* studies of protein-protein interactions. Although this method may have some value to analyze very transient interactions, the general use of this system for example to establish a screening method for the identification of small molecules must be doubted. At least, the actual applicability of this approach must thoroughly be scrutinized for each protein interaction.

Materials and Methods

Plasmid constructs

For expression of BiFC fusion proteins constructs were subcloned into the expression vectors pProEx HTb (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany). Superfolder mutations were introduced into the following constructs: HRaswt-YC (YC: YFP aa 155-238) and Raf1RBD-YN (YN: YFP aa 1-154) (RBD: aa 53-131) as well as 14-3-3-YC and YN-PMA2-CT52 (aa 904-956). Amino acid substitutions S30R, Y39I, F64L, F99S, N105K, E111V, I128T, Y145F, M153T were constructed by site-directed mutagenesis of plasmids carrying YN likewise the substitutions V163A, K166T, I167V, I171V, S205T, A206V were constructed by site-directed mutagenesis of plasmids carrying YC using the Quickchange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For crystallization a YN-YC construct containing all superfoldermutations was cloned into pProEx HTb with a linker of 24 amino acids separating the two 'superfolder YFP' fragments. All constructs were confirmed by sequencing at the in-house facility at the Max-Planck-Institute, Dortmund, Germany. Transfection experiments were performed using shuttle vectors for *E.coli* and mammalian cells with the promotor-regulatory region of the human cytomegalovirus: pCMV-HA YC-HRas (vector from Clontech, Mountain View, CA, USA), pFLAG-CMV-2 Raf1RBD-YN (vector from Sigma, Saint Louis, MO, USA), pcDNA3 14-3-3-YC (isoform c from *Nicotiana tabacum*) and pcDNA3 YN-PMA2-CT52 (vector from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, PMA2, H⁺-ATPase isoform 2 from *Nicotiana plumbaginifolia*).

Protein Expression and Purification

Protein expression was induced in *E.coli* BL21 (DE3) Rosetta by addition of 0.3 mM IPTG at 18°C for 16 h. Purification of the His₆-tagged BiFC fusion proteins were carried out using standard procedures (Ni-NTA, Qiagen, Hilden, Germany). Proteins were dialyzed against 50 mM Tris/HCl pH 8.8, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 % glycerol and 2 mM β-mercaptoethanol and stored at -80°C until further use.

***In vitro* measurements**

In vitro measurements were performed in 96-well-plates flat bottom black (Nunc, Langensfeld, Germany) with protein concentrations ranging from 0.2 μM to 2 μM in a total volume of 100 μL (buffer conditions see above). To avoid evaporation in long term measurements plates were sealed with self-adhesive transparency film. Fluorescence was measured at 485 nm excitation wavelength and 535 nm emission wavelength using a Tecan Safire2 Version V 4.62n (Tecan, Männedorf, Switzerland) with a bandwidth of 15 nm, 40 μs integration time and a kinetic interval of 1200 s. Plate was orbitally shaken before each cycle. Data was collected and processed in Excel (Microsoft).

Crystallization and Data Collection

Prior to crystallization the expressed 'superfolder YN-YC' protein was digested by proteinase K (Peqlab, Erlangen, Germany. Source: *Tritirachium album*) at 25°C for 12 h with a protein to protease molar ratio (w/w) of 1000 : 1. Digested 'superfolder YN-YC' (30 mg/ml) crystallized after 2-4 days at 20°C in 100 mM Tris/HCl pH 8.5, 20 % ethanol, 12 % TCEP. For flash-freezing, the crystals were incubated in mother liquor supplemented with 35% ethanol. Data collection was performed at the Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland and was processed with XDS (Kabsch, 1993). Molecular replacement was carried out with MOLREP with the structure of GFP (PDB code 1F0B) used as the search model. The obtained model was subjected to iterative rounds of model building and refinement using the programs COOT and REFMAC (Murshudov, 1997; Emsley, 2004). Figures were prepared with PYMOL (www.pymol.org).

Coordinates

The atomic coordinates and structure factors of the complex have been deposited in the Protein Data Bank under the ID code 3ED8.

Cell culture, transfection and cell imaging

The human embryonic kidney cell line 293 (HEK293; ATCC CRL-1573) and the african green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS7; ATCC CRL-1651) were maintained in DMEM supplemented with 10 % foetal calf serum, 3 % antibiotics (Sigma, Saint Louis, MO, USA) at 37°C in 7.5 % CO₂ atmosphere. Cells were plated on glass cover slips in 24-well plates and transiently transfected according to the

manufacturer's instructions with 0.25 µg of plasmid DNA and 5 µL Qiagen's Effectene Transfection Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) in 700 µL of growing medium. Cells were cotransfected with two vectors containing both split YFP fragments and the interacting proteins and were examined 24 hours after transfection using a Leica TCS SP2 confocal microscope equipped with an argon ion laser used to excite YFP fluorescence at 514 nm. Images were taken using the Leica confocal Software.

Acknowledgements

The authors are grateful to the lab of Tom K. Kerppola (Michigan) who kindly provided us the original BiFC plasmids that we used as templates to clone and mutagenize our constructs.

The X-ray data collection was performed on the X10SA beamline (PXII) at the Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villingen, Switzerland. We are grateful to Anuschka Pauluhn at Swiss Light Source whose outstanding efforts have made these experiments possible and to Ilme Schlichting, Thomas Barends and Bernhard Loll for data collection support.

This research project has been supported by the European Commission under the 6th Framework Programme: Strengthening the European Research Area, Research Infrastructures. Contract no°: RII3-CT-2004-506008.

References

- Berg, D., Holzmann, C., Riess, O. (2003). 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 752-762.
- Berg, T., Cohen, S.B., Desharnais, J., Sonderegger, C., Maslyar, D.J., Goldberg, J., Boger, D.L., Vogt, P.K. (2002). Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 3820-3835.
- Block, C., Janknecht, R., Herrmann, C., Nassar, N., Wittinghofer, A. (1996). Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nat. Struct. Biol.* 3, 244-251.
- Cabantous, S., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 23, 102-107.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L. 2nd, Cox, A.D., Philips, M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell. Biol.* 4, 343-50.
- Chong, H., Vikis, H.G., Guan, K.L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15, 463-469.
- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., Stemmer, W.P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14, 315-319.
- Dumaz N., Marais R. (2003). Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J. Biol. Chem.* 278, 29819-29823.
- Emsley, P., Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2126-2132.
- Fu, H., Coburn, J., Collier, R.J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2320-2324.
- He, M.M., Smith, A.S., Oslob, J.D., Flanagan, W.M., Braisted, A.C., Whitty, A., Cancilla, M.T., Wang, J., Lugovskoy, A.A., Yoburn, J.C. et al. (2005). Small-molecule inhibition of TNF- α . *Science.* 310, 1022-1025.
- Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 931-943.

- Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell.* 9, 789-798.
- Kabsch W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800.
- Kenny, C.H., Ding, W., Kelleher, K., Benard, S., Dushin, E.G., Sutherland, A.G., Mosyak, L., Kriz, R., Ellestad, G. (2003) Development of a fluorescence polarization assay to screen for inhibitors of the FtsZ/ZipA interaction. *Anal. Biochem.* 323, 224-233.
- Martin, G.A., Viskochil, D., Bollaq, G., McCabe, P.C., Crosier, W.J., Haubruck, H., Conroy, L., Clark, R., O'Connell, P., Cawthon, R.M., Innis, M.A., McCormick, F. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with *ras* p21. *Cell* 63, 843-849.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2135-2140.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.
- Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J.L., Diaz, M.H., Palmer, R.H., Francis, M.S., Hauser, A.R., Wittinghofer, A., Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J.* 26, 902-913.
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A. et al. (2007). Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H^+ -ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol. Cell.* 25, 427-440.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., Piston, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 73, 2782-2790.
- Pédelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88.

Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., Terwilliger, T.C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 17, 691-695.

Würtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A., Oecking, C. (2003). Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J.* 22, 987-994.

Yip, K.S., Stillman, T.J., Britton, K.L., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sedelnikova, S.E., Engel, P.C. Pasquo, A., Chiaraluce, R., Consalvi, V. et al. (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3, 1147-1158.

Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., Tsien, R.J. (2002). Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* 296, 913-916.

Tables

Table 1: Crystallographic data collection and refinement statistics^a

Cell dimensions	a = b = 123.04 c = 247.71
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2
Resolution (Å)	25 – 2.7 (2.8 – 2.7)
Observed Reflections	747193 (79871)
Unique Reflections	52991 (5389)
Completeness (%)	99.9 (100)
I/σ	16.4 (4.2)
Rsym (%) ^b	11.1 (64.0)
Rmrgf-F (%) ^c	6.2 (24.8)
Resolution (TLS-refinement) ^d	25 – 2.7 (2.77 – 2.7)
Rcryst (%) ^e	17.4 (25.4)
Rfree (%) ^d	21.8 (31.4)
Protein atoms	8815
Solvent atoms	188
R.m.s.d. ^g of bond length, weight (Å)	0.014, 0.022
R.m.s.d. ^g of bond angles, weight (°)	1.852, 1.959
R.m.s.d. ^g of isotropic thermal factor, weight (Å ²)	
m.c. bond	0.526, 1.500
m.c. angle	1.028, 2.000
s.c. bond	1.797, 3.000
s.c. angle	3.010, 4.500
Overall temperature factor (Å ²)	
Wilson B-factor all atoms	
m.c. / s.c. / wat.	36.141 / 36.327 / 34.720

^aData for the outermost shell are shown in parentheses.

^b $R_{\text{sym}} = \sum |I_{hi} - \langle I_{hi} \rangle| / \sum I_{hi}$, where I_{hi} is the scaled observed intensity of the i th symmetry-related observation of the reflection h and $\langle I_{hi} \rangle$ the mean value.

^cQuality of amplitudes (F) in the scaled data set.

^dRigid body definition within TLS refinement: each YFP chain was treated as independent rigid body. No definition for solvent molecules.

${}^eR_{\text{cryst}} = \sum_h |F_{\text{oh}} - F_{\text{ch}}| / \sum_h F_{\text{oh}}$, where F_{oh} and F_{ch} are the observed and calculated structure factor amplitudes for reflection h .

${}^fR_{\text{free}}$ was calculated as R_{cryst} with 5% of the data omitted from structure refinement.

${}^gR.m.s.d.$, root mean square deviations from ideal geometry.

Figure Legends

Figure 1 Principle of BiFC and possible application in screening for modulators of protein-protein interactions.

(A) The non-fluorescent split YFP halves establish a functional fluorophore when brought into close proximity by the interaction of the fused proteins. (B) Screening for inhibitors of protein-protein interactions. The fusion partners Raf1RBD and Ras are prevented from binding to each other by a small molecule occupying a site in one of the proteins that would in the binary complex contribute to the binding interface of the two proteins. (C) Screening for stabilizers of protein-protein interactions. The fungal toxin fusicoccin binds to the activated complex of the regulatory C-terminus (CT52) of the plant H^+ -ATPase and 14-3-3 proteins and stabilizes this complex. Although normally a high-affinity binding between 14-3-3 proteins and their partners is only established when the latter are phosphorylated, fusicoccin can induce the dimerization of these complexes in the absence of phosphorylation.

Figure 2 Mutations in split YFP fragments enabling heterologous expression and purification.

(A) Nine mutations were introduced in the N-terminal (blue) and six mutations in the C-terminal (magenta) half of YFP to produce 'superfolder YFP'. Of these mutations, eleven originated from the GFP mutant GFP 1-10 OPT (green), three from 'Cycle 3' (orange) and one from enhanced GFP (blue). (B) Coomassie staining (left) and anti-His₆ immunostaining (right) after SDS-PAGE of Ni-NTA-purified YN- and YC-fusion proteins. (C) Emission spectra of YFP (red) and 'superfolder YFP' (blue). 'Superfolder YFP' was expressed as single polypeptide with YN and YC separated by a 24 amino acid flexible linker.

Figure 3 Crystal structure of 'superfolder YFP'.

(A) Stereo view of 'superfolder YFP' with selected mutated amino acid positions shown as stick models and labeled. (B) Stereo view of YFP (PDB code 1YFP) with residues mutated in 'superfolder YFP' shown as sticks and labelled. (C) Details of the region surrounding residue 30 in 'superfolder YFP' with side chains contributing to an extended ionic network shown as stick models and displaying the $2F_o - F_c$ density map contoured at 1σ . (D) Details of the 'superfolder GFP' showing the corresponding region to C. Also here, a five-membered ionic network is established but involving E32 instead of E19 resulting in different arrangement of the R30 side chain. (E) The same region in YFP, without an ionic network, displaying only poor structural definition for residues E17, D19 and E32. (F) Detailed view of the first two β -strands of the C-terminal construct (YC) of 'superfolder YFP' following the split site K158. This region harbors the mutations V163A, I167V and I171V, overall reducing the hydrophobic surface that in full-length YFP is buried in the hydrophobic core of the β -barrel, but in YC would be solvent-exposed.

Figure 4 Optimization for BiFC *in vitro* measurements. Fluorescence was excited at 485 nm wavelength and detected at 535 nm respectively. Protein concentrations were 800 nM. Measurements were performed over a time period of 19 hours at 30°C. Fluorescence complementation of HRas-YC and Raf1RBD-YN is shown in the left column (A-C) and that of 14-3-3-YC and YN-CT52 in the right column (D-F). A, D) Optimal pH. Measurements were done in 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM β -mercaptoethanol at different pH-values. B, E) Optimal buffer. Tested buffers were used at a concentration of 20 mM and contained additionally 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM β -mercaptoethanol. pH-values were as indicated. C, F) Optimal NaCl. Measurements with 20 mM Tris/HCl pH 8.8, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM β -mercaptoethanol containing different NaCl concentrations.

Figure 5 BiFC *in vitro* measurements with two independent interaction systems. Fluorescence was excited at 485 nm and detected at 535 nm. Protein concentrations were 1 μ M if not indicated otherwise. Measurements were performed over a time period of 40 hours at 30°C. A) Interaction of HRas-YC and Raf1RBD-YN competed with an excess (4 μ M) of unlabelled protein. Complex of HRas-YC and Raf1RBD-YN exposed to the RasGAP NF-1 in presence of GDP. (B) Fluorescence

complementation of the interaction of HRas-YC and Raf1RBD-YN compared with Raf1RBD-YN mutants K84A and R89L negative for Ras binding. As controls, HRas-YC and YN-CT52 as well as 14-3-3-YC and Raf1RBD-YN were tested for fluorescence. (C) Fluorescence of the complementation complex of 14-3-3-YC and YN-CT52 measured in presence and absence of 2 μ M fusicoccin and with an excess of unlabelled protein as competitor (4 μ M).

Figure 6 *In vivo* BiFC of the YC-HRas/Raf1RBD-YN and 14-3-3-YC/YN-CT52 interaction. Left, overview, right, detailed view. (A) COS7 cells were transfected with pCMV-HA YC-HRas and pFLAG-CMV-2 Raf1RBD-YN. Fluorescence of the plasma membrane (PM) and the golgi apparatus (G) was detected with a confocal laser microscope 16 hours past transfection. (B) HEK293 cells were transfected with pcDNA3 14-3-3-YC and pcDNA3 YN-CT52. BiFC-YFP fluorescence of the cytoplasm (C) was detected with a confocal laser microscope 16 hours past transfection (N, nucleus). (C) COS7 cells transfected with K84A- or R89L-mutated Raf1RBD-YN and YC-HRas. (D) HEK293 cells transfected with 14-3-3-CY and YN-Raf1RBD. Bars = 5 μ m.

Figures

Figure 1

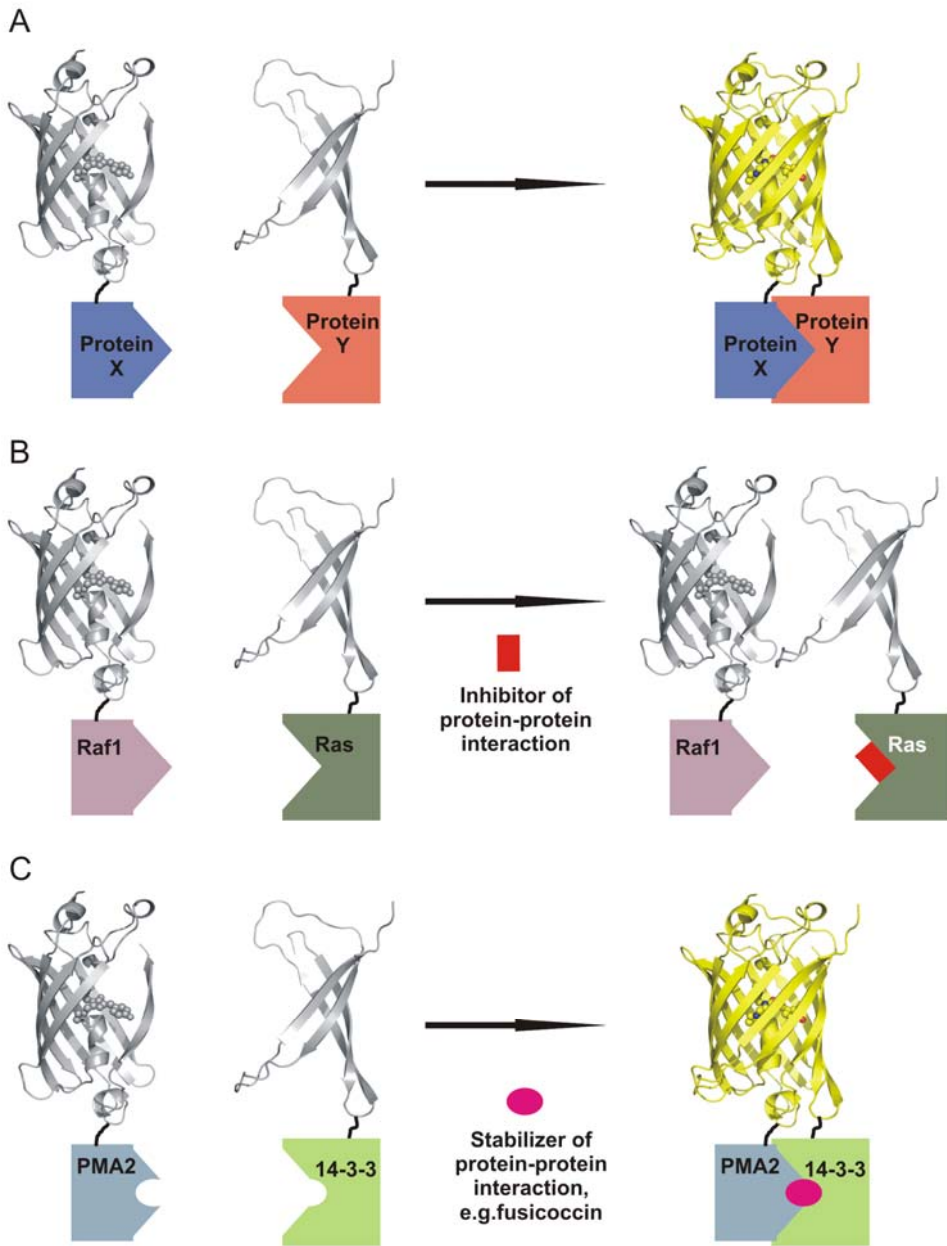
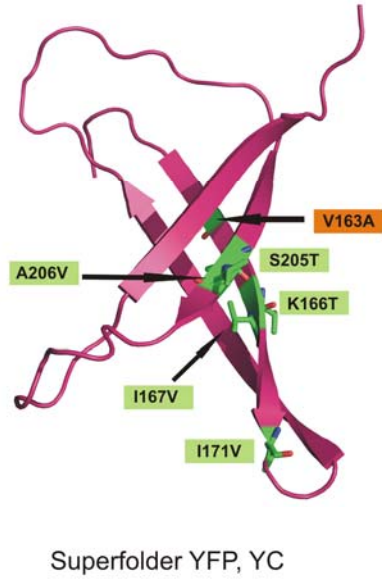
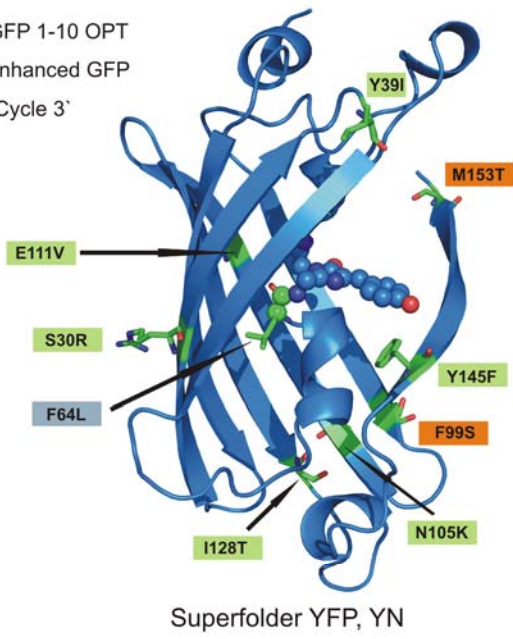


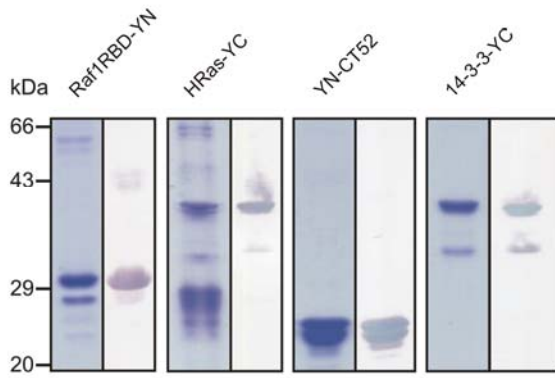
Figure 2

A

- GFP 1-10 OPT
- enhanced GFP
- 'Cycle 3'



B



C

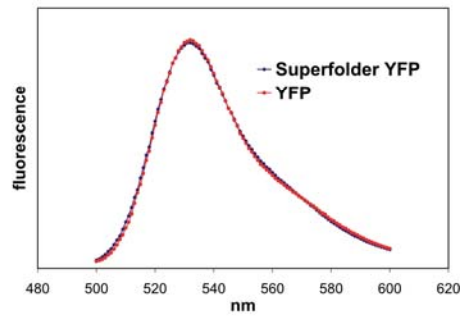


Figure 3

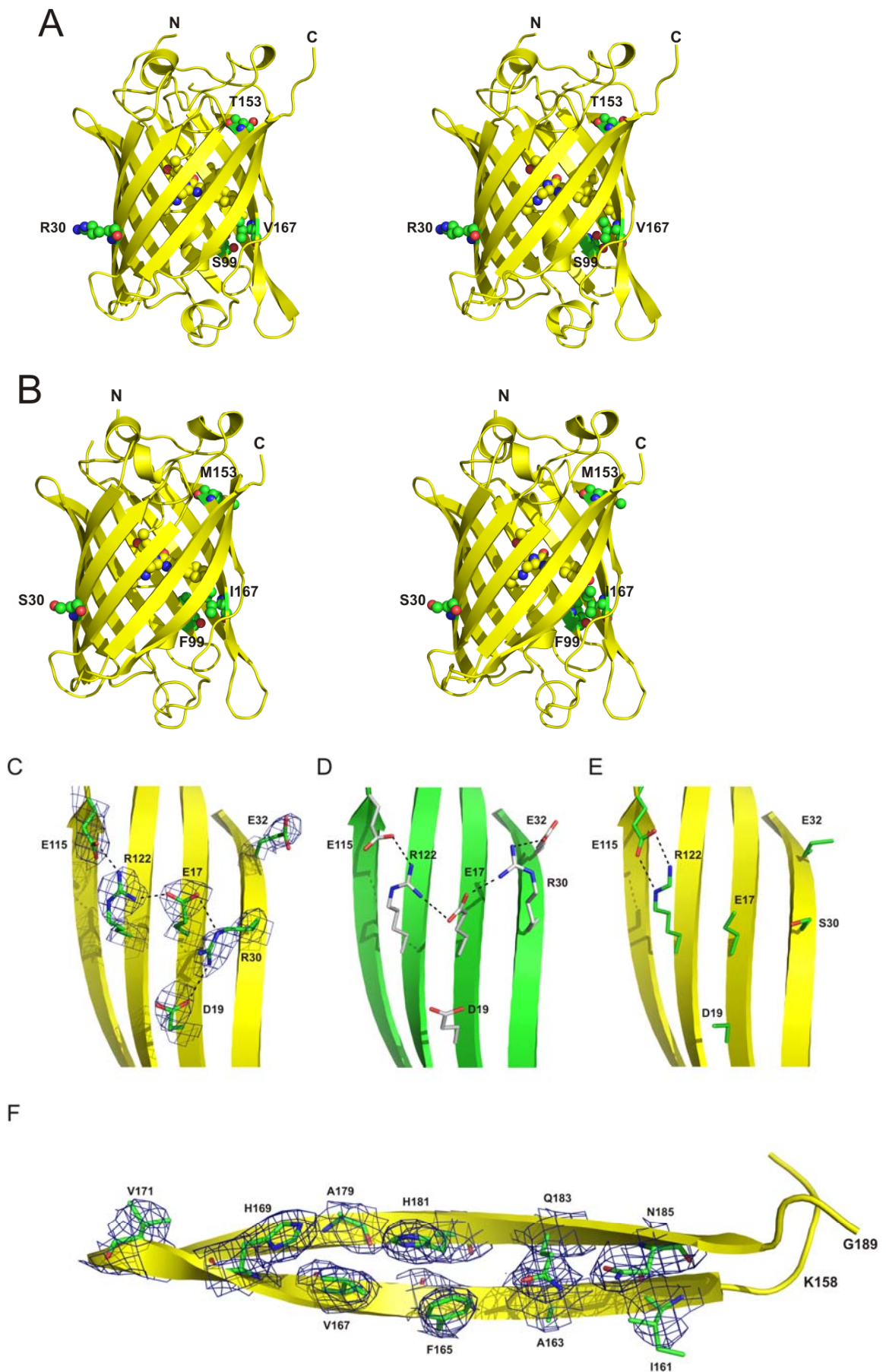


Figure 4

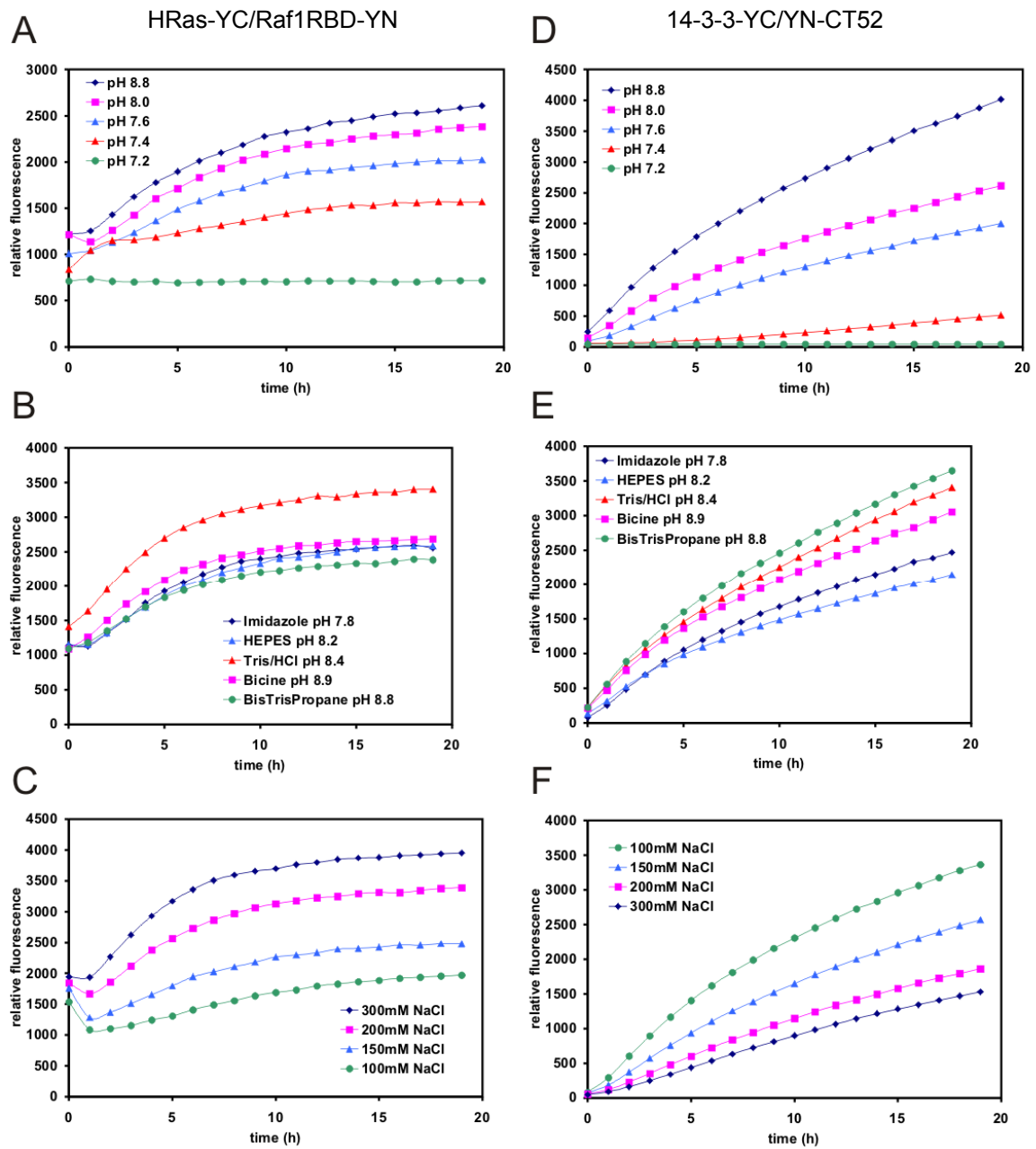
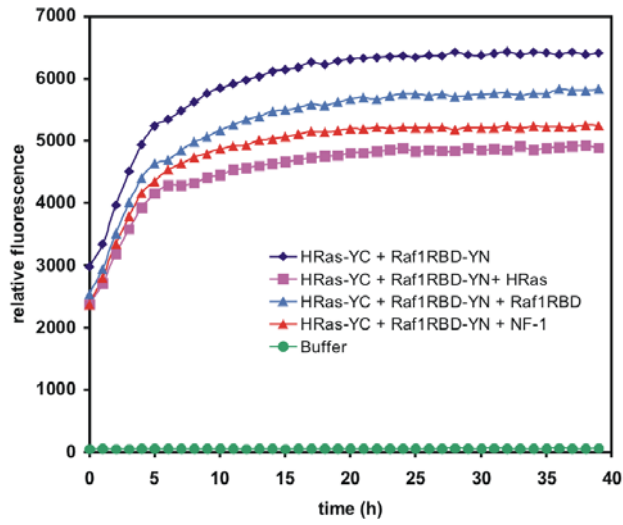
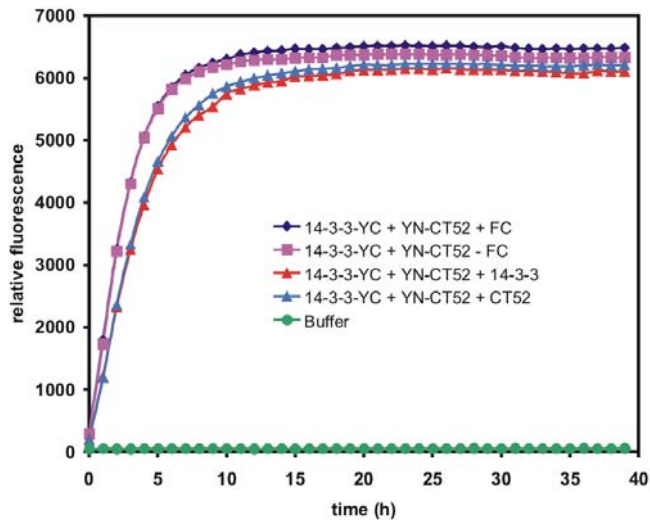


Figure 5

A



B



C

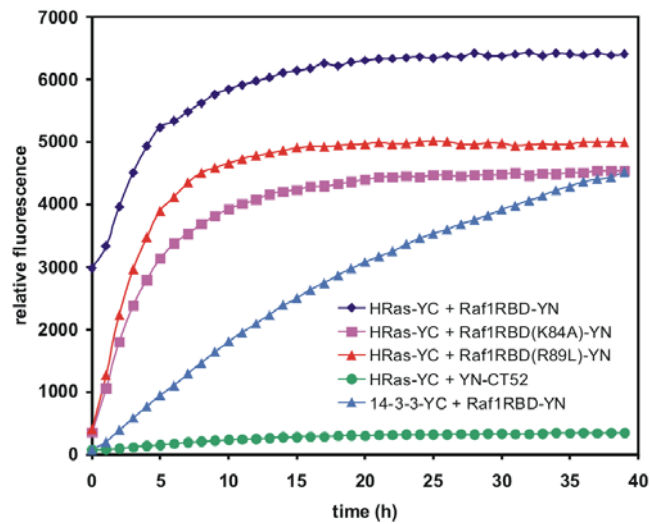
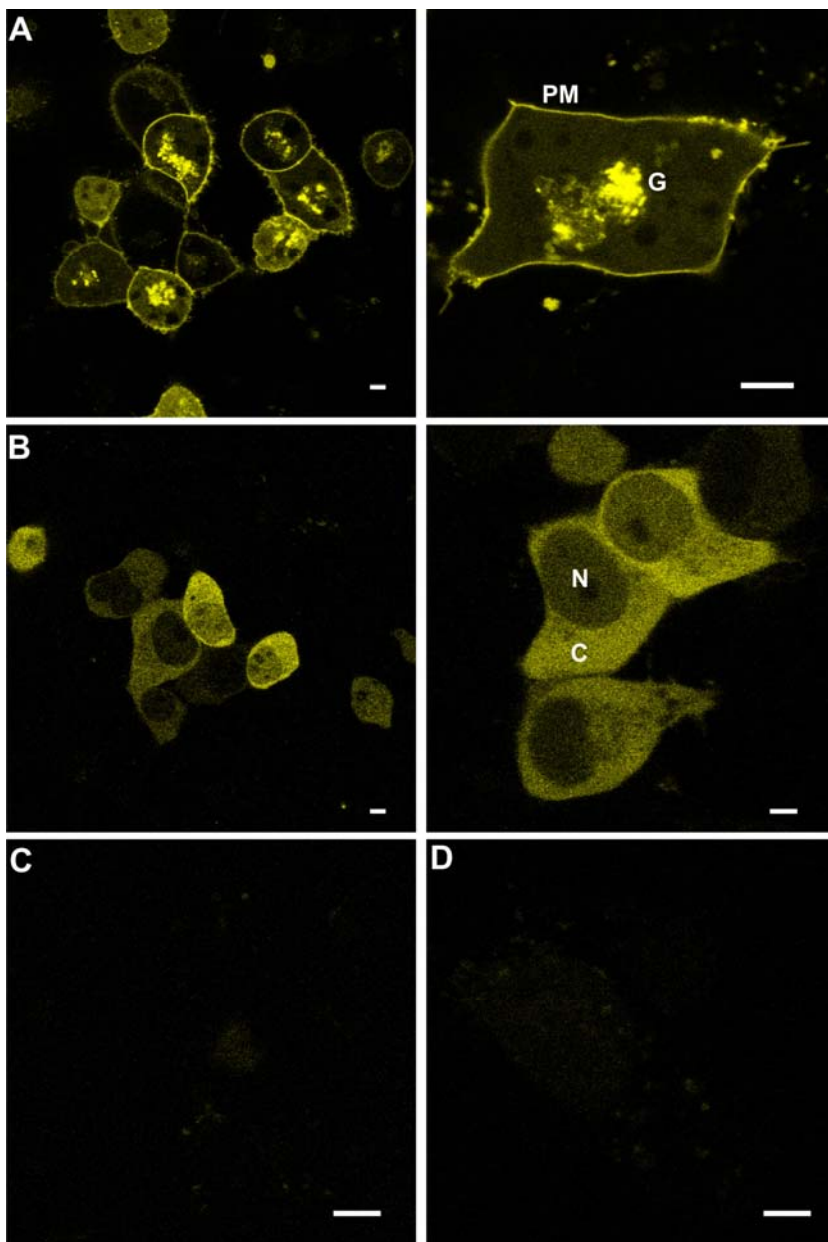


Figure 6



6.2 Impaired binding of 14-3-3 to Raf1 in Noonan and LEOPARD syndromes implies new ways of therapeutic intervention in diseases with increased Ras signaling

Benjamin Schumacher^{1#}, Corinna Ottmann^{2#}, Michael Weyand¹, Jürgen Kuhlmann², and Christian Ottmann^{1*}

¹Chemical Genomics Centre, Otto-Hahn-Strasse 15, 44227 Dortmund, Germany

²Max-Planck Institut für Molekulare Physiologie, Abteilung Strukturelle Biologie, Otto-Hahn-Strasse 11, 44227 Dortmund, Germany

contributed equally

*Correspondence: christian.ottmann@cgc.mpg.de

Noonan and LEOPARD syndromes are developmental disorders caused by increased Ras signaling due to mutations in *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS* and *RAF1*. In Raf1, nine mutations cluster around Ser²⁵⁹, a regulatory site for inhibition by 14-3-3 proteins. Here, we show that these mutations impair binding of 14-3-3 proteins to Raf1 and alter its subcellular localization by promoting Ras-mediated plasma membrane recruitment of Raf1. By providing biophysical binding data, the 14-3-3/Raf1pS²⁵⁹ 2.4Å crystal structure and cellular analyses we present a mechanistic link between a well-described human developmental disorder and the impairment of a 14-3-3/target protein interaction. This study accentuates the role of regulation by 14-3-3 proteins as a possible single source for a human disease implicating a potential therapeutic benefit of targeting 14-3-3 protein-protein interactions. Modulating the Raf1/14-3-3 interaction with a stabilizing molecule similar to the fungal toxin fusicoccin may lead to novel therapeutic approaches in diseases with an overactive Ras-Raf-MEK-ERK pathway.

Running title: Structural basis for inhibition of Raf1 by 14-3-3

Introduction

Noonan syndrome is an autosomal dominant disorder caused by activating mutations in the Ras-Raf-MEK-ERK pathway genes *PTPN11*, *SOS1* and *KRAS* in about 60% of known cases (Tartaglia et al., 2001; Roberts et al., 2007; Schubbert et al., 2006). In LEOPARD syndrome, mutations in *PTPN11* account for 90% of cases (Digilio et al., 2002). Two recent publications report *RAF1* to be mutated in a group of patients with Noonan or LEOPARD syndrome (Razzaque et al., 2007; Pandit et al., 2007). Raf1 is a pivotal component of the Ras-MAPK pathway that couples extracellular signaling mediated via ligand-bound receptor tyrosine kinases (RTKs), SOS and activated Ras to the cytoplasmic kinases MEK and ERK which, in turn, activate transcription factors like Elk-1, Ets and Sp1 (Wellbrock et al., 2004). To be activated, Raf1 needs to be recruited to the plasma membrane by activated Ras (Stokoe et al., 1994; Marais et al., 1995). Binding of 14-3-3 proteins have been reported to disrupt Ras-Raf interaction (Dumaz & Marais, 2003) and inhibit Ras-mediated plasma membrane recruitment of Raf1 (Light et al., 2002). Three 14-3-3 binding sites in Raf have been identified: Ser²⁵⁹, Ser⁶²¹ (Light et al., 2002; Muslin et al., 1996), and Ser²³³ (Dumaz & Marais, 2003). Binding of 14-3-3 to Raf1 Ser²³³ and Ser²⁵⁹ seems to play an inhibitory role (Rommel et al., 1999, Dumaz & Marais, 2003) while 14-3-3 binding to Ser⁶²¹ is reported to activate Raf1 (Tzivion et al., 1998; Yip-Schneider et al., 2000).

The *RAF1*, mutations found in the aforementioned genetic studies (Razzaque et al., 2007, Pandit et al., 2007) cluster around Ser²⁵⁹ (Figure 1). Mutated sites include Arg²⁵⁶ (R256S), Ser²⁵⁷ (S257L), Ser²⁵⁹ (S259F), Thr²⁶⁰ (T260R, T260I), Pro²⁶¹ (P261S, P261A, P261L) and Val²⁶³ (V263A). The mutations S257L, P261S, P261A and V263A have been shown to enhance Raf1 kinase activity (Razzaque et al., 2007) while mutations S259F and P261S in combination with mutations of Ser⁶²¹ impaired 14-3-3 binding to Raf1 *in vivo* (Pandit et al., 2007). Additionally, a gene knockdown using morpholino antisense oligonucleotides of *ptpn11* or *raf1* in zebrafish embryos displayed differences in heart malformations, suggesting a distinct role of Raf1 in heart development as observed from accumulation of *RAF1* mutations in Noonan and LEOPARD syndrome patients with hypertrophic cardiomyopathy (Pandit et al., 2007).

14-3-3 proteins are ubiquitous eukaryotic adapter proteins involved in the regulation of cell-cycle control, signal transduction, protein trafficking and apoptosis (Hermeking and Benzinger, 2006). They mediate their physiological effects by binding to other proteins, modulating their partners' subcellular localization, enzymatic activity or their ability to interact with further proteins (Aitken, 2006). Besides interacting with Raf1 (Fantl et al., 1994; Freed et al., 1994; Fu et al., 1994), 14-3-3 proteins for example regulate the activity of the cell-cycle phosphatase Cdc25 (Conklin et al., 1995; Peng et al., 1997), the Cdk inhibitor p27^{Kip1} (Sekimoto et al., 2004) and guide the transport of the potassium channel KCNK3 to the plasma membrane (O'Kelly et al., 2002). 14-3-3 proteins have also been implicated in a variety of human diseases. In addition to their participation in diverse cancers (Hermeking, 2003; Tzivion et al., 2006) they have been found to play a role in the development of neurodegenerative diseases (Berg et al., 2003) and bind to proteins from human pathogenic organisms like ExoS from *Pseudomonas aeruginosa* (Fu et al., 1993).

The first crystal structures of 14-3-3 proteins were published in 1995 (Liu et al., 1995, Xiao et al., 1995). Since then, several 14-3-3 structures in complex with phosphopeptides (Yaffe et al., 1997; Petosa et al., 1998; Rittinger et al., 1999; Wilker et al., 2005) and the ζ isoform in complex with serotonin *N*-acetyltransferase (Obsil et al., 2001) have been solved. Extending the structural biology of 14-3-3 proteins to be influenced by small molecules, a ternary complex of a plant 14-3-3 protein complexed to the H⁺-ATPase and stabilized by the fungal toxin fusicoccin has previously been published by our group (Würtele et al., 2003; Ottmann et al., 2007A). Recently, a structural comparison of all seven human 14-3-3 isoforms has been reported, either in apo-form or complexed to phosphopeptides or, in the case of the β isoform, in complex with the unphosphorylated 14-3-3 binding motif of ExoS (Yang et al., 2006). Additionally, the structure of a slightly larger part of this ExoS motif in complex with the ζ isoform has been solved in our lab (Ottmann et al., 2007B).

Here, we present biophysical, structural and cellular data that mechanistically connect a well-described human disorder with the impaired regulation of the Raf1 kinase by 14-3-3 proteins. Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements of Raf1pSer²⁵⁹ peptides binding to 14-3-3 ζ explain the effect of Raf1 mutations found in a subset of Noonan and LEOPARD syndrome patients. The corresponding 2.4 Å

crystal structure of a Raf1 phosphopeptide comprising all mutated amino acid positions in complex with the ζ isoform of 14-3-3 corroborate these findings. The effect of the Raf1 mutations on the subcellular distribution is visualized by *in vivo* localization studies using GFP-Raf1 fusion constructs in HEK293 cells. In addition, cellular bimolecular fluorescence complementation (BiFC) studies demonstrate the effect of the mutations on Raf1 binding to cytoplasmically localized 14-3-3 proteins and plasma membrane localized Ras. These data strongly support an essential negative regulatory role of 14-3-3 through binding to the N-terminus of Raf1 and suggest the possibility of therapeutically addressing the Raf1/14-3-3 regulatory complex in diseases with an overactive Ras-Raf-MAPK pathway.

Results

***In vitro* effects of the Raf1 mutations**

To study the effect of the reported Raf1 mutations in Noonan and LEOPARD syndromes with respect to the interaction with 14-3-3, we used synthetic Raf1pSer²⁵⁹ peptides bearing the corresponding amino acid substitutions. Isothermal titration calorimetry was used to quantify the binding affinities of these mutated phosphopeptides to 14-3-3 ζ . The results are summarized in Figure 2D. The wild-type Raf1pSer²⁵⁹ peptide (NH₂-²⁵⁵QRSTpSTPNVHM²⁶⁵-COOH) bound with an apparent K_D of 7.5 μ M to 14-3-3 ζ while the mutated peptides – with the exception of the Val263Ala substitution – displayed lower affinities or could not be measured at all. Mutating Ser²⁵⁷ to leucine (S257L), Ser²⁵⁹ to phenylalanine (S259F), Thr²⁶⁰ to arginine (T260R), and Pro²⁶¹ to serine or leucine (P261S, P261L) totally abrogate detectable binding of these peptides to 14-3-3.

Several additional mutations were also examined and were found to have a less dramatic effect on 14-3-3 binding. The phosphopeptide bearing the Arg²⁵⁶ to serine substitution was measured to bind to 14-3-3 ζ with a K_D of 30 μ M which is about 4-fold lower than the wild-type peptide. Changing of Pro²⁶¹ to alanine produced a phosphopeptide whose binding to 14-3-3 ζ was significantly impaired, but still detectable (56.7 μ M). The difference in binding compared to the other two mutations at this position (P261S, P261L) which totally impede binding to 14-3-3 might be due to the smaller side chain of alanine. The only mutation found in the Ser²⁵⁹ motif of Raf1 whose *in vivo* effects cannot be unambiguously explained by the structure and

the ITC data is V263A. We observed a binding affinity of the corresponding peptide that is at least as strong as the wild-type peptide (K_D of 6.5 μ M). The obvious discrepancy between this *in vitro* observation and the genetic data is most probably due to additional *in vivo* effects.

The 14-3-3 ζ /Raf1pSer²⁵⁹ peptide complex

In order to provide a mechanistic rationale for the effects of the Raf1 mutations found in Noonan and LEOPARD syndromes and to corroborate our biophysical data, we solved the structure of a Raf1-derived phosphopeptide (NH₂-²⁵⁵QRSTpSTPNVHM²⁶⁵-COOH) in complex with the ζ isoform of human 14-3-3. Although a similar structure has been published before (Petosa et al., 1998), due to its resolution of 3.6 Å this work is only of limited use for the analysis of single amino acid substitutions.

We obtained crystals of the 14-3-3 ζ /Raf1pSer²⁵⁹ peptide complex by mixing a synthetic phosphopeptide (NH₂-²⁵⁵QRSTpSTPNVHA²⁶⁵-COOH) with 14-3-3 ζ prior to crystallization setups. The resulting crystals diffracted to 2.4 Å and the structure was solved by molecular replacement using phases from the 14-3-3 ζ apo structure (Rittinger et al., 1999). For the 14-3-3 dimer we found interpretable density for 228 (14-3-3 ζ monomer A) and 230 (14-3-3 ζ monomer B) out of 246 residues. For the Raf1pSer²⁵⁹ peptide, the density allowed building of nine (²⁵⁶RSTpSTPNVH²⁶⁴) out of eleven residues. The root mean square deviation of the 14-3-3 backbone C α -atoms is 0.73 Å when 224 residues from one monomer were compared with the corresponding 14-3-3 ζ monomer previously solved by Rittinger et al.. The 14-3-3 ζ dimer displays the characteristic W-like shape with each monomer constituting an amphipathic groove that harbors the Raf1pSer²⁵⁹ peptide. The peptide binds in the groove in an elongated conformation and occupies approximately 70% of the total length of this ligand binding channel (Figure 2A). In Figure 2B, we show the omit map of the RafpSer²⁵⁹ peptide bound to monomer A of 14-3-3 ζ (14-3-3 ζ A) contoured at 3 σ . Binding of the peptide to 14-3-3 is mainly driven by electrostatic interactions. The coordination of the strong negative charge of the pSer²⁵⁹ phosphate group by the 14-3-3 residues Lys⁴⁹, Arg⁵⁶ and Arg¹²⁷ is the main contributor of the interaction. Additionally, H-bonds are established between the side chain hydroxyl of Ser²⁵⁷ of Raf and the heterocycle nitrogen of the side chain of Trp²²⁸ of the 14-3-3 protein. Contacts of main chain atoms of Thr²⁵⁸ and Thr²⁶⁰ from Raf with Asn²²⁴, Asn¹⁷³ and Lys⁴⁹ of 14-3-3 ζ , respectively, complete the picture of a protein-protein interface

which is dominated by hydrophilic contacts. Some hydrophobic interactions are established between Thr²⁶⁰, Pro²⁶¹ of Raf1 and Trp²²⁸, Gly¹⁶⁹, Ile²¹⁷, Leu²¹⁶ of 14-3-3 ζ (Figure 2C).

We previously reported the structure of a plant 14-3-3 protein complexed to a phosphopeptide derived from the plant H⁺-ATPase PMA2 and the fungal toxin fusicoccin (Würtele et al., 2003). The 14-3-3 binding site in PMA2 is a so-called mode III motif where the polypeptide chain ends at the position +1 C-terminal of the phosphorylated serine or threonine (QSYpTV-COOH). Therefore, the binding groove of a 14-3-3 monomer is occupied to about 2/3 of the total length by this peptide. The fungal toxin fusicoccin is filling this gap in the protein-protein interface, contacting simultaneously both protein partners. Since the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide displays a mode I motif (Rittinger et al., 1999) that continues C-terminal from the phosphorylated serine the fusicoccin binding site in 14-3-3 is partly occupied by this peptide (Figure 3A). This is in line with our finding that fusicoccin does not bind to the binary 14-3-3/Raf1Ser²⁵⁹ complex (data not shown).

Nevertheless, also in the 14-3-3 ζ /Raf1Ser²⁵⁹ structure, a cavity in the interface of the two proteins can be found where the polypeptide chain of the 14-3-3 partner exits the binding groove via the Pro²⁶¹-induced kink (Figure 5C). The similar situation can be observed with the only structure of a 14-3-3 protein complexed to a nearly full length partner, the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT, Figure 5D).

***In vivo* effects of the Raf1 mutations**

In order to study the effect of the reported Raf1 mutations *in vivo*, we co-transfected HEK293 cells with a Green Fluorescent Protein (GFP)-labelled N-terminal Raf1 construct (GFP-Raf1₁₋₂₆₄). Raf1 is activated following recruitment by active Ras to the plasma membrane (Stokoe et al., 1994; Marais et al., 1995). This process is counteracted by 14-3-3 proteins that bind to the N-terminus of Raf1 and retain it in the cytoplasm (Dumaz and Marais, 2003; Light et al., 2002). The two inhibitory 14-3-3 binding sites in Raf1 are Ser²³³ and Ser²⁵⁹ (Dumaz and Marais, 2003; Rommel et al., 1994) and a third site, Ser⁶²¹, is reported to be activating upon binding of 14-3-3 (Tzivion et al., 1998; Yip-Schneider et al., 2000). Therefore, the activity status of Raf1 is largely reflected by its complexation with Ras or 14-3-3. We chose a Raf1 construct comprising the first 264 amino acids, which includes both N-terminal 14-3-3 interaction sites, to analyse the effect of the reported mutations in the Raf1Ser²⁵⁹

region on inhibitory 14-3-3 binding. When HEK293 cells were transfected with GFP-Raf1₁₋₂₆₄ WT in the absence of growth-stimulating agents like EGF (Epidermal Growth Factor) GFP-fluorescence was found predominantly in the cytoplasm with weaker labelling of the nucleus (Figure 4A, WT, -EGF). EGF had no clear visible effect when added to these cells (Figure 4A, WT, +EGF), labeling was still found mainly in the cytoplasm. In the absence of EGF, the GFP-Raf1 construct bearing the mutation S259F (Figure 4A, S259F, -EGF) displayed a stronger nuclear than cytoplasmic localization. This result is in line with a previously reported tendency of a GFP-Raf1-RBD (Ras Binding Domain, residues 51-131) fusion protein to be localized preferentially in the nucleus in addition to the cytoplasm (Chiu et al., 2002). When EGF was given to these cells, in addition to the mainly nuclear distribution of the GFP-Raf fusion protein labelling of the plasma membrane was observed (Figure 4A, S259F, +EGF). The mutations T260R and V263A had the same effect on the subcellular distribution of the GFP-Raf1 constructs as the S259F mutation in the absence of EGF. Also here, we found a significantly stronger nuclear than cytoplasmic localization (Figure 4A, T260R, V263A, -EGF). However, in the presence of EGF they displayed a different picture. Whereas the mutation T260R caused a clear plasma membrane localization of the corresponding GFP-Raf1 construct (Figure 4A, T260R, +EGF) the V263A amino acid substitution resulted only in a very faint labelling of the plasma membrane (Figure 4A, V263A, +EGF).

Since we assumed that the endogenous levels of Ras proteins responsible for the plasma membrane recruitment of Raf1 was too low in comparison to the expressed GFP-Raf1 constructs, we co-transfected HRas together with GFP-Raf1₁₋₂₆₄ WT or the corresponding mutants to obtain clearer results on the effects of the Raf1 mutations on subcellular localization. The same objection would not hold true for endogenous levels of 14-3-3 proteins in the cytoplasm since 14-3-3 proteins can make up to 2% of total protein in mammalian cells (Fu et al., 2000). Therefore the endogenous amount of 14-3-3 proteins in HEK293 cells can be expected to be sufficient for quantitative interaction with the expressed GFP-Raf1₁₋₂₆₄ constructs. When HEK293 cells were co-transfected with HRasWT and GFP-Raf1₁₋₂₆₄WT, labelling was found to be located diffusely throughout the cytoplasm in the absence of EGF (Figure 4B, WT, -EGF) supposedly due to complexation of the Raf1 construct with endogenous 14-3-3 proteins. In the presence of EGF, the co-expressed HRasWT was activated and recruited the GFP-Raf1₁₋₂₆₄ construct to the cytoplasm and the golgi (Figure 4, B,

WT, +EGF). The GFP-Raf1 protein bearing the T260R mutation displayed plasma membrane and golgi localization already in the absence of EGF (Figure 4B, T260R, -EGF), an effect that could not further be enhanced upon addition of EGF (Figure 4B, T260R, +EGF). In our experiments we used HRas which is known to localize to the plasma membrane and the golgi apparatus (Chiu et al., 2002; Rocks et al., 2005). Therefore, the observed subcellular distribution of the mutated GFP-Raf1₁₋₂₆₄ T260R construct suggests an enhanced Ras-association as a consequence of the impaired binding to 14-3-3 proteins.

To test the effect of the complete set of mutations in comparison we co-transfected the corresponding GFP-Raf1 constructs with HRasWT in the absence of EGF stimulation. As mentioned before, wild-type GFP-Raf1₁₋₂₆₄ was found to be localized predominantly in the cytoplasm (Figure 5A). In contrast, the GFP-Raf1 P261L mutated protein localized to the plasma membrane and the golgi (Figure 5B). The eight remaining mutations behaved in the same way as P261L, GFP labelling was found at the plasma membrane and the golgi (Figure 5C). In order to support the hypothesis that the observed subcellular localization of the GFP-Raf1 fusion proteins was due to Ras-mediated recruiting, we additionally introduced the R89L mutation into the GFP-Raf1 constructs, which is known to abrogate Ras-Raf1 interaction (Block et al., 1996). This double-mutated proteins exhibited a predominant nuclear localization with weaker labelling of the cytoplasm and no visible localization to the plasma membrane or the golgi (Figure 5D). These results speak in favour of a model where the cytoplasmic localization of the wild-type GFP-Raf1 protein is caused by complexation with endogenous cytosolic 14-3-3 proteins. The Raf1 mutations identified in a subset of patients with Noonan and LEOPARD syndromes impair Raf1 binding to 14-3-3 proteins and promote the association of the GFP-Raf1 construct to plasma membrane- and golgi-localized HRas. If additionally to the mutations at the 14-3-3 binding site the R89L mutation is introduced into GFP-Raf1 the resulting proteins neither associate with 14-3-3 nor Ras and consequently are localized in the nucleus and – significantly weaker – in the cytoplasm (Figure 5D).

To verify that the observed different localization of the GFP-Raf1 constructs is due to its interaction with 14-3-3 proteins or Ras, we conducted bimolecular fluorescence complementation (BiFC) studies. We co-transfected HEK293 cells with Raf1₁₋₂₆₄ fused to the N-terminal part of YFP (YN-Raf1₁₋₂₆₄) and either 14-3-3 ζ or Ras fused to the C-terminal part of YFP (YC-Ras or YC-14-3-3 ζ). The YN-Raf1WT construct could

interact with both YC-14-3-3 ζ in the cytoplasm and with YC-Ras at the plasma membrane and the golgi (Figure 5E). Mutation of Ser²⁵⁹ to phenylalanine (S259F) abrogated interaction with 14-3-3 ζ , but didn't interfere with binding of the same construct to Ras (Figure 5F). On the other hand, introducing a mutation that diminishes the interaction of Raf1 with Ras (R89L) had no effect on the ability of Raf1 to bind to 14-3-3 ζ (Figure 5G). Finally, a Raf1 construct bearing both mutations bound neither to 14-3-3 ζ nor to Ras (Figure 5H). These *in vivo* interaction studies strongly support the interpretation that the observed different locations of the GFP-Raf1 constructs shown in Figure 4 and Figure 5 can indeed be explained by the interaction with 14-3-3 proteins or Ras. All the other mutations showed the same effect as S259F in that the interaction with 14-3-3 ζ was abrogated and interaction with Ras remained unaffected (data not shown).

Discussion

Raf1 mutations causing Noonan and LEOPARD syndromes

In addition to its well-known role as an oncogene and as a central protein kinase in extracellularly regulated signal-transduction pathways Raf1 has very recently gained considerable interest as being implicated in two developmental disorders, Noonan and LEOPARD syndromes. These syndromes are caused by mutations activating the Ras-Raf-MEK-ERK pathway (Tartaglia et al., 2001; Roberts et al., 2007; Schubbert et al., 2006; Digilio et al., 2002). In a subset of patients, *RAF1* mutations coding for amino acid substitutions in the N-terminal region surrounding Ser²⁵⁹ (Figure 1) cause activation of the Raf1 kinase by impairing binding to 14-3-3 proteins (Razzaque et al., 2007; Pandit et al., 2007). We have biophysically analyzed the effect of these mutations on Raf1 binding to 14-3-3 ζ and solved the crystal structure of 14-3-3 ζ in complex with a Raf1S²⁵⁹-derived phosphopeptide comprising all mutated amino acid positions. Finally, we studied Raf1 subcellular localization and its interaction with 14-3-3 and Ras depending on the presence of the reported mutations.

We employed isothermal titration calorimetry (ITC) to quantify the effects of the Raf1 mutations on the binding affinities to 14-3-3. For binding of the wildtype Raf1-phosphopeptide to 14-3-3 ζ we determined a K_D of 7.5 μ M. The 14-3-3 binding site surrounding Raf1Ser²⁵⁹ has previously been analyzed by surface plasmon resonance (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997) and was found to bind to 14-3-3 with a K_D of \sim

120 nM. The K_D we obtained via ITC is about a factor of at least 60 lower than this value. The tendency, that 14-3-3/phosphopeptide binding measured via ITC resulted in higher K_D values as compared with those obtained via SPR has been observed previously by us (Würtele et al., 2003; Ottmann et al., 2007A) and others (Macdonald et al., 2005). The mutations coding for the amino acid substitutions S257L, S259F, T260R, P261S, and P261L totally abrogate *in vitro* binding of a Raf1 phosphopeptide to 14-3-3 ζ (Figure 2D), which agrees nicely with our structural information (Figure 2A-C). Exchanging Ser²⁵⁷ for leucine diminishes the polar contact with Trp²²⁸ of the 14-3-3 and introduces a larger side-chain that sterically clashes with Trp²²⁸ and additionally with Tyr¹⁷⁹ and Glu¹⁸⁰ of 14-3-3 ζ . The large, unphosphorylatable and hydrophobic side chain of a phenylalanine at position 259, instead of a serine, cannot be accommodated by the conserved basic cluster in the amphipathic groove of 14-3-3 proteins (Lys⁴⁹, Arg⁵⁷ and Arg¹²⁷). Substitution of Thr²⁶⁰ for a large and positively charged arginine residue sterically and electrostatically interferes with either Lys¹²⁰ or with Ile²¹⁷ and Leu¹⁷² within a nonpolar patch of the 14-3-3 groove. Lastly, the exchange of Pro²⁶¹ with serine or leucine not only neutralizes the proline-induced kink in the main chain of the polypeptide which provides an exit from the 14-3-3 binding channel, but also introduces side chains at this position that might be too large to be accommodated by the corresponding binding site in 14-3-3.

The remaining mutations R256S, P261A and T260I have with resulting K_D s of 30 μ M, 56.7 μ M and 42 μ M, respectively, a less dramatic effect on 14-3-3 binding (Figure 2D). Our structure revealed a water-mediated intramolecular contact between the Arg²⁵⁶ side chain and the phosphate group of pSer²⁵⁹ that might stabilize the phosphopeptide (Figure 2C) and which could not be established by a serine side chain. An alanine residue at the position of the essential Pro²⁶¹ site seems to be less detrimental than bigger side chains like in the P261S and P261L mutations. Substituting Thr²⁶⁰ for isoleucine introduces a larger, more hydrophobic side chain in a thermodynamically unfavoured proximity to the charged and hydrophilic Lys¹²⁰ and Asn¹⁷³ of 14-3-3. The only mutation found in the Ser²⁵⁹ motif of Raf1 whose *in vivo* effects cannot be unambiguously explained by the structure and the ITC data is V263A. These *in vitro* findings are in line with the results of the cellular studies in that impaired 14-3-3 binding of these mutants in the cytosol of HEK293 cells results in a more effective Ras-mediated recruitment to the plasma membrane (Figure 4, Figure 5B, C). The only exception to this result is the mutation of Val²⁶³ to alanine (V263A).

Here, the structural and ITC data contradict with the *in vivo* findings. From the crystal structure it is not obvious why this mutation impairs the association of Raf1 with 14-3-3 and the *in vitro* binding measurements confirm this perception. A phosphopeptide bearing the V263A mutation (Raf1pSer²⁵⁹V263A) bound to 14-3-3 ζ at least as well as the corresponding wild-type peptide (Raf1pSer²⁵⁹WT, Figure 2D). On the other hand, our results of the cellular localization studies agree with the *in vivo* findings of Razzaque et al., who showed that Raf1 bearing the V263A mutation and expressed in HEK293 cells displayed almost four-fold higher kinase activity than wild-type Raf1, which can be explained by impaired inhibitory 14-3-3 binding. They obtained similar results with the mutations S257L, P261S and P261A. Although these authors did not study the effect of the Raf1 mutants on subcellular localization, we propose that the higher kinase activity status is due to increased Ras-mediated plasma membrane recruitment and subsequent activation. In the case of the V263A mutant, it can be speculated that secondary effects like a decreased phosphorylation status of Ser²⁵⁹ might be the reason for the impaired *in vivo* binding to 14-3-3. The experiments employing the bimolecular fluorescence complementation method strongly support the interpretation that the observed different locations of the GFP-Raf1 constructs shown in Figures 4 and 5 can indeed be explained by the interaction with 14-3-3 proteins or Ras. Here, direct interaction of the N-terminal Raf1 construct with 14-3-3 proteins or Ras was analyzed. The mutations surrounding Ser²⁵⁹ diminished binding to 14-3-3 proteins without interfering with association to plasma membrane localized Ras. Similarly, abrogation of Ras interaction by introducing the R89L mutation in the Raf1 construct is not influencing the direct association with 14-3-3 proteins.

Role of 14-3-3 proteins in Raf1 regulation.

An important feature of 14-3-3 proteins is their ability to regulate the activity of a lot of their partner proteins by modulating their subcellular distribution. For example, one of the most important regulatory mechanisms of the regulation of the cell-cycle phosphatase Cdc25C is its sequestration in the cytoplasm by 14-3-3 proteins (Conklin et al., 1995; Peng et al., 1997). The class II histone deacetylase HDAC4 is regulated in a similar manner by binding to 14-3-3 proteins resulting in its export from the nucleus and, consequently, their inactivation (Wang et al., 2000). The proapoptotic transcription factor FOXO is also inactivated through retention in the cytoplasm by 14-3-3 proteins (Van Der Heide, 2004). 14-3-3 proteins can also

facilitate nuclear import like in the case of the catalytic subunit of human telomerase (Seimiya et al., 2000). In addition to its role regarding Raf1, regulating other protein kinases such as Chk1 (Dunaway et al., 2004) and c-Abl (Yoshida et al., 2005) is also a consequence of 14-3-3 mediated subcellular localization. Finally, plasma membrane recruitment of the adapter protein KSR, another component of the Ras signaling pathway, is inhibited in a manner similar to Raf1 by 14-3-3 binding (Müller et al., 2001). These examples document the role of 14-3-3 proteins as wide-spread and important allocators of many different proteins in the cell.

To the best of our knowledge, this study analyzing mutations clustering around Ser²⁵⁹ in Raf1 is the first which clearly shows a mechanistic link between a well-described human disorder and the modulation of a 14-3-3/target protein interaction. In addition to displaying developmental disorders patients with Noonan or LEOPARD syndrome show an increased risk for several malignancies (Schubbert et al., 2007). This is not surprising given the fact that activating mutations in the Ras-Raf-MEK-ERK pathway are present in 30% of all human cancers (Downward, 2003). For *RAF1* there are some mutations reported in conjunction with human cancers (Emuss et al., 2005) and the S259A mutation is one of the two *RAF1* mutations found in the COSMIC database (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/).

Our study strongly supports the hypothesis that binding of 14-3-3 proteins to the N-terminus of Raf1 attenuates the Ras-Raf-MEK-ERK pathway by sequestering Raf1 in the cytoplasm. Since the Ras binding domain (RBD) is also situated in the N-terminus of Raf1 (amino acids 51-131) and since binding of Ras or 14-3-3 to Raf1 has opposite functional effects, association with these Raf1 protein partners can be expected to be mutually exclusive. As a consequence, the competition of Ras and 14-3-3 proteins for Raf1 leads to activation or attenuation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway. Our cellular localization analyses (Figure 4, 5) suggest that an impairment of 14-3-3 interaction with Raf1 results in enforced plasma membrane recruitment by Ras and illustrates the importance of the subcellular distribution of the Raf1 protein kinase for its biological activity. In addition to the explanation of how the Raf1/14-3-3 binding mutations activate the Ras-Raf-MEK-ERK pathway in a subset of patients with Noonan or LEOPARD syndrome, the conclusions of this work hint at the possibility for therapeutic intervention of such diseases by targeting the corresponding regulatory protein complexes. This could be achieved with small

molecules that stabilize a given 14-3-3/target protein complex. As our structural analyses of the fungal toxin fusicoccin acting on a regulatory 14-3-3 protein complex have shown (Würtele et al., 2003; Ottmann et al., 2007) such a molecule can cause a dramatic physiological response. The crucial question in this regard is the drugability of the 14-3-3/target protein complexes. As shown in Figure 3 cavities at the interface of 14-3-3 proteins with the Raf1Ser²⁵⁹ peptide and with AANAT can be observed at the site, where in the 14-3-3/PMA2 complex fusicoccin is binding. Since these cavities are considerably smaller than the fusicoccin binding site, it remains to be determined if a molecule can be found or designed that specifically can occupy these cavities and stabilize the 14-3-3 protein-protein complex. Currently, we are developing biochemical as well as cellular screening methods to identify such molecules for several 14-3-3/target protein interactions in addition to fragment-based approaches employing protein crystallography. In the case of the Raf1/14-3-3 interaction, the development of such a stabilizing molecule could lead to therapeutical agents that might be used to address developmental disorders like Noonan or LEOPARD syndrome as well as human cancers with an activated Ras-Raf-MEK-ERK pathway.

Experimental procedures

Protein Expression and Purification. The cDNA clone of human 14-3-3 ζ was purchased from OpenBiosystems (Huntsville, USA) and was subcloned into the expression vector pProEx HTb (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Protein expression was induced in *E. coli* BL21 (DE3) by addition of 0.4 mM IPTG at 18°C for 12 h. Purification of His₆-tagged 14-3-3 ζ protein was carried out using standard procedures. After concentrating the protein to 100 mg/ml, it was dialyzed against 20 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 2 mM MgCl₂ and 2 mM DTT and stored at -80°C. The Raf1pSer²⁵⁹ peptide (NH₂-²⁵⁵QRSTpSTPNVHA²⁶⁵-COOH) was synthesized by Biosyntan (Berlin, Germany).

Crystallization and Data Collection. Prior to crystallization, 14-3-3 ζ was diluted to 30 mg/ml and mixed with the Raf1pSer²⁵⁹ peptide in 1:1.5 molar ratio, respectively, in 20 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 2 mM MgCl₂ and 2 mM DTT. Crystals appeared after 3-4 weeks at 20°C in 0.1 M PCB buffer (Sodium propionate, sodium cacodylate, BIS-

TRIS propane, molar ratios: 2:1:2), 27% PEG 1500, 2 mM DTT and grew within 3-4 days to dimensions of 200 x 100 x 100 μ m. For flash-freezing, the crystals were incubated in mother liquor with 35% PEG 1500. Data collection was performed at the Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland and was processed with XDS (Kabsch, 1993). Molecular replacement was carried out with MOLREP with the high-resolution structure of 14-3-3 ζ (PDB code 1QJB) used as the search model. The obtained model was subjected to iterative rounds of model building and refinement using the programs COOT and REFMAC (Murshudov, 1997; Emsley, 1994). Figures were prepared with PYMOL (www.pymol.org).

Coordinates. The atomic coordinates and structure factors of the complex have been deposited in the Protein Data Bank under the ID code 3cu8.

Isothermal Titration Calorimetry. All ITC experiments were carried out with a VP-ITC instrument (MicroCal, Northampton, MA) in buffer containing 20 mM MES pH 6.5 with 2 mM MgCl₂. In the sample cell, a solution of 50 μ M 14-3-3 ζ protein was placed and titrated stepwise with 8 μ l aliquots of a 500 μ M solution of the different Raf1-peptides using a 300 μ l syringe for a total of 35 injections. The equilibration time between each injection was 120sec. The heating power per injection was observed over the reaction time until equilibrium was reached. The association constant K_a ($K_a = 1/ K_d$), molar binding stoichiometry (N), and the molar binding enthalpy (ΔH°) were determined by fitting the binding isotherm by a single binding site model using the Origin7 software (MicroCal). The listed K_D values are the averaged results of at least three independent measurements.

Cloning of GFP-tagged Raf1. The cDNA of Raf1 (acc. no. at NCBI BC018119.2) was ordered from OpenBiosystems (Huntsville, USA) and cloned into pEGFP C1 (Clontech, GenBank Accession #: U55763) using primers with restriction sites for BglIII (sense primer) and EcoRI (antisense primer). Correct ligations and orientations were verified by sequencing.

Cloning of BiFC-constructs of Raf1 and 14-3-3 ζ . For the BiFC-experiments the pcDNA3 vector (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used. As templates for the PCRs the cDNA of Raf1 (NCBI BC018119.2), the EST-clone of 14-3-3 ζ (NCBI

DR762546), and eYFP (generous gift from Kerppola, TK) were used. First, the PCR product of the N-terminal part of eYFP (aminoacids (aa) 1-154) was cloned into pcDNA3 vector using a KpnI / BamHI restriction site. The C-terminal part of eYFP (aa 155-238) was cloned into pcDNA3 vector via a EcoRI / XhoI restriction site. After confirming the correct cloning of the YFP-fragment 14-3-3 ζ was subcloned as C- (EcoRI / XhoI) and N-terminal (KpnI / BamHI) fusion to the split eYFP to get the 14-3-3-BiFC constructs. The gene was amplified by PCR with primers carrying the according restriction site. The Raf1-BiFC construct (aa 1-264) of Raf1 was subcloned as C- and N-terminal fusions. All constructs were confirmed by sequencing.

Site-directed mutagenesis of Raf1-constructs. Site-directed mutagenesis was performed using a Stratagene QuikChange® Kit. All mutated constructs were confirmed by sequencing.

Cell culture and transfection. HEK293 cells originating from human embryonic kidney were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL, New York) and 0.3% antibiotics at 37°C in 7.5% CO₂ atmosphere. Experiments were performed with 5 – 20 cell passages. HEK293 cells were plated on glass cover slips in 24-well plates and transiently transfected according to the manufacturer's instruction with 0.25 µg of plasmid DNA and 5 µl Qiagen's Effectene Transfection Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) in 700 µl of growing medium,

Life cell imaging. HEK293 cells were examined 24 hours after transfection using a Leica TCS SP2 confocal microscope equipped with an argon ion laser used to excite GFP fluorescence at 488 nm. HEK293 cells were cotransfected with pEGFP-C1 Raf1 (wt or mutant) and pCMV-HA HRas (wt or G12V) for GFP-Raf1 localization studies. Complementation studies were performed using an argon ion laser excitation at 514 nm to excite YFP fluorescence. For these studies, HEK293 cells were transiently cotransfected with pcDNA3 vector containing the split YFP fragments and interacting proteins (14-3-3 ζ , HRas, Raf1).

References

Aitken A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin. Cancer. Biol.* 16, 162-172.

Berg D., Holzmann C., Riess O. (2003). 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 752-762.

Block C., Janknecht R., Herrmann C., Nassar N., Wittinghofer A. (1996). Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nat. Struct. Biol.* 3, 244-251.

Chiu V.K., Bivona T., Hach A., Sajous J.B., Silletti J., Wiener H., Johnson R.L. 2nd, Cox AD, Philips M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the golgi. *Nat. Cell. Biol.* 4, 343-350.

Conklin D.S., Galaktinov K., Beach D. (1995). 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7892-7896.

Digilio M.C., Conti E., Sarkozy A., Mingarelli R., Dottorini T., Marino B., Pizzuti A., Dallapiccola B. (2002). Grouping of multiple-lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTNP11 Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 389-394.

Downward J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 11-22.

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

Dunaway S., Liu H.Y., Walworth N.C. (2004). Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J. Cell. Sci.* 118, 39-50.

Emsley P., Cowtan K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta. Cryst. D* 60, 2126–2132.

Emuss V., Garnett M., Mason C., Marais R. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer. Res.* 65, 9719-9726.

Fantl W.J., Muslin A.J., Kikuchi A., Martin J.A., MacNicol A.M., Gross R.W., Williams L.T. (1994). Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 371, 612-614.

Freed E., Symons M., Macdonald S.G., McCormick F., Ruggieri R. (1994). Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* 265, 1713-1716.

Fu H., Coburn J., Collier R.J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2320-2324.

Fu H., Xia K., Pallas D.C., Cui C., Conroy K., Narsimhan R.P., Mamon H., Collier R.J., Roberts T.M. (1994). Interaction of the protein kinase Raf with 14-3-3 proteins. *Science* 266, 126-129.

Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-647.

Hermeking H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 931-943.

Hermeking H., Benzinger A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer. Biol.* 16, 183-192.

Kabsch W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795–800.

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

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

Marais R., Light Y., Paterson H.F., Marshall C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 14, 3136-3145.

Müller J., Ory S., Copeland T., Piwnicka-Worms H., Morrison D.K. (2001). C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol. Cell* 8, 983-993.

Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta. Cryst. D* 53, 240–255.

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

O’Kelly I., Butler M.H., Zilberberg N., Goldstein S. (2002). Forward transport: 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111, 577-588.

Obsil T., Ghirlando R., Klein D.C., Ganguly S., Dyda F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3 ζ :serotonin N-acetyltransferase complex. A role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105, 257–267.

Ottmann C. et al. (2007). Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol. Cell* 25, 427-440.

Ottmann C., Yasmin L., Weyand M., Veessenmeyer J.L., Diaz M.H., Palmer R.H., Francis M.S., Hauser A.R., Wittinghofer A., Hallberg B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J.* 26, 902-913.

Pandit B. et al. (2007). Gain-of-function *Raf1* mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 39, 1007-1012.

Peng C.Y., Graves P.R., Thoma R.S., Wu Z., Shaw A.S., Piwnica-Worms H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1497-1501.

Petosa C., Masters S.C., Bankston L.A., Pohl J., Wang B., Fu H., Liddington R.C. (1998). 14-3-3 ζ binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J. Biol. Chem.* 273, 16305-16310.

Razzaque M.A. et al. (2007). Germline gain-of-function mutations in *Raf1* cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 39, 1013-1017.

Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley L.C., Smerdon S.J., Gamblin S.J., Yaffe M.B. (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* 4, 153–166.

Roberts A.E. et al. (2007). Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 39, 70-74.

Rocks O., Peyker A., Kahms M., Verveer P.J., Koerner C., Lumbierres M., Kuhlmann J., Waldmann H., Wittinghofer A., Bastiaens P.I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307, 1746-1752.

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

Schubbert S., Shannon K., Bollag G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 295-308.

Schubbert S. et al. (2006). Germline *KRAS* mutations cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 38, 331-336.

Seimiya H., Sawada H., Muramatsu Y., Shimizu M., Ohko K., Yamane K., Tsuruo T. (2000). Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J.* 19, 2652-2661.

Sekimoto T., Fukumoto M., Yoneda Y. (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27^{Kip1}. *EMBO J.* 23, 1934-1942.

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

Tartaglia M. et al. (2001). Mutations in *PTPN11*, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 29, 465-468.

Tzivion G., Gupta V.S., Kaplun L., Balan V. (2006). 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin. Cancer Biol.* 16, 203-213.

Tzivion G., Lou Z., Avruch J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 394, 536-539.

Van Der Heide L.P., Hoekman M.F., Smidt M.P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 380, 297-309.

Wang A.H., Kruhlak M.J., Wu J., Bertos N.R., Vezmar M., Posner B.I., Bazett-Jones DP, Yang X.J. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6904-6912.

Wellbrock C., Karasarides M., Marais R. (2004). The Raf proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 875-885.

Wilker E.W., Grant R.A., Artim S.C., Yaffe M.B. (2005). A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J. Biol. Chem.* 280, 18891–18898.

Würtele M., Jelich-Ottmann C., Wittinghofer A., Oecking C. (2003). Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J.* 22, 987-994.

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

Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J., Cantley L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity *Cell* 91, 961–971.

Yang X., Lee W.H., Sobott F., Papagrigoriou E., Robinson C.V., Grossmann J.G., Sundström M., Doyle D.A., Elkins J.M. (2006). Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17237-17242.

Yip-Schneider M.T., Miao W., Lin A., Barnard D.S., Tzivion G., Marshall M.S. (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J.* 351, 151-159.

Yoshida K., Yamaguchi T., Natsume T., Kufe D., Miki Y. (2005). JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell. Biol.* 7, 278-285.

Acknowledgments

We thank Alfred Wittinghofer for helpful discussions and the staff at the Swiss Light Source, beamline X10SA for support during crystallographic data collection.

Figure 1 Schematic representation of the domain structure of Raf1 and clustering of mutated residues in Noonan and LEOPARD syndromes. Regions that are conserved among human Raf isoforms are indicated (CR, conserved region), as well as functional domains (RBD, Ras binding domain, CRD, cysteine-rich domain). Residues that have been found to be mutated in Noonan and LEOPARD syndromes are shown in red, residues that when phosphorylated confer binding to 14-3-3 proteins are shown in blue.

Figure 2 Structure of the 14-3-3 binding motif in Raf1 surrounding Ser²⁵⁹ in complex with 14-3-3 ζ . **(A)** ITC analysis of the interaction between Raf1pSer²⁵⁹ peptide (residues 255 – 265) and 14-3-3 ζ . The dissociation constants (K_D) were measured by titrating 50 μ M of 14-3-3 ζ in the chamber with 500 μ M of the corresponding peptide in the syringe. Top panels, raw heating power over time; bottom panels, fit of the integrated energy values normalized for injected protein. Representative data for two phosphopeptides (WT and V263A) is shown. Table: K_D values of binding of the different phosphopeptides to 14-3-3 ζ . Medians of at least three independent experiments with standard deviations are shown. n.m., not measurable. **(B)** Coordination of the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide as stick model (carbon, oxygen, nitrogen and phosphate atoms are coloured green, red, blue and yellow, respectively) within the 14-3-3 binding groove (brown surface). **(C)** Stereo view of A with an omit electron density map of the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide contoured at 3 σ shown in white. **(D)** Schematic representation of the interaction of the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide with 14-3-3 ζ . Amino acids of Raf1 are shown as sticks coloured as in Figure 3. Residues from 14-3-3 ζ are represented as brown-filled squares. Residues of Raf1 mutated in Noonan and LEOPARD syndromes are labelled in red, electrostatic interactions are indicated by dotted lines.

Figure 3 Structural comparisons and binding interfaces of 14-3-3/target protein complexes. **(A)** Overlay of the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide with the PMA2 phosphopeptide and fusicoccin binding to 14-3-3. The phosphopeptide of the plant

plasma membrane H⁺-ATPase PMA2 (blue) together with the fungal toxin fusicoccin (yellow, PDB code: 1o9f) superimposed on the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide (green) binding to 14-3-3ζ (brown). Equivalent positions of the PMA2 and Raf1 peptides are labelled blue and green, respectively. **(B)** Structure of the tobacco 14-3-3 isoform c (T14-3c) in complex with the last 52 C-terminal amino acids of the plasma membrane H⁺-ATPase PMA2 (PMA2-CT52), stabilized by the fungal toxin fusicoccin (PDB code: 2o98). Left, stereo view of the fusicoccin binding site with fusicoccin shown as stick model in yellow (carbon) and red (oxygen), T14-3c as green and PMA2-CT52 as blue surface. Right, complete ternary complex. **(C)** Structure of human 14-3-3ζ complexed to the Raf1Ser²⁵⁹ phosphopeptide (this study, PDB code: 3cu8). Left, stereo view of the interface region of 14-3-3ζ (brown surface) and Raf1Ser²⁵⁹ (green surface) that corresponds to the fusicoccin binding site shown in A. Right, complete binary complex. **(D)** Structure of human 14-3-3ζ bound to serotonin N-acetyltransferase (NAT, PDB code: 1ib1). Left, stereo view of the interface region of 14-3-3ζ (light green surface) and NAT (dark red surface) that corresponds to the fusicoccin binding site shown in B. Right, complete binary complex.

Figure 4 Localization of GFP-labelled Raf1₁₋₂₆₄ in HEK293 cells. **(A)** Cells transfected with GFP-Raf1₁₋₂₆₄WT or the GFP-Raf1₁₋₂₆₄ constructs bearing the 14-3-3 binding mutations S259F, T260R or V263A in the absence (-EGF) or presence of epidermal growth factor (+EGF, 100 ng/ml). **(B)** Cells co-transfected with HRas and GFP-Raf1₁₋₂₆₄WT or the GFP-Raf1₁₋₂₆₄T260R mutant in the absence (-EGF) or presence of epidermal growth factor (+EGF, 100 ng/ml). Bars = 5 μm in (A) and 20 μm in (B).

Figure 5 Complete set of Raf1 mutants found in Noonan and LEOPARD syndromes influencing the subcellular localization of GFP-labelled Raf1₁₋₂₆₄ in HEK293 cells and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) studies on the interaction with 14-3-3ζ or HRas. **(A)** Cells co-transfected with HRas and GFP-Raf1₁₋₂₆₄WT. **(B)** Cells co-transfected with HRas and the 14-3-3 binding impaired construct GFP-Raf1₁₋₂₆₄P261L. **(C)** Cells co-transfected with HRas and the complete set of Raf1 14-3-3 binding mutants in Noonan and LEOPARD syndromes introduced into GFP-Raf1₁₋₂₆₄. **(D)** Cells co-transfected with HRas and GFP-Raf1₁₋₂₆₄ constructs bearing the Ras binding mutation R89L in addition to the single 14-3-3 binding mutations. **(E)** Cells co-transfected with Raf1₁₋₂₆₄WT N-terminally fused to YFP₁₋₁₅₄ (YN-Raf1₁₋₂₆₄) and 14-

3-3 ζ or HRas N-terminally fused to YFP₁₅₅₋₂₃₈ (YC-14-3-3 ζ or YC-HRas, respectively). (F) Cells co-transfected with YN-Raf₁₋₂₆₄ bearing the 14-3-3 binding mutation S259F and YC-14-3-3 ζ or the constitutively active YC-HRasG12V. (G) Cells co-transfected with YN-Raf₁₋₂₆₄ bearing the Ras binding mutation R89L and YC-14-3-3 ζ or YC-HRasG12V. (H) Cells co-transfected with YN-Raf₁₋₂₆₄ bearing both the 14-3-3 binding mutation S259F and the Ras binding mutation R89L and YC-14-3-3 ζ or YC-HRasG12V. Bars = 5 μ m.

Figure 6 Model proposing the attenuation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway by small molecules that stabilize the inhibitory Raf/14-3-3 complex. (A) In unstimulated cells Raf is sequestered by 14-3-3 proteins in the cytoplasm in an inactive conformation. After dephosphorylation of two serine residues (Ser²³³ and Ser²⁵⁹ in Raf1), 14-3-3 dissociates from Raf that can then be recruited to the plasma membrane by activated Ras. At the plasma membrane Raf itself is activated and phosphorylates MEK. Via an activating phosphorylation of ERK transcription factors like Elk1, Ets and Sp1 stimulate the expression of genes that lead to cell proliferation and in cancers to metastasis and angiogenesis. Furthermore, as the example of Noonan and LEOPARD syndromes show an overstimulation of this pathway can result in developmental defects. (A) The overactivation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway observed in many cancers and in developmental disorders could be neutralized by small molecules that stabilize the inhibitory Raf/14-3-3 complex, thereby preventing Raf plasma membrane recruitment by activated Ras.

Figures

Figure 1

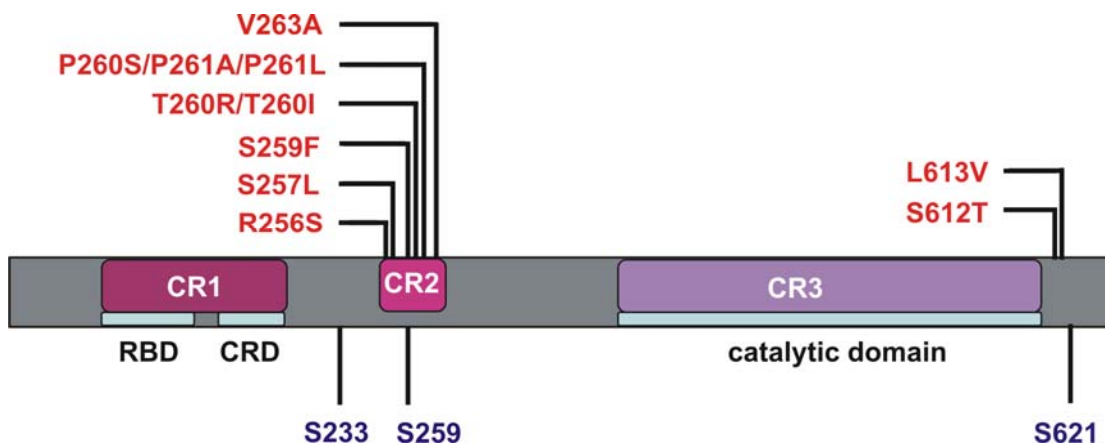
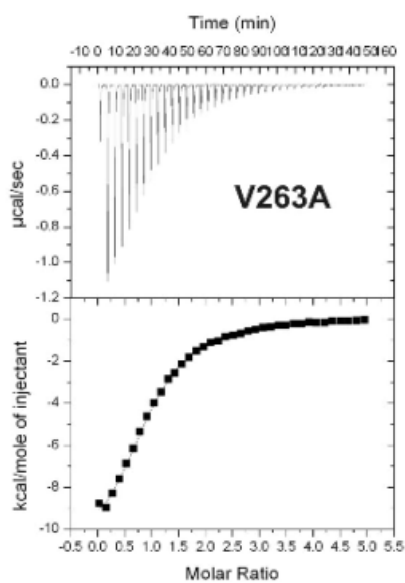
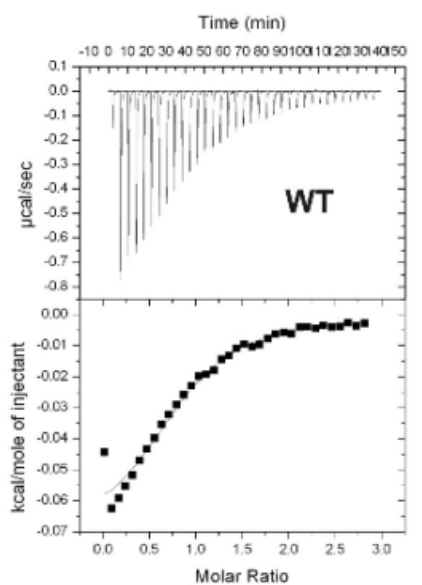


Figure 2

A



Raf1 pSer ²⁵⁹ peptide	K _D (µM)
WT	7.5 ± 1.2
R256S	30.0 ± 12.3
S257L	n.m.
S259F	n.m.
T260R	n.m.
T260I	42.0 ± 14.6
P261S	n.m.
P261L	n.m.
P261A	56.7 ± 14.3
V263A	6.5 ± 0.3

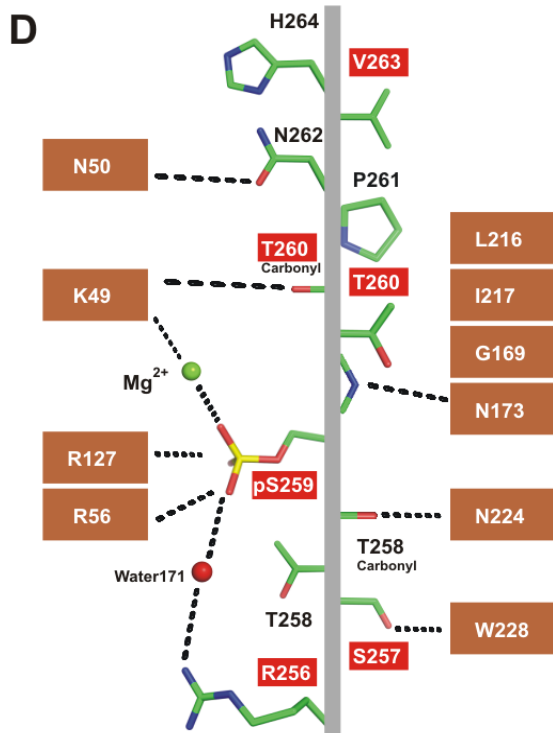
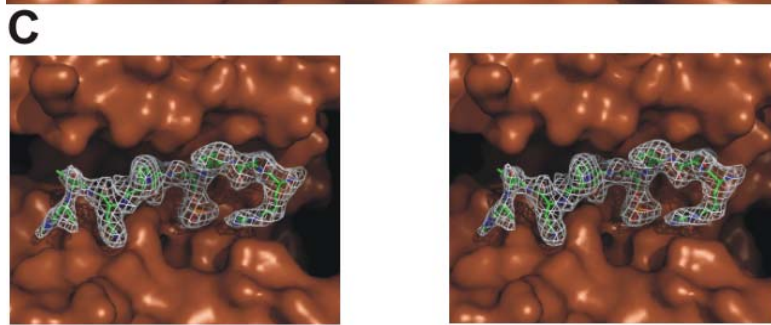
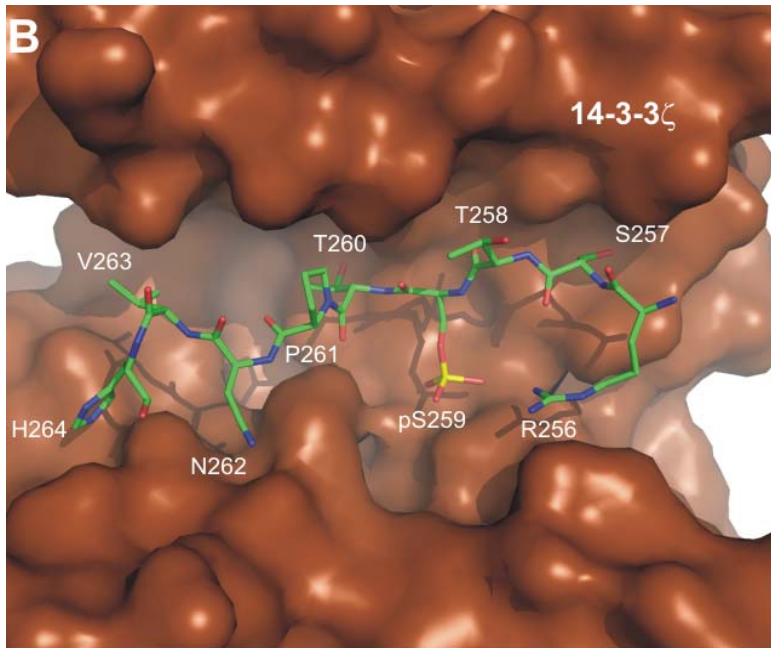


Figure 3

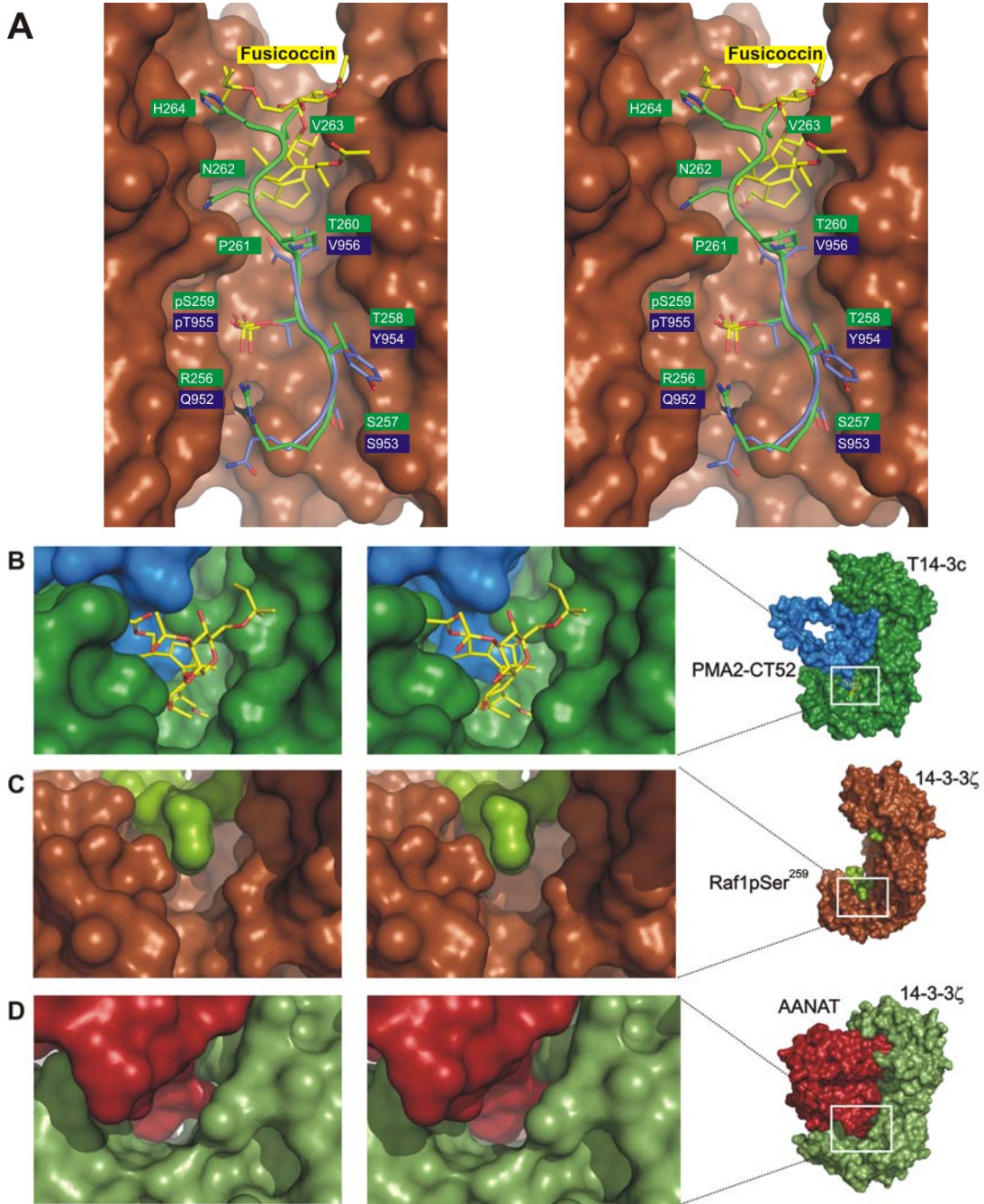


Figure 4

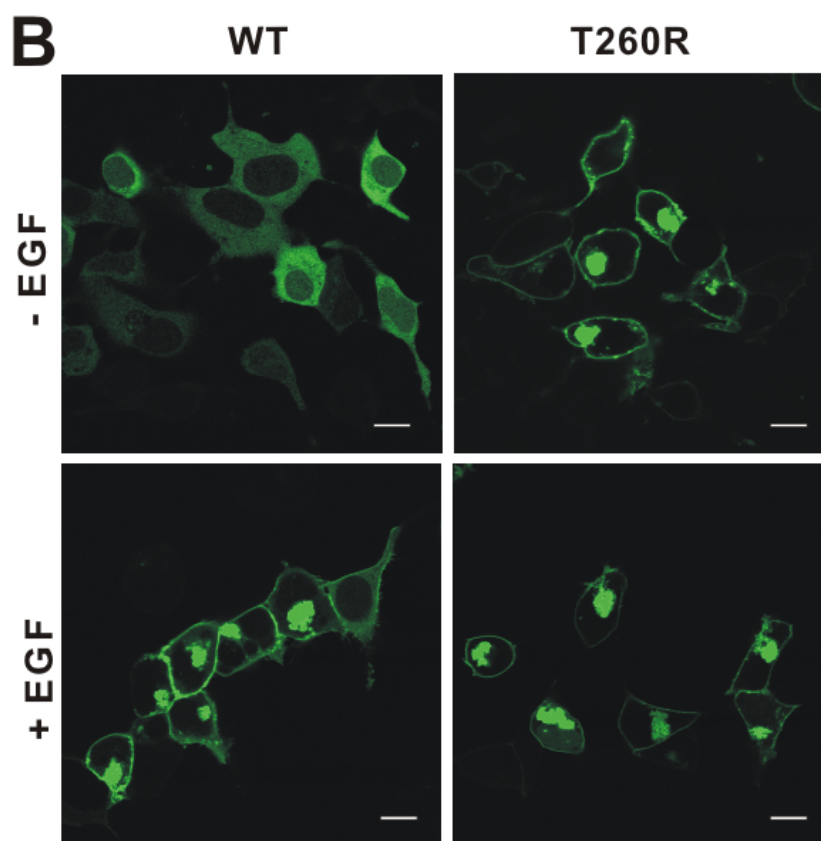
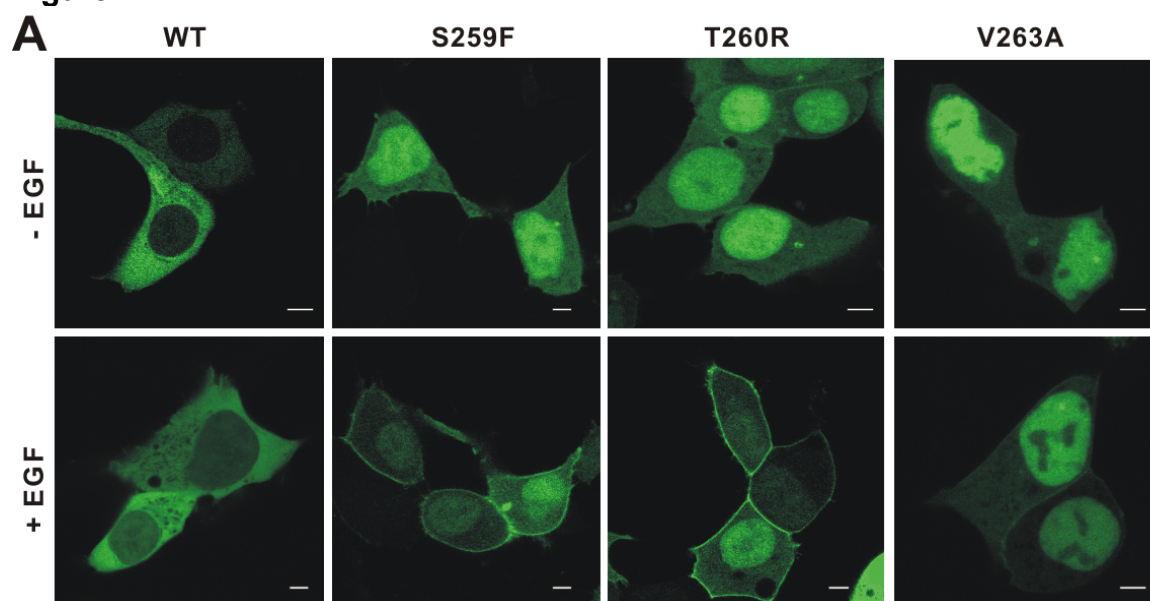


Figure 5

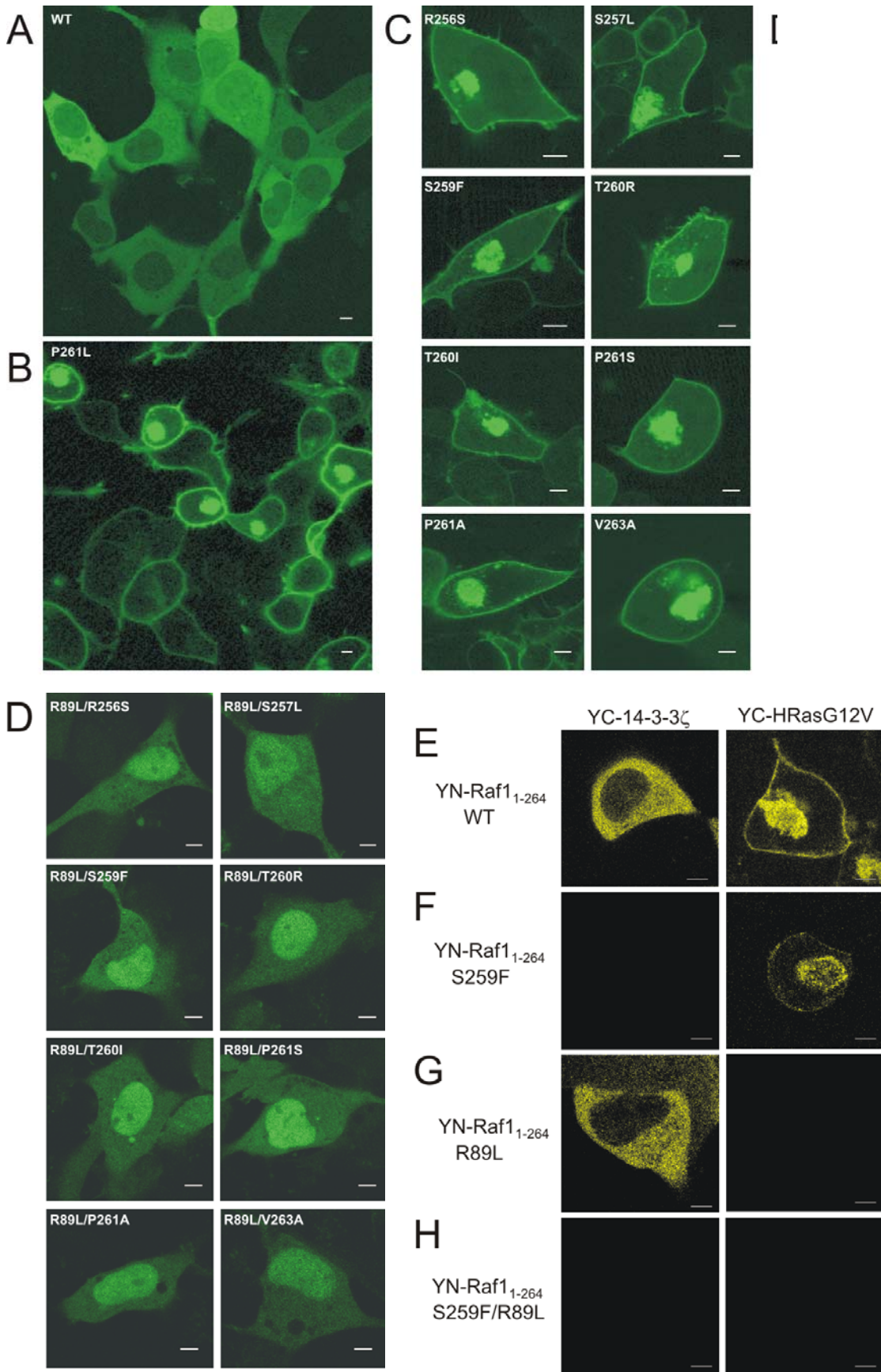
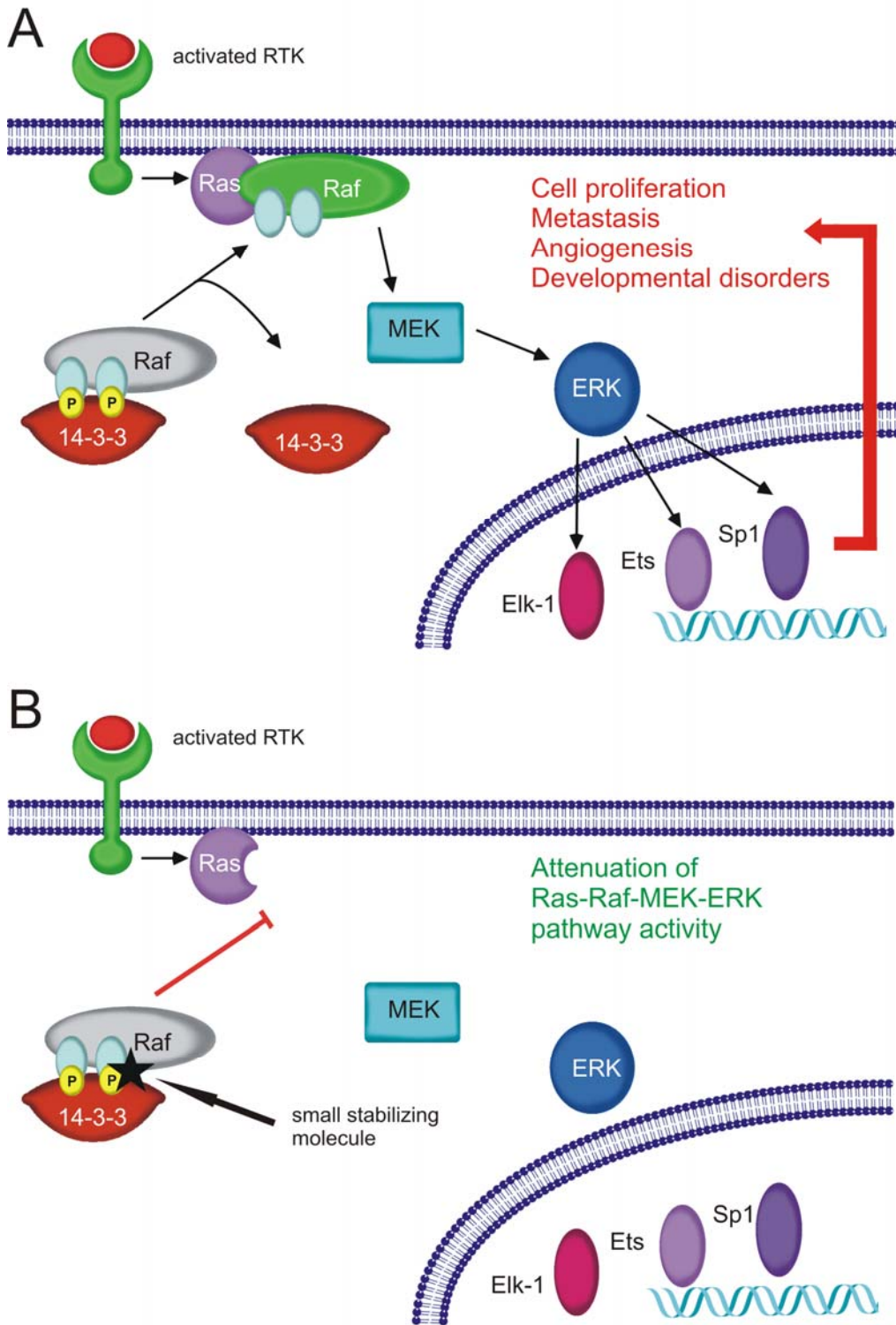


Figure 6



VII. Literatur

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

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

Aoki,Y., Niihori,T., Kawame,H., Kurosawa,K., Ohashi,G., Tanaka,Y., Filocamo,M., Kato,K., Suzuki,Y., Kure,S., Matsubara,Y. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37, 1038–40.

Bardiya,N., Alexander,W.G., Perdue,T.D., Barry,E.G., Metzenberg,R.L., Pukkila,P.J., Shiu,P.K. (2008). Characterization of interactions between and among components of the meiotic silencing by unpaired DNA machinery in *Neurospora crassa* using bimolecular fluorecence complementation. *Genetics.* 178, 593-596.

Berg,T., Cohen,S.B., Desharnais,J., Sonderegger,C., Maslyar,D.J., Goldberg,J., Boger,D.L., Vogt,P.K. (2002). Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3830-3835.

Block, C., Janknecht, R., Herrmann, C., Nassar, N., Wittinghofer, A. (1996). Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nat. Struct. Biol.* 3, 244-251.

Bos,J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.

Bourne,H.R., Sanders,D.A., McCormick,F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.

Bourne,H.R., Sanders,D.A., McCormick,F. (1991). The GTPase superfamily : conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.

Bracha-Drori,K., Shichrur,K., Katz,A., Oliva,M., Angelovici,R., Yalovsky,S., Ohad,N. (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant. J.* 40, 419-427.

Cabantous,S., Terwilliger,T.C., Waldo,G.S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 23, 102-107.

Campbell,S.L., Khosravi-Far,R., Rossman,K.L., Clark,G.J., Der,C.J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 17, 1395-1413.

Chien,U.H., Lai,M., Shih,T.Y., Verma,I.M., Scolnick,E.M., Roy-Burman,P., Davidson,N. (1979). Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the genomes of Kirsten and Harvey sarcoma-viruses, their respective parental murine leukemia viruses, and the rat endogenous 30S RNA. *J. Virol.* 31, 752-760.

Chiu,V.K., Bivona,T., Hach,A., Sajous,J.B., Silletti,J., Wiener,H., Johnson,R.L.^{2nd}, Cox,A.D., Philips,M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell. Biol.* 4, 343-350.

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

Choy,E., Chiu,V.K., Silletti,J., Feoktistov,M., Morimoto,T., Michaelson,D., Ivanov,I.E., Philips,M.R. (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell.* 98, 69-80.

Cody,C.W., Prasher,D.C., Westler,W.M., Prendergast,F.G., Ward,W.W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry.* 32, 1212-1218.

Cramer,A., Whitehorn,E.A., Tate,E., Stemmer,W.P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14, 315-319.

Davis,R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.

Day,R.N. (2005). Imaging protein behavior inside the living cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* 230, 1-6.

De Angelis,D.A., Miesenböck,G., Zemelman,B.V., Rothman,J.E. (1998). PRIM: proximity imaging of green fluorescent protein-tagged polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12312-12316.

Denhardt,D.T. (1996). Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* 318, 729-747.

De Vos,A.M. Tong,L., Milburn,M.V., Matias,P.M., Jancarik,J., Noguchi,S., Nishimura,S., Miura,K., Ohtsuka,E., Kim,S.H. (1988). Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* 239, 888-893.

Dougherty,M.K., Müller,J., Ritt,D.A., Zhou,M., Zhou,X.Z., Copeland,T.D., Conrads,T.P., Veenstra,T.D., Lu,K.P., Morrison,D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol. Cell.* 17, 215-224.

Downward,J. (2003). Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 11-22.

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

Emuss,V., Garnett,M., Mason,C., Marais,R. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer. Res.* 65, 9719-9726.

Förster,T. (1948). Zwischenmolekulare Energieumwandlung und Fluoreszenz. *Anna. Physik* 6, 55-75.

Graham,D.L., Lowe,P.N., Chalk,P.A. (2001). A method to measure the interaction of Rac/Cdc42 with their binding partners using fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Ana. Biochem.* 296, 208-17.

Graves,L.M., Bornfeldt,K.E., Krebs,E.G. (1997). Historical perspectives and new insights involving the MAP kinase cascades. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 31, 49-62.

Grinberg,A.V., Hu,C.D., Kerppola,T.K. (2004). Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 4294-4308.

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

Heidecker,G., Huleihel,M., Cleveland,J.L., Kolch,W., Beck,T.W., Lloyd,P., Pawson,T., Rapp,U.R. (1990). Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 2503-2512.

Heim,R., Prasher,D.C., Tsien,R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 12501-12504.

Heim,R., Cubitt,A.B., Tsien,R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* *373*, 663-664.

Hekman,M., Hamm,H., Villar,A.V., Bader,B., Kuhlmann,J., Nickel,J., Rapp,U.R. (2002). Associations of B-and C-Raf with cholesterol, phosphatidylserine, and lipid second messengers: preferential binding of Raf to artificial lipid rafts. *J. Biol. Chem.* *277*, 24090-24102.

Hu,C.D., Chinenov,Y., Kerppola,T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell.* *9*, 789-798.

Hu,C.D., Kerppola,T.K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* *21*, 539-545.

Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Takahashi,N., Araki,K., Kuwano,R., Takahashi,Y. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *85*, 7084-7088.

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

Kahms,M. (2004). Graduierte Analyse der Ras-vermittelten Signaltransduktion in Systemen unterschiedlicher Komplexität. Dissertation, Ruhr-Universität-Bochum.

Karnoub,A.E., Weinberg,R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 517-531.

Karpova,T.S., Baumann,C.T., He,L., Wu,X., Grammer,A., Lipskiy,P., Hager,G.L., McNally,J.G. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J. Microsc.* 209, 56-70.

Kenny,C.H., Ding,W., Kelleher,K., Benhard,S., Dushin,E.G., Sutherland,A.G., Mosyak,L., Kriz,R., Ellestad,G. (2003). Development of a fluorescence polarization assay to screen for inhibitors of the FtsZ/ZipA interaction. *Anal. Biochem.* 323, 224-233.

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

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

Lenzen,C., Cool,R.H., Prinz,H., Kuhlmann,J., Wittinghofer,A. (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* 37, 7420-7430.

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

Lippincott-Schwartz,J., Patterson,G.H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300, 87-91.

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

Mackay,D.J., Hall,A. (1998). Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 20685-20688.

Magliery,T.J., Wilson,C.G., Pan,W., Mishler,D., Ghosh,I., Hamilton,A.D., Regan,L. (2005). *J. Am. Chem. Soc.* 127, 146-157.

Marais,R., Light,Y., Paterson,H.F., Marshall,C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 14, 3136-3145.

Martin,G.A., Viskochil,D., Bollaq,G., McCabe,P.C., Crosier,W.J., Haubruck,H., Conroy,L., Clark,R., O'Connell,P., Cawthon,R.M., Innis,M.A., McCormick,F. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with *ras* p21. *Cell* 63, 843-849.

Mason,C.S., Springer,C.J., Cooper,R.G., Superti-Furga,G., Marshall,C.J., Marais,R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 18, 2137-48.

McPherson,R.A., Harding,A., Roy,S., Lane,A., Hancock,J.F. (1999). Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene.* 18, 3862-3869.

Medema,R.H., Bos,J.L. (1993). The role of p21Ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit. Rev. Oncog.* 4, 615-661.

Meighen,E.A., Bartlet,I. (1980). Complementation of subunits from different bacterial luciferases. Evidence for the role of the beta subunit in the bioluminescent mechanism. *J. Biol. Chem.* 255, 11181-11187.

Misteli,T., Spector,D.L. (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 15, 961-964.

Miyawaki,A., Griesbeck,O., Heim,R., Tsien,R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2135-2140.

Miyawaki,A. (2003). Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 591-596.

Mochizuki,N., Yamashita,S., Kurokawa,K., Ohba,Y., Nagai,T., Miyawaki,A., Matsuda,M. (2001). *Nature* 411, 1065-1068.

Moore,M.S. (1998). Ran and nuclear transport. *J. Biol.Chem.* 273, 22857-22860.

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

Morrison, D.K., Cutler, R.E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 174-179.

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

Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., Wittinghofer, A. (1995). The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* 375, 554-560.

Nealson, K.H., Markovitz, A. (1970) Mutant analysis and enzyme subunit complementation in bacterial bioluminescence in *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* 104, 300-12.

Oecking, C., Piotrowski, M., Hagemeyer, J., Hagemann, K. (1997). Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *Plant J.* 12, 441-453.

Olenych, S.G., Claxton, N.S., Ottenberg, G.K., Davidson, M.W. (2007). The fluorescent protein color palette. *Curr. Protoc. Cell. Biol.* Chapter 21, Unit 21.5.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.

Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J.L., Diaz, M.H., Palmer, R.H., Francis, M.S., Hauser, A.R., Wittinghofer, A., Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J.* 26, 902-913.

Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341, 209-214.

Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., Piston, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 73, 2782-2790.

Pédélecq,J.D., Cabantous,S., Tran,T., Terwilliger,T.C., Waldo,G.S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88.

Periasamy,A. (2001). Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J. Biomed. Opt.* 6, 287-291.

Prasher,D.C., Eckenrode,V.K., Ward,W.W., Prendergast,F.G., Cormier,M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111, 229-233.

Prasher,D.C. (1995) Using GFP to see the light. *Trends. Genet.* 11, 320-323.

Prescott,M., Battad,J.M., Wilmann,P.G., Rossjohn,J., Devenish,R.J. (2006). Recent advances in all-protein chromophore technology. *Biotechnol. Annu. Rev.* 12, 31-66.

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

Rapp,U.R., Heidecker,G., Huleihel,M., Cleveland,J.L., Choi,W.C., Pawson,T., Ihle,J.N., Anderson,W.B. (1988). Raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 53, 173-84.

Schimmöller,F., Itin,C., Pfeffer,S. (1997). Vesicle traffic: get your coat! *Curr. Biol.* 7, 235-237.

Schimmöller,F., Simon,I., Pfeffer,S.R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164

Shaner,N.C., Steinbach,P.A., Tsien,R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* 2, 905-909.

Shaulian,E., Karin,M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 20, 2390-2400.

Shimomura,O., Johnson,F.H., Saiga,Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-239.

Schubbert,S., Zenker,M., Rowe,S.L., Böll,S., Klein,C., Bollaq,G., van der Burgt,I., Musante,L., Kalscheuer,V., Wehner,L.E., Nquyen,H., West,B., Zhang,K.Y., Siermans,E., Rauch,A., Niemeyer,C.M., Shannon,K., Kratz,C.P. (2006). Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 38, 331-336.

Schubbert,S., Shannon,K., Bollag,G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 295-308.

Seeger,R., Krebs,E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB. J.* 9, 726-735.

Shih,T.Y., Weeks,M.O., Young,H.A., Scholnick,E.M. (1979). Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology* 96, 64-79.

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

Tsien,R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.

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

Ullmann,A., Jacob,F., Monod,J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24, 339-343.

Van Biesen,T., Luttrell,L.M., Hawes,B.E., Lefkowitz,R.J. (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 17, 698-714.

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

Wachter,R.M., Elsliger,M.A., Kallio,K., Hanson,G.T., Remington,S.J. (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure.* 6, 1267-1277.

Waldo,G.S., Standish,B.M., Berendzen,J., Terwilliger,T.C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 17, 691-695.

Wellbrock,C., Karasarides,M., Marais,R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 875-885.

Wells,J.A., McClendon,C.L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* 450, 1001-1009.

Wennerberg,K., Rossman,K.L., Der,C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* 118, 843-846.

Würtele,M., Jelich-Ottmann,C., Wittinghofer,A., Oecking,C. (2003). Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J.* 22, 987-994.

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

Yang,F., Moss,L.G., Phillips,G.N. Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246-1251.

Yao,B., Zhang,Y., Delikat,S., Mathias,S., Basu,S., Kolesnick,R. (1995). Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 378, 307-10.

Yip,K.S., Stillman,T.J., Britton,K.L., Artymiuk,P.J., Baker,P.J., Sedelnikova,S.E., Engel,P.C. Pasquo,A., Chiaraluce,R., Consalvi,V., Scandurra,R., Rice,D.W. (1995). The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure.* 3, 1147-1158.

Yip-Schneider,M.T., Miao,W., Lin,A., Barnard,D.S., Tzivion,G., Marshall,M.S. (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem. J.* 351, 151-159.

Zaccolo,M. (2004). Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circ. Res.* 94, 866-873.

Zacharias,D.A., Violin,J.D., Newton,A.C., Tsien,R.J. (2002). Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* 296, 913-916.

Zhang,J., Campbell,R.E., Ting,A.Y., Tsien,R.Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* 3, 906-918.

Zimmer,M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102, 759-781.

Zimmermann,S., Moelling,K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286, 1741-1744.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström, Längeneinheit 1 Å = 100 pm
<i>A. victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i> , Quallenart aus dem pazifischen Ozean
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
COS 7	Zelllinie aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CR	konservierte Region (<i>conserved region</i>)
CRD	Cystein-reiche Domäne
CT52	C-Terminus der Pflanzen Plasmamembran H ⁺ -ATPase (PMA2)
ATPase	Adenosintriphosphatasen
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , gramnegatives Bakterium
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosinnukleotidaustauschfaktoren
(e)GFP	(<i>enhanced</i>) Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK 293	Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen
HTS	Hochdurchsatz Rasterverfahren (<i>high throughput screening</i>)
kDa	Kilodalton, Masseneinheit für Proteine
M	<i>molar</i> , Stoffmengenkonzentration Mol pro Liter
MAPK	Mitogen-aktivierende Protein Kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
NF-1	Neurofibromin-1
N-Terminus	Amino-Terminus
RBD	Ras Bindedomäne
RNA	Ribonukleinsäure
WT	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Corinna Ottmann, geb. Schroth
Anschrift: Siedlung Salingen 47, 44227 Dortmund
Geburtsdatum: 19. Dezember 1980
Geburtsort: Essen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Kinder: Till Ottmann, *14. Januar 2008

Schulbildung:

1987 – 1991 Meisenburgschule, Essen
1991 – 2000 Grashof Gymnasium, Essen
2000 Abschluß: Abitur

Hochschulbildung:

2000 – 2005 Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
2004 – 2005 Anfertigung der Diplomarbeit: „Molekulare Fluoreszenzkomplementation als Auslesesystem für Interaktionsanalysen in der Ras-vermittelten Signaltransduktion“
2005 Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Abteilung Strukturelle Biologie
AG Biophysikalische Analytik
Abschluß: Diplom

Beruflicher Werdegang:

2005 – 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Anfertigung der Dissertation: „Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in der Ras-vermittelten Signaltransduktion mittels bimolekularer Fluoreszenz Komplementation“
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund
Abteilung Strukturelle Biologie

Dortmund, Oktober 2008

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Es handelt sich bei der heute von mir eingereichten Dissertation um fünf in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Bochum, den 08.10.2008

(Dipl. Biol. Corinna Ottmann)