



Technische Universität München

Institut für Organische Chemie und Biochemie

Angefertigt am
Max-Planck Institut für Biochemie, Abteilung für Molekulare Biologie

Proteomische Analyse der Imatinib-vermittelten Proteinregulation in Leukämiezellen

Susanne Bettina Breilkopf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Groll
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Henrik Daub
2. Univ.-Prof. Dr. Stephan Sieber

Dissertation wurde am 29.06.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Chemie am 03.12.2010 angenommen.

Danke für eure Unterstützung ...!

Everything you do bears a will and a why and a wherefore (F.M.).

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 2007 bis zum Juni 2010 am Max-Planck Institut für Biochemie unter der Leitung von PD Dr. Henrik Daub angefertigt. Die praktischen Arbeiten zur Untersuchung der Kinase-angereicherten Lysate aus den K562-Zellen wurden zusammen mit Felix Oppermann durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Die Funktionen der Proteinkinasen	8
1.2. Die Protein-Tyrosinkinasen (PTK)	10
1.2.1. Die Rezeptor-Tyrosinkinase)	12
1.2.2. Nichtrezeptor-Tyrosinkinase	13
1.3. Signalwege mit Proteintyrosinkinasen	14
1.3.1. Second Messenger	15
1.3.2. G-Protein-vermittelte Signalwege	16
1.3.2.1. PI3K-Signalweg	17
1.3.2.2. EGFR Aktivierung	17
1.3.3. JAK / STAT-Signalweg	18
1.4. Onkogener Kinasesignalweg	18
1.5. Entstehung von Leukämie	20
1.5.1. Chronische myeloische Leukämie	21
1.5.2. Chronische myeloische Leukämie mit BCR-ABL	22
1.5.3. Chronische myeloische (eosinophile) Leukämie mit FIP1L1-PDGFR α	24
1.6. Imatinib (Glivec/Gleevec)	25
1.7. Massenspektrometrie	27
1.7.1. MS für Proteomanalyse	28
1.7.2. Quantitative Proteomanalyse	30
1.7.3. Phosphoproteomanalyse	33
1.7.4. Anwendungen	34
2. Aufgabenstellung	36
3. Material und Methoden	37
3.1. Materialien	37
3.1.1. Chemikalien	37
3.1.2. Chemikalien für SILAC und MS-Analyse	37
3.1.3. Weitere Materialien	38
3.2. Zellkulturmedium	39
3.3. Stocklösungen	39
3.4. Zellen	40
3.5. Antikörper	41
3.5.1. Primäre Antikörper	41

3.5.2. Sekundäre Antikörper	41
3.6. Zellkultur	41
3.7. Analytische Methoden mit Proteinen	42
3.7.1. Bestimmung der Proteinkonzentration in einem kompletten Zellysat	42
3.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.7.3. Überführen von Proteine auf die Nitrozellulosemembran	42
3.7.4. Proteinnachweis im Immunoblot	43
3.8. SILAC-Markierung, Lyse der Zellen und anti-pTyr Immunopräzipitation	43
3.8.1. SILAC Medium in der Zellkultur	43
3.8.2. Zellyse mit Triton X-100	44
3.8.3. Zellyse mit NP-40 und anti-pTyr Immunopräzipitation	44
3.8.4. Zellyse mit 8 M Urea	45
3.9. Quantitative Vergleichsanalyse zur Bestimmung des Imatinib-Einflusses auf das Proteom	45
3.9.1. Identifizierung von direkten Zielproteinen und Phosphoylierungsstellen mit einer Sensitivität für Imatinib mit dem Focus auf Kinasen	45
3.9.2. Identifizierung von direkten Zielproteinen und Phosphorylierungsstellen mit einer Sensitivität für Imatinib mit Analyse des kompletten zellulären Lysats	46
3.10. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	47
3.10.1. In-Lösungsverdau der Proteine	47
3.10.2. In-Gel Verdau der Proteine	47
3.10.3. Entsalzung der Proben	48
3.10.4. Phosphopeptidenanreicherung durch Titaniumdioxid-Microspheres	48
3.10.5. Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) zur Phosphopeptidanreicherung	49
3.10.6. Auftrennung der Phosphopeptide mit der Strong Cation Exchange (SCX) Chromatographie (Resource S column)	49
3.10.7. Auftrennung der Phosphopeptide mit der Strong Cation Exchange Chromatographie (polySULFOETHYL A column)	50
3.10.8. Probenvorbereitung zur Identifizierung von Kinasen mit einer Sensitivität für Imatinib	50
3.10.9. Probenvorbereitung zur Identifizierung von Imatinib-sensitiven Proteinen	50
3.11. MS-Analyse und Datenprozessierung	51
3.11.1. MS-Analyse mit der LTQ-Orbitrap	51
3.11.2. Peptididentifikation und Quantifikation mit MaxQuant	51
3.11.3. Gene Ontology Analyse	52

3.12.	Transfektionsanalyse mit K562-Zellen	52
3.13.	Assay zum Test auf Apoptose	52
3.14.	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (sq RT-PCR)	53
3.14.1.	Isolierung von RNA	53
3.14.2.	Konzentrationsbestimmung von RNA	53
3.14.3.	cDNA-Synthese	53
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Identifizierung von direkten und indirekten zellulären Imatinib-Bindungspartnern	56
4.1.1.	Konzentrationsbestimmung für die Imatinibbehandlung in der Leukämiezelllinie K562	57
4.1.2.	Kinaseanreicherung im Batchverfahren (K562 Zelllinie)	58
4.1.2.1.	Quantitative Analyse des K562 Datensatzes mit Kinaseinhibitoranreicherung	60
4.1.2.2.	Identifizierung der Bindungspartner von Imatinib	62
4.1.2.3.	Identifizierung von Imatinib-regulierten Kinasen in der nachgeschalteten Signaltransduktion	63
4.1.3.	Transfektion zur Ausschaltung potentieller neuer Zielproteine	67
4.1.4.	Konzentrationsbestimmung für die Imatinibbehandlung von EOL-1-Zellen	70
4.1.5.	Kinaseanreicherung im Batchverfahren (EOL-1-Zelllinie)	71
4.1.5.1.	Quantitative Analyse von EOL-1 Proteinen nach Kinaseinhibitoranreicherung	72
4.1.5.2.	Identifizierung der Bindungspartner von Imatinib	72
4.1.5.3.	Identifizierung von regulierten Kinasen in Imatinib-behandelten EOL-1 Zellen	73
4.2.	Gesamtzelluläre Proteom- und Phosphoproteomanalyse in Imatinib-behandelten EOL-1 Zellen	75
4.2.1.	Imatinib und seine gesamtzellulären Auswirkungen in K562-Zellen	77
4.2.2.	Imatinib und seine gesamtzellulären Auswirkungen in EOL-1 Zellen	78
4.2.3.	Quantitative Phosphoproteomanalyse Imatinib-behandelter Zellen	82
5.	Diskussion	92
5.1.	Kinaseanreicherung	93
5.1.1.	Direkte Inhibierung auf Proteinebene	94
5.1.2.	Imatinib-sensitive Phosphorylierungsstellen	95
5.2.	Analyse des kompletten Datensatzes	99
5.2.1.	Hemmung zellulärer Proteinexpression	99
5.2.2.	Auswirkung von Imatinib auf gesamtzelluläre Phosphorylierung	102

5.2.3. Vergleich der Ergebnisse aus EOL-1 mit K562 Zellen	106
6. Zusammenfassung	109
7. Literaturverzeichnis	110
8. Anhang	123
9. Danksagung	126

1. Einleitung

1.1. Die Funktionen der Proteinkinasen

Zellen sind einer Vielzahl von äußeren Einflüssen ausgesetzt. Somit ist es nötig, dass die Zellen eines Organismus untereinander kommunizieren und Signale von den Nachbarzellen verarbeiten können. Diese Kommunikationsfähigkeit ermöglicht erst die Ausbildung von Zellen mit spezialisierten Fähigkeiten, die sich zu Geweben zusammenschließen und somit Organe ausbilden. Die Kommunikationsfähigkeit von Zellen und den aus ihnen gebildeten Geweben wird durch die Interaktion von Proteinen erreicht. Einige davon, die Transmembranproteine, ragen sowohl aus der Zelloberfläche als auch in den zytoplasmatischen Raum der Zelle. Dadurch sind sie in der Lage die Signale von außen in das Innere einer Zelle weiterzuleiten oder interne Signale aus der Zelle auf die Nachbarzelle weiterzuleiten. Für die Weiterleitung der Signale über die Transmembranproteine in das Innere der Zelle sind oftmals eine Vielzahl von Proteinen nötig. Proteinkinasen spielen in der Weiterleitung von Signalen in der Zelle eine große Rolle. Sie transportieren das Signal in den Zellkern wo es verarbeitet wird und z.B. die Veränderung der Genexpression reguliert.

Proteinkinasen, welche an verschiedensten Signalkaskaden beteiligt sind, modifizieren zur Signalweitergabe nachfolgende Proteine durch reversible Phosphorylierung. Insgesamt stehen für die Proteinregulation bis zu 200 verschiedene Modifikationen zur Verfügung, die alle posttranslational stattfinden (posttranslationale Modifikation, PTM). Dabei muss zwischen stabilen und transienten Modifikationen unterschieden werden. Unter den stabilen Modifikationen versteht man z.B. Glykosylierung, Biotinylierung, Lipoylierung und die Disulfidbrückenbildung. Sie sind Teil des Reifungsprozesses neu translatierter Proteine, unterstützen die Ausbildung der finalen Proteinstruktur und überführen die neu synthetisierten Proteine in ein funktionell aktives Stadium. Bei der Signalweitergabe sind jedoch die transienten Modifikationen von Bedeutung, da sie eine kurzfristige Regulation der Proteine ermöglichen. Zu dieser Gruppe der PTM gehören u.a. Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung, Methylierung und Sumoylierung. Diese Modulationen können an einem Protein an mehreren verschiedenen Stellen gleichzeitig vorliegen (1). Die wohl am meist verbreitete und am besten untersuchte transiente PTM ist die Phosphorylierung von Serin (Ser/S), Threonin (Thr/T) und Tyrosin (Tyr/Y) durch Proteinkinasen (PK). So sind mindestens 30% aller zellulären Proteine an mindestens einer Aminosäure phosphoryliert (2).

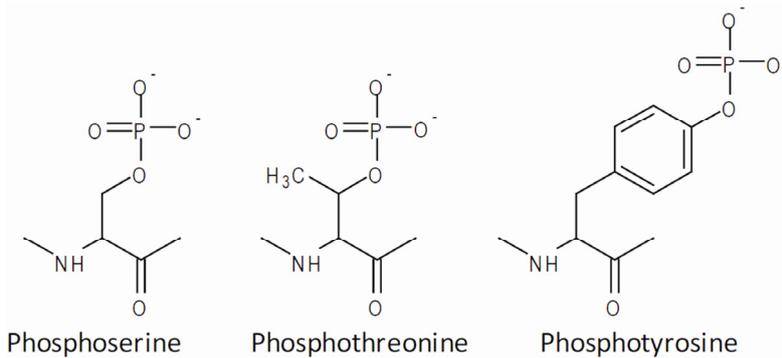


Abb. 1: Struktur der Aminosäuren Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin (3).

Zum ersten Mal wurde vor 50 Jahren die Phosphorylierung als reversibler Regulationsmechanismus der Glykogen-Phosphorylase aufgedeckt und in den 1970er Jahren folgte die Entdeckung der eukaryotischen Proteinkinase-Familie. Seit dem besteht ein großes Interesse darin, den Regulationsmechanismus der Phosphorylierung zu entschlüsseln und die komplette Familie der Proteinkinasen zu identifizieren. Durch die Sequenzierung des humanen Genoms konnten insgesamt 518 verschiedene Proteinkinasen identifiziert werden (4), die sich im humanem Genom in 21 PK-Familien untergliedern lassen (5). Zudem machen die PK 2% des codierenden Genoms aus und gehören damit zu einer der größten Genfamilien in den Eukaryonten (2). Die PK kann man in typische Kinasen, die durch alle Metazoen hinweg eine hoch konservierte katalytische Domäne besitzen, und atypische Kinasen, die keine Sequenzübereinstimmung mit den typischen Kinasen besitzen, gliedern (5).

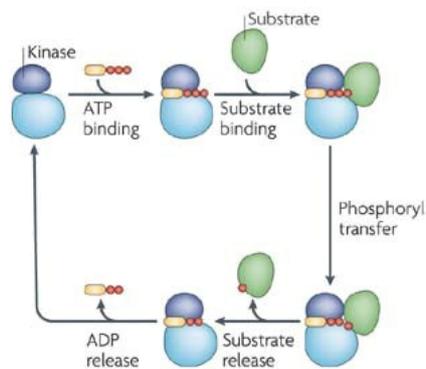


Abb. 2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise einer Kinase (5).

Bei einer klassischen Proteinkinase besteht die kanonische katalytische Kinasestruktur aus etwa 250 Aminosäuren. N-terminal findet man eine Domäne aus β -Faltblättern und C-terminal eine Domäne aus α -Helices. In dem Spalt, der sich zwischen den beiden Domänen ausbildet, bindet ATP mit dem Adenosin an die Nukleotidbindetasche der PK und das Triphosphat zeigt frei zugänglich nach außen. Das Proteinsubstrat kann daraufhin an den Spalt binden und konservierte Aminosäuren der katalytischen Domäne katalysieren die Übertragung des

terminalen Phosphats (γ -Phosphat) vom ATP auf die Hydroxylgruppe eines Ser, Thr oder Tyr (2). Durch diese PTM kann die Funktion des Proteins reguliert werden, indem die Phosphorylierung direkt eine Konformationsänderung des Proteins auslöst. Für eine solche Regulierung (6) muss oftmals die Phosphorylierung im Aktivierungssegment der Kinase auftreten. Das Aktivierungssegment besteht aus 20-40 oftmals positiv geladenen Aminosäuren (AS) innerhalb der großen C-terminalen Domäne, die aus einer Magnesiumbindungsstelle, einem kurzen β -Strang, der Aktivierungsschleife und der P+1-Schleife besteht (7). Das Aktivierungssegment kann diverse Konformationen einnehmen. So kann die Phosphorylierung die PK aktivieren, indem das Aktivierungssegment durch eine geschlossene Konformation stabilisiert wird (8) und die aktive Form erhalten bleibt (7).

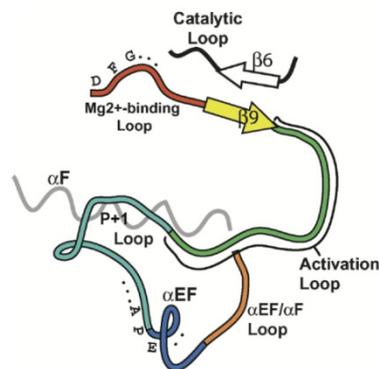


Abb. 3: Schematische Abbildung wichtiger Schleifenelemente in der N-terminalen Domäne einer Kinase (7).

Dabei gibt es neben eine Konformationsänderung, nicht nur die Aktivität des Proteins steigert, sondern auch verringern (6).

Im Allgemeinen kann man die Proteinkinasen in zwei Gruppen aufteilen. Die eine Gruppe beinhaltet 80% aller PK und besitzt eine Spezifität für Ser/Thr. Ihre Struktur des katalytischen Spalts ist weniger prominent ausgebildet, passend für die relativ kleine Seitengruppe von Ser und Thr (Abb. 1). Dahingegen findet man bei den restlichen 20% der PK eine Spezifität für Tyr-Phosphorylierung, mit einem stärker ausgeprägten katalytischen Spalt zwischen den Schleifen der PK. Da die Seitengruppe des Tyr raumgreifender ist, wird so eine gewisse Spezifität aufrecht erhalten (2).

1.2. Die Protein-Tyrosinkinasen (PTK)

Proteinphosphorylierung an Tyrosin-Resten gilt als wichtiger zellulärer Mechanismus zur Regulation verschiedener Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Transformation. Im Jahr 1979 wurde zum ersten Mal bei der Untersuchung von Tumorstoffen entdeckt, dass ein

Protein durch die Phosphorylierung an einem Tyr modifiziert wird (9). Ein Jahr später fand man heraus, dass das modifizierende Protein des *Rous sarcoma tumour virus*, v-SRC, eine Tyrosinphosphorylierungsaktivität besitzt (10). Das war der erste Hinweis, dass eine Fehlregulation in der Tyrosinphosphorylierung die Krebsentstehung fördert (11). Es folgten die Entdeckung und strukturelle Aufklärung anderer PTK, wie des epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), des Insulinrezeptors (INSR) und des *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR). Ausgelöst durch die Bindung ihre entsprechenden Liganden werden diese PTK aktiviert, daraufhin werden die Tyrosine der Rezeptoren und weitere intrazelluläre, an phosphorylierte Tyrosine des Rezeptors bindende Proteine phosphoryliert (11). Daraus schloss man, dass die PTK ein wichtiger Bestandteil der Signalvermittlung sind und zudem die intrazellulären Signalwege regulieren können (12).

Eine typische PTK hat in ihrer Kinasedomäne die bereits erwähnte bipolare Struktur mit einer N-terminalen Domäne, an der ATP und Magnesium binden, und einer C-terminalen Domäne, in der die Aktivierungsschleife zu finden ist. Dazwischen liegt die Bindungsstelle für die Polypeptidsubstrate. PTK fungieren dabei als Enzyme, die den Transfer des Phosphats vom ATP auf einen Tyrosinrest eines Polypeptides übertragen und somit intrazelluläre Signal initiieren (13).

Bei manchen inaktiven Kinasen wird die Inaktivierung aufrechterhalten, indem die Juxtamembranregion mit der Kinaseregion interagiert und durch diese Konformationsänderung das Enzym inhibiert. Durch die Bindung zum Liganden wird die PTK aktiviert, autophosphoryliert sich durch die Oligomerisierung selbst, wodurch Bindungsstellen für Signalproteine generiert werden. Diese Bindungsproteine binden an die PTK und aktivieren ihrerseits verschiedene Signalkaskaden (13). Werden Adaptorproteine an phosphorylierte PTKs rekrutiert, können diese über ihre SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin der PTK binden (oder auch PTB, z. B. in SHC) (6) und über weitere Domänen in ihrer Struktur akkumulieren sie weitere zytoplasmatische Effektoren zu den PTK (14). Diese Effektoren wiederum geben die Signale weiter und aktivieren somit weitere Signalkaskaden ins Innere der Zelle (6). Da PTKs an wichtigen Prozess in der Signalregulierung beteiligt sind, müssen sie demzufolge unter einer starken Kontrolle stehen. Aus dieser Erkenntnis heraus lässt sich die Tatsache erklären, dass nichtproliferierende Zellen einen geringen Anteil an tyrosylphosphorylierten Proteinen in der Zelle aufweisen (13).

Insgesamt umfasst das menschliche Genom ca. 90 Gene für PTK und 43 PTK ähnliche Gene (13). Diese Gruppe unterteilt sich, je nach der Lokalisation der PTK, in Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und Nichtrezeptor-Tyrosinkinase (NRTK). Dabei sind RTK transmembrane Proteine, die in der Membran verankert sind, eine extrazelluläre Domäne aufweisen und meist hydrophile Signalmoleküle als externe Liganden binden. Dagegen findet man NRTK ungebunden im Zytosol

und/oder im Zellkern vor und eine Aktivierung findet meist durch hydrophobe Signalmoleküle wie Stickstoff, NO und Liganden von nuklearen Rezeptoren, statt (6).

1.2.1 Die Rezeptor-Tyrosinkinase

Zu der Gruppe der RTK gehören etwa 58 PTK, wie z.B. *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (12). Strukturell kann man die Rezeptoren in einen extrazellulären Anteil, mit der Fähigkeit zur Ligandenbindung, in einen transmembranen Anteil, mit einer helikalen Struktur und einem zytoplasmatischen Anteil, mit

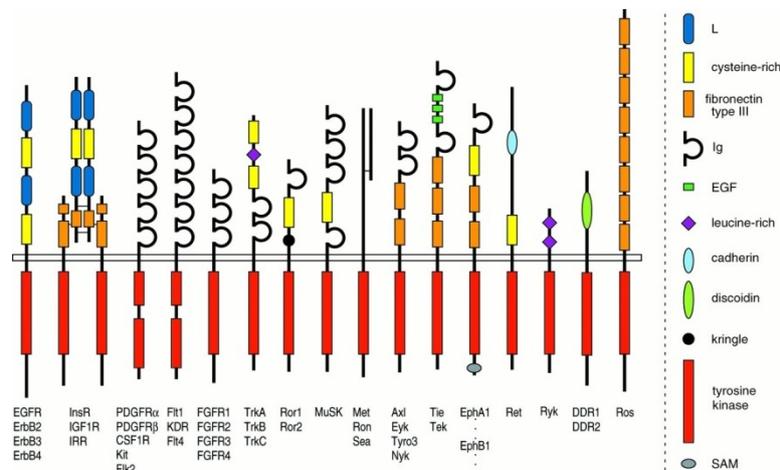


Abb. 5: Beispiele für Rezeptor-Tyrosinkinasen (15).

der Tyrosinkinaseaktivität und weiteren regulatorischen Domänen, unterteilen. Ungebunden liegt die RTK, die in der Regel nur aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht, meist als Monomer in der Membran vor. Bindet jedoch der Ligand an den Rezeptor, wird die RTK aktiviert, dimerisiert und meistens autophosphoryliert das Tyrosin wechselseitig in der Aktivierungsschleife sowie an zahlreichen weiteren Tyrosinresten außerhalb der Kinasedomäne (11, 15). Im Detail heißt das, dass die RTK nach der Bindung des Liganden durch den dimerischen Rezeptorpartner mindestens einmal phosphoryliert wird. Dabei befinden sich die Rezeptoren in der inaktiven *trans* Konformation. Die Phosphorylierung führt dazu, dass die RTK ihre Konformation zu *cis* ändert und nun zwischen der Aktivierungsschleife und dem Aktivierungssegment eine Bindungsmöglichkeit für das Substrat besteht (12). Die Kinase ist nun aktiviert und rekrutiert, durch die spezifische Bindung Signalproteine aus dem Zytoplasma an die Zellmembran (12).

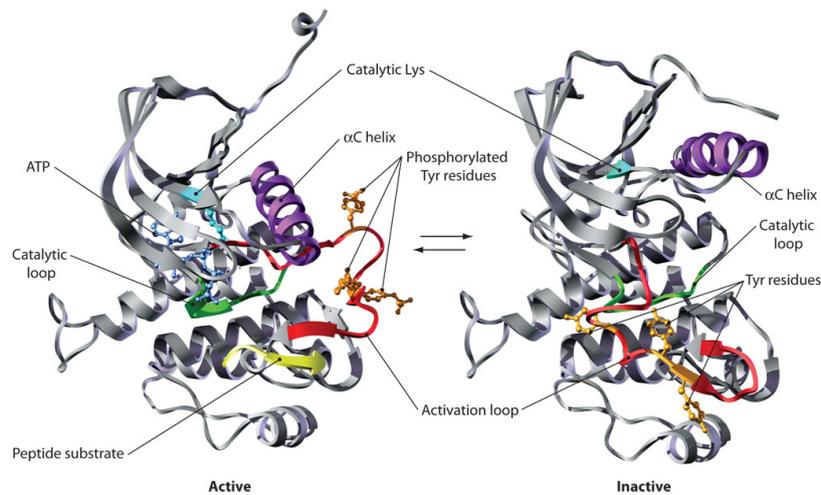


Abb. 6: Darstellung der cis und trans-Konformation einer Kinase (16)-

1.2.2. Nichtrezeptor-Tyrosinkinase

Die zweite Gruppe der PTK besteht aus 32 bekannten zytoplasmatischen / zytosolischen Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen (12), wie z.B. die Familie der Src-Kinasen, die Janus-Kinasen (JAKs) und ABL.

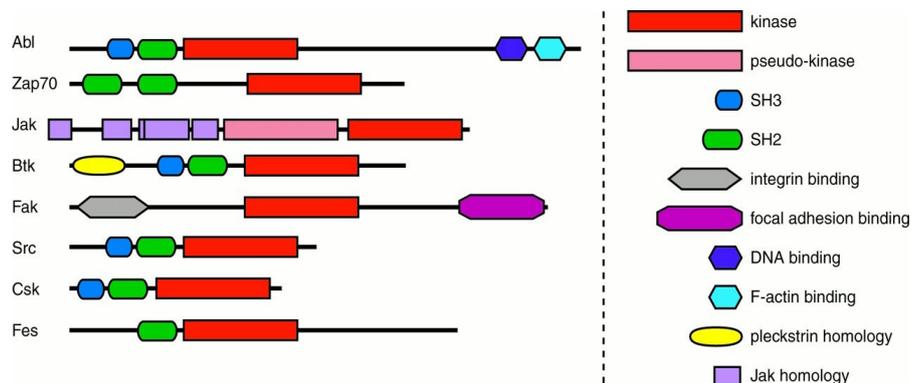


Abb. 7: Beispiele für Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen (15).

Anders als RTK können NRTK keine extrazellulären Signale empfangen, sondern befinden sich innerhalb solcher Signalkaskaden. Darum fehlt diesen Kinasen eine Domäne um Liganden zu binden und eine transmembrane Region. Die Struktur der NRTK trägt N-terminal oftmals eine Modifikation, in der Regel eine Myristylierung um an die Zellmembran zu binden. Neben der Kinasedomäne besitzen NRTK Domänen für die Interaktionen mit Proteinen, Lipiden und der DNA. Die meisten NRTK besitzen eine *Src homology 2* (SH2) und 3 (SH3) Domäne um an phosphoryliertem Tyrosin und an prolinreichen Sequenzen zu binden. Die NRTK ABL besitzt daneben noch ein Lokalisierungssignal für den Zellkern und eine F-Actin-Bindungsdomäne, weswegen diese Kinase sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu finden ist. Genauso wie bei den RTK wird die NRTK durch die Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife aktiviert

(15). Diese Aktivierung kann z.B. durch die Anlagerung an RTK oder durch *trans*-Phosphorylierung anderer zellulärer Kinasen erfolgen, wodurch die NRTK von ihren Inhibitoren dissoziiert und ihrerseits Substrate phosphorylieren kann. Inaktiviert werden die NRTK entweder durch Tyrosinphosphatasen oder durch die Bindung an ein Inhibitormolekül (13).

1.3. Signalwege mit Proteintyrosinkinasen

Generell gibt es verschiedene Gruppen an Signalwegen an denen PTK beteiligt sind (s. Abb. 8). Zum einen gibt es G-Protein abhängige Rezeptoren, die durch ein externes Signal aktiviert werden. Dadurch wird ein *second messenger* aktiviert (z.B. Ca^{2+} oder cAMP), der mit Hilfe von intrazelluläre Kinasen zur Expression bestimmter Gene führt.

Ein weitere Weg, um bestimmte Transkriptionsfaktoren für die Expression von Genen zu aktivieren, führt über ein extrazelluläres Signal, dass die Dimerisierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors auslöst woraufhin im Inneren der Zelle bestimmte Kinasen phosphoryliert werden.

Die letzte Gruppe wird durch Steroidhormone definiert, die durch die Zellmembran diffundieren und im Inneren der Zelle sich an einen entsprechenden Rezeptor binden. Dieser Komplex kann nun in den Kern diffundieren und dort die Expression bestimmter Gene auslösen.

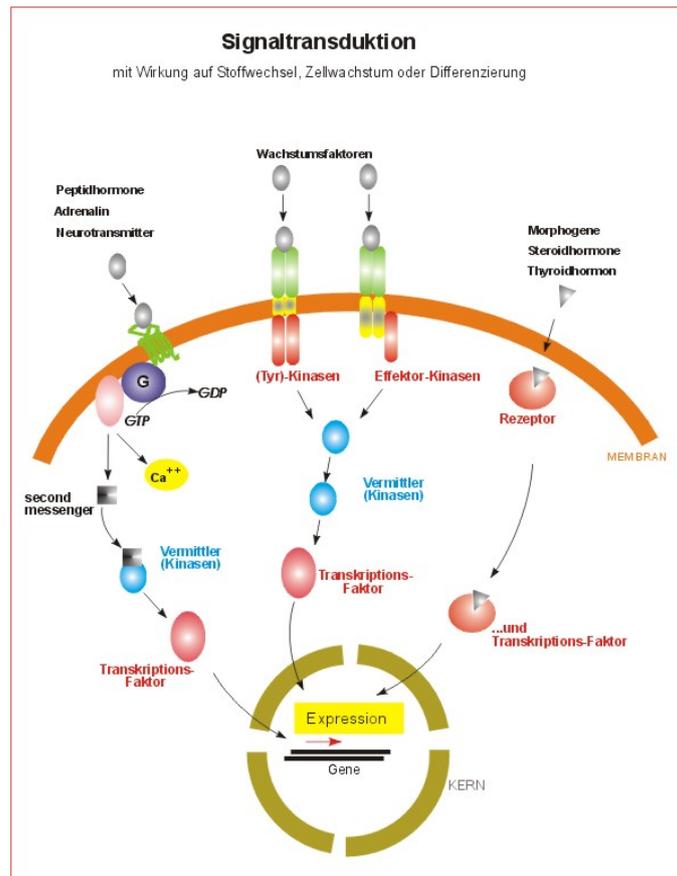


Abb. 8: Verschiedene Möglichkeiten der Signalübertragung durch Hormone und Wachstumsfaktoren. (http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/signale.htm)

1.3.1. Second Messenger

Ein wichtiger Bestandteil von Signalwegen sind *second messenger*. Sie dienen dazu Signale die von der Zelloberfläche kommend die Rezeptoren stimulieren an das Zytosol und /oder Zellkern weiterzuleiten. Zu diesen *second messengern* gehören drei Hauptklassen: Zum einen die zyklischen Nukleotide wie cAMP und cGMP, das Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) und die Kalziumionen (Ca²⁺) (17).

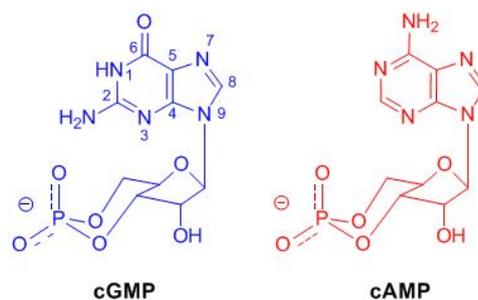


Abb. 9: Molekulare Struktur des cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). (<http://www.ohsu.edu/ohsuedu/academic/som/physpharm/images/Karpen-home-page-figure.jpg>)

Rezeptoraktivierung durch Hormone oder Neurotransmitter führen zu einer Aktivierung von G-Proteinen an der intrazellulären Oberfläche, die wiederum die Adenylylcyclase aktiviert. Die Adenylylcyclase katalysiert die Bildung von zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat. Daraus resultiert ein Anstieg an cAMP in der Zelle, was sich auf Effektorproteine wie Proteinkinase A (PKA) und Guaninnukleotid-Austauschfaktor Epac, stimulierend auswirkt (17). Bei der PKA bewirkt es eine Konformationsänderung in der regulatorischen Untereinheit, wodurch die katalytische Untereinheit des Tetramers freigesetzt wird und dadurch zahlreiche Proteine wie Genregulatorprotein CREB, phosphorylieren kann. Inaktiviert wird cAMP durch die Phosphodiesterase (PDE), die das cAMP-Level reduziert (17-18)

Für die Synthese des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) aus GTP wird das Enzym Guanylylcyclase benötigt. Das Enzym wird durch unterschiedliche Faktoren wie Peptidhormone und Neurotransmitter aktiviert. cGMP kommt vor allem im Gehirn vor und reguliert dort cGMP- oder cAMP-Phosphodiesterasen, Proteinkinase G, PKC und CaMKII. Über die PKG werden die NF- κ B und AP1 Transkriptionsfaktoren reguliert und beeinflussen dadurch die Genexpression und Zelldifferenzierung (19).

Die Gruppe der Inositoltrisphosphate (IP_3) und 1,2-Diacylglycerine (DAG) wird durch Peptid- und Protein hormone Transmitter, neurohormonale Faktoren und Hormone aktiviert. IP_3 und DAG entstehen durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) durch die Phospholipase C (PLC). IP_3 kommt entweder im Zytosol gelöst oder an IP_3 -Rezeptoren von Muskelzellmembran gebunden vor. Die Stimulierung mit IP_3 hat eine Ca^{2+} -Ausschüttung in das Zytosol aus intrazellulären Speichern zur Folge (20). Dagegen bleibt DAG in der Plasmamembran verankert, rekrutiert aber die Proteinkinase C an die Membran (21-22).

Die Kalziumionen (Ca^{2+}) regulieren viele intrazelluläre Signale, durch Konzentrationserhöhung des Ions im Zytosol werden eine Reihe von Proteinen wie Calmodulin (CaM) aktiviert. CaM ist ein Kalzium-bindendes, regulatorisches Protein, das nach Aktivierung selbst eine Reihe von Kinasen wie CaMKII und CaMKIV, die Adenylylcyclase, die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase und die Phosphatase-Calcineurin aktiviert (23).

1.3.2. G-Protein-vermittelte Signalwege

Guaninnukleotid bindende Proteine (G-Proteine) verknüpfen extrazelluläre Rezeptorproteine mit intrazellulären Effektorenzymen und Ionenkanälen (24). G-Proteine können in kleine G-Proteine wie RAS, RHO-, RAB-Familie und RAN und in heterotrimere G-Proteine unterteilt werden. Von den heterotrimeren G-Proteinen gibt es drei Untereinheiten (α , β und γ), dabei ermöglicht die Kombination der unterschiedlichen Untereinheiten Interaktionen mit vielen

verschiedenen Rezeptoren und Effektorproteinen. Generell binden heterotrimere G-Proteine an Rezeptoren mit 7 Transmembranhelices (25), die ihrerseits durch Signale wie Lichtphotonen, Geruchsstoffe, Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Durch die Bindung von GTP wird ein G-Proteine aktiviert, spaltet sich in das Rezeptor-gebundene G_{α} -GTP und das freie $G_{\beta\gamma}$ -Dimer und interagiert mit Effektorproteinen (25). Durch die interne GTPase des G-Proteins hydrolysiert das GTP zu GDP und inaktiviert das G-Protein. Dadurch löst sich das G_{α} -GDP vom Rezeptor und die Untereinheiten G_{α} und $G_{\beta\gamma}$ reassoziieren wieder, bis die Reaktion mit einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) die erneute GDP/GTP-Austauschreaktion bei den G-Proteinen ermöglicht (24). G-Proteine regulieren die Aktivität ihrer Substrate um dadurch Signalwege zu initiieren (25) und *second messenger* über die Regulierung von Adenylylcyclase, Phospholipase C und A zu beeinflussen (24).

Ein Beispiel für ein G-Proteine vermittelten Signalweg findet sich im RAF/RAS-Signalweg. Die inaktive Serin-/Threoninkinase RAF liegt in einem Multiprotein-Komplex mit dem Dimerprotein 14-3-3 im Zytosol vor. Durch die Aktivierung des aktiven G-Protein RAS-GTP an der Zellmembran, wird RAF aus dem Zytosol an die Zellmembran rekrutiert. Daraufhin wird die regulatorische Domäne an dem Serin dephosphoryliert und RAF wechselt zur aktiven Konformation. Dadurch können die Substrate wie MEK1, 2 und ERK im *activation loop* phosphoryliert werden und u.a. der MAP-Kinasesignalweg aktiviert werden. Dieser Signalweg ist an verschiedenen Aufgaben der Zelle beteiligt, wie der Zellproliferation und Zelldifferenzierung oder die Phosphorylierung von PK und andere Transkriptionsfaktoren (26-28).

1.3.2.1. PI3K-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Signalweg in dem *second messenger* involviert ist, findet man im Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Signalweg. Die PI3K ist eine intrazelluläre Lipidkinase, die aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Einheit besteht. Durch extrazelluläre Stimuli wird die katalytische Untereinheit der PI3K an die aktivierten Membranrezeptoren rekrutiert und bindet über die SH2-Domäne der p85-Domäne an die phosphorylierte RTK. Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe des Phosphatidylinositols und Phosphoinositids, wodurch PIP_3 aus PIP_2 entsteht. PIP_3 bindet an die Pleckstrinhomolog-Domäne (PH) von Proteinen wie AKT und Proteinkinase B (PKB) und vermittelt ihre Rekrutierung zur Membran. Dadurch wird AKT entweder durch 3-phosphoinositide-dependent kinase (PDK1) oder anderen Kinasen phosphoryliert und aktiviert. AKT wiederum aktiviert u.a. den Transkriptionsfaktor wie FOXO, wodurch Proliferation und Wachstum der Zelle gesteigert wird, aber Apoptose auch in Krebszellen gehemmt wird. Die

Inaktivierung von PIP_3 zu PIP_2 erfolgt durch die Hydrolyse durch PTEN (29). PIP_2 seinerseits kann durch die Phospholipase C in IP_3 und DAG gespalten werden, wodurch IP_3 einen Kalziumausstoß aus intrazellulären Speichern auslöst und DAG die Proteinkinase C aktiviert (22).

1.3.2.2. EGFR Aktivierung

Ein zweiter wichtiger Signalweg der *second messenger* integriert ist der EGFR (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)-Signalweg. Die RTK wird durch die extrazellulären Ligandenbindung wie HER2, EGF und *transforming growth factor* (TGF)- α aktiviert und löst damit eine Dimerbildung aus, indem die Tyrosinreste wechselseitig phosphoryliert werden. Dies löst eine Strukturveränderung in den *loop*-Segmenten hin zur aktiven Konformation aus. Dadurch bilden sich Bindungsstellen für Signalkomplexe aus zytoplasmatischen Enzymen und Adaptorproteinen aus (30). Ein Adaptorprotein, wie GRB2, bindet an das phosphorylierte EGFR über die SH2-Domäne und an die SH3-Domäne bindet über spezifische prolinreiche Sequenzen der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) SOS und wird so an die Plasmamembran rekrutiert. SOS induziert die GDP/GTP-Austauschreaktion bei den G-Proteinen wie RAS.

1.3.3. JAK / STAT-Signalweg

Zu einer Signalkaskade ohne Einfluss von *second messengern* oder G-Proteinen gehört der *janus kinase / signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT)-Signalweg. Aktiviert wird dieser Signalweg entweder durch die Bindung von Liganden wie Erythropoetin und Wachstumshormone, wodurch sich der Rezeptor zu einem Homodimer formiert oder durch Liganden wie Interferone und Interleukine bei dem sich ein Rezeptorheterodimer ausbildet. Daraufhin assoziieren die zytoplasmatischen Domänen von zwei Rezeptoruntereinheiten mit JAK-Kinasen. Die JAK-Kinase besteht aus einer nicht-katalytischen regulatorischen Domäne und einer Domäne mit PTK-Aktivität. Durch die Assoziierung von JAK an den Rezeptor wird die Kinase aktiviert, zwei JAK-Kinasen kommen in räumliche Nähe und phosphorylieren sich gegenseitig. Dadurch wird die Rezeptormultimerisierung hervorgerufen und sowohl der Rezeptor als auch das Substrat STAT wird phosphoryliert. Daraufhin dimerisiert STAT bedingt durch die Bindung an die SH2-Domänen und wird abhängig von Importin α -5 und dem *RAN nuclear import* vom Zytoplasma in den Zellkern importiert. Im Zellkern bindet das STAT-Dimer an regulatorische Sequenzen, um die Transkription entweder zu aktivieren oder zu inhibieren. Somit wird der Einfluss auf Zellteilung, -differenzierung, -migration und Apoptose genommen, genauso wie die Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert werden um die Entwicklung und

Homöostasis der Zelle aufrecht zu erhalten. Durch die Phosphatase SHP-1 wird der Signalweg inhibiert (31).

1.4. Onkogener Kinasesignalweg

Normalerweise ist der Signalübertragungsweg der Proteinkinasen strikt kontrolliert und reguliert. Doch kann es durch genetische Veränderungen zu einer Fehlregulation der Kinaseaktivität kommen. Das kann dazu führen, dass das sensible Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zellwachstum einerseits und Apoptose andererseits gestört wird. Diese Störung des Gleichgewichts und damit die Entstehung eines onkogenen Zustands kann durch verschiedene mögliche Ursachen hervorgerufen werden (12).

Eine Fehlregulierung kann auf einer genomischen Umlagerung z.B. einer chromosomalen Translokation beruhen. Dabei müssen zwei Bedingungen erfüllt werden, damit ein onkogenes Fusionsprotein entsteht. Es muss eine PTK-Domäne ohne Regulationskontrolle mit einer Dimerisierungsdomäne fusioniert werden. Dadurch erhält die neugebildete Kinase die Fähigkeit konstitutiv aktiv zu bleiben ohne negativ regulierenden Mechanismen zu unterliegen. So kann z.B. das onkogene Fusionsprotein BCR-ABL durch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 entstehen (12-13).

Eine andere Ursache für eine Fehlregulation kann auf *Gain-of-function*-Mutationen oder kleinen Deletionen beruhen. Auch diese Veränderungen stehen mit Malignität in Verbindung, wenn sie z.B. die Autoregulation einer Kinase zerstören, wie es bereits beim EGF-Rezeptor beobachtet wurde (12-13). Wie bei einer Störung des PDGF-Signalweg gezeigt wurde, verursacht eine Genamplifikation, eine Überexpression der RTK oder einer seiner Liganden eine gesteigerte Aktivität der RTK, und kann somit Krebs auslösen (12-13). Eine weitere Möglichkeit für eine abnorme PTK-Aktivität kann auch auf eine Reduzierung der PTK-regulierenden Faktoren wie z.B. Phosphatasen oder Inhibitorproteinen zurückzuführen sein (13). Dabei können die Mutationen nicht nur die Aktivität einer Kinase erhöhen, sondern auch mehrere redundante Kinasesignalwege anschalten und somit eine Überexpression eines Gens erzeugen (32). Seit 1980 weiß man durch die Entdeckung des *Rous sarcoma tumor virus protein*, v-SRC, dass retrovirale Proto-Onkogene ebenso strukturelle Veränderungen im Genom hervorrufen und so die Krebsentstehung auslösen können (10, 12).

Da Onkoproteine als mutierte Formen der zellulären Proteine verstanden werden, wurde in früheren Studien die Genome von Tumorzellen und normalen, unmutierten Zellen verglichen und nach signifikanten Unterschieden gesucht. Viele RTK bzw. ihre Liganden wurden dadurch als Proto-Onkoproteine identifiziert (33). So entdeckte Rita Levi-Montalcini 1952 den

Wachstumsfaktor *nerve growth factor* (NGF) in Maustumorzellen, der in Hühnerembryonen neuronale Auswüchse hervorrief (34). In den 1960er Jahren folgte durch Cohen die Entdeckung des *epidermal growth factors* (EGF), welcher die Proliferation von Epithelzellen stimulierte (35). Aber es dauerte bis 1980 bis die Arbeitsgruppe um Hunter und Sefton durch die Entdeckung von v-SRC den ersten Beweis erbrachte, dass fehlregulierte Proteintyrosin-Phosphorylierungen zu Tumorentstehung führen können. Sie transformierten Hühnerzellen mit der PTK v-SRC und konnten anschließend einen deutlichen Anstieg an Tyrosin-Phosphorylierung nachweisen, die letztendlich zur malignen Transformierung der Zellen führte (10). Ein weiterer Meilenstein auf dem Weg der Therapieentwicklung war die Feststellung, dass Rezeptoren wie EGFR, INSR und PDGFR als RTK durch ihre Liganden aktiviert werden konnten, was die Phosphorylierung der Rezeptoren selbst und Phosphorylierungen weiterer zellulärer Proteine auslöste (11). Als dann durch Julien Downward eine hohe Übereinstimmung zwischen den EGFR-Peptiden und der Sequenz des *avian oncogene*, v-erbB, festgestellt wurde, wurde somit zum ersten Mal die Verbindung zwischen einem tierischem Onkogen und einem humanem Gen, das verantwortlich für das Zellwachstum war, hergestellt (36). Wichtige Erkenntnisse in der Aufklärung der Signalkaskade erhielt man ab den 1980er Jahren durch die Entdeckung des Adaptorproteins RAS. Dem folgte die Identifizierung weiterer zytosolischer Faktoren, wie die Familie der GTP-Austauschfaktoren (*guanine-nucleotide exchange factor*, GEF). Diese GEFs katalysieren den Austausch eines an ein Protein gebundenen GDP durch ein GTP, wodurch die G-Proteine in der Regel aktiviert werden. Somit konnte die Signalkaskade von den RTK über Aktivierung des G-Proteins RAS durch seinen GTP-Austauschfaktor *son of sevenless* (SOS) vervollständigt werden (11).

Heutzutage gehören zu der Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren 58 RTK und bei mehr als der Hälfte ist eine Assoziation zu Krankheiten bekannt, die durch eine Über- bzw. Unterexpression oder Mutationen ausgelöst wird (11). Seit dieser Erkenntnis versucht man die Mutationen und Fehlregulationen von Proteinkinasen, die in der Entstehung von Krankheiten beim Menschen eine wichtige Rolle spielen, für einen möglichen Therapieansatz zu nutzen. Es gibt eine Reihe von Therapieansätzen, die versuchen, spezifische Antagonisten für diese Kinasen zu entwickeln (4), wie z.B. der Einsatz von kleinen Molekülen, die die katalytische Aktivität der Kinase direkt inhibieren sollen. So wurde an *small-molecule tyrosine-kinase inhibitors* geforscht, die möglichst selektiv für onkogene PTK sind, was zur Entwicklung von Inhibitoren wie Imatinib, Dasatinib, Nilotinib und Gefitinib führte (11). Für RTK besteht zusätzlich die Möglichkeit die Kinasen über monoklonale Antikörper zu inhibieren, wie es mit Trastuzumab gegen die RTK HER2 erfolgreich gezeigt wurde. Der Vorteil an diesen Therapien ist, dass sie den Patienten deutlich geringer toxisch belasten, da sie zielgerichtet nur auf die Krebszellen wirken sollen. Der Nachteil dieser Therapien liegt aber darin, dass hier leicht Resistenzmechanismen gegen den Inhibitor

auftreten. Bereits Punktmutationen können ausreichen, um bei einer PTK eine Bindung ihres Inhibitors zu verhindern. Mittlerweile sind eine Reihe von Mutationen bei PTK bekannt, die zu einer Resistenz gegenüber niedermolekularen Inhibitoren führen (13).

1.5. Entstehung von Leukämie

Treten nun Mutationen auf, die z.B. mit der Zellzykluskontrolle interferieren, können sich immer mehr Mutationen im Genom anhäufen, ohne dass in der abnormen Zelle die Apoptose ausgelöst wird. Entwickelt sich daraus eine Krebszelle, kann diese sich selbst erneuern und proliferieren ohne dabei einer Regulation zu unterliegen. Dabei wachsen Krebszellen zuerst nur lokal begrenzt, ab einer gewissen Größe infiltrieren sie jedoch oftmals das umliegende Gewebe und zerstören es, um dann am Ende in weiter entfernte Organe zu metastasieren (37).

Bei der Entstehung von Leukämiezellen geht man davon aus, dass die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen gestört ist. Diese Zellen reagieren auf keine externen Stimuli mehr, sie sind immortalisiert, können sich selbst erneuern und wachsen im Knochenmark auf Kosten der gesunden Zellen in einer hohen Zahl, um sich dann über das periphere Blutsystem im ganzen Körper zu verteilen. Leukämiezellen gehen nicht mehr in Apoptose und können sich nicht mehr ausdifferenzieren, befinden sich daher in einem frühen Stadium der Vorläuferzellen. Meistens findet man in leukämischen Zellen eine charakteristische, karyotypische Abnormalität und spezifische Oberflächenantigene (37).

Bei der Leukämie unterscheidet man vier Gruppen, die akute myeloische Leukämie, die akute lymphatische Leukämie, die chronische myeloische Leukämie und die chronische lymphatische Leukämie (38). Die akute myeloische Leukämie (AML) weist eine hohe Zahl an myeloischen, undifferenzierten Zellen im Knochenmark auf, die letztendlich zum Versagen der Hämatopoese führt. Die Auftrittswahrscheinlichkeit nimmt mit dem Alter zu, der Behandlungserfolg nimmt dagegen mit dem Alter der Patienten ab. Im Ganzen ist die AML eine sehr heterogene Krankheit, in der bereits eine Reihe von zytogenetischen und molekularen Veränderungen, identifiziert wurden (39). Dazu gehören in 16-17% der Fälle eine Trisomie 8, aber auch chromosomale Veränderungen wie $t(15;17)(q22;q21)$, $t(8;21)(q22;q22)$ und $inv(16)(p13q22)$ (40). Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) bestehen die Zellen im Knochenmark zu mindestens 20-25% aus lymphatischen Vorläuferzellen. Zusätzlich können genetische Veränderungen nachgewiesen werden (41). Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die am weitesten verbreitete Leukämie in den westlichen Nationen. Der Definition nach diagnostiziert man CLL ab einem Lymphozyten-Wert von 5000 B-Lymphozyten pro einem Mikroliter Blut (42).

In den folgenden Kapiteln wird jedoch nur die chronische myeloische Leukämie genauer beschrieben.

1.5.1. Chronische myeloische Leukämie

Der Krankheitsverlauf der chronischen myeloischen Leukämie (CML) lässt sich in drei Phasen unterteilen. Am Anfang beginnt die CML mit einer chronischen Phase, die wenig aggressiv ist und in der die Tumorzellen langsam wachsen (43). Die Zellen haben noch die Fähigkeit sich zu differenzieren und sind funktionell normal. Meistens können die Patienten keine Krankheitssymptome feststellen. Unbehandelt kann diese Phase 2-3 Jahre andauern (44). Der Übergang zur zweiten Phase (*accelerated phase*) ist fließend und wird durch eine größere Zahl an unreifen Zellen definiert, gepaart mit einem Nachlassen des Therapieerfolges. In der letzten Phase dominieren die unreifen Zellen und die Überlebensrate beträgt nur noch Wochen bis Monate (44). Diese letzte Phase wird die akute Phase, auch Blastenkrise, genannt. Hier treten die voll transformierten Zellklone, die in einem frühen Entwicklungsstadium der myeloischen oder lymphatischen Differenzierung stehen geblieben sind, auf. Die meist verbreitete Ursache für die Entstehung der CML ist eine reziproke Translokation und das daraus resultierende sogenannte Philadelphia-Chromosom.

1.5.2. Chronische myeloische Leukämie mit BCR-ABL

Zum ersten Mal wurde 1960 von Nowell und Hungerford das Philadelphia (PH)-Chromosom beschrieben und 1973 erkannte Janet Rowley, dass dies das Produkt einer Translokation war (44). Durch die $t(9;22)(q34;q11)$ Translokation in Philadelphia-positiven myeloischen Leukämiezellen, entsteht das chimäre BCR-ABL Fusionsprotein. Die Bruchstelle verbindet die ABL-Sequenz strangaufwärts von Exon III des Chromosoms 9 mit der BCR-Sequenz strangabwärts von Exon III auf Chromosom 22 (43, 45). Dadurch entsteht ein Fusionsprotein mit einer Größe von 210 kDa mit 902-927 Aminosäuren des BCR-Proteins und mit Exon 2-11 von c-ABL, das in 95% aller CML-Patienten vorgefunden wird (46). Das BCR-Protein zeigt an seinem N-terminalen Ende Serin/Threonin-Kinaseaktivität und besitzt eine Domäne zur Dimerisierung. Das Wildtyp ABL-Protein scheint ein Tumorsuppressor zu sein, da es eine inhibitorische Rolle in der Zellzyklusregulation spielt (44). Außerdem interagiert es mit den Proteinen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) und Rad51 (RecA Homolog, E. Coli), die in der DNA-Reparatur involviert sind. Daraus schließt man, dass die Wildtyp ABL-Kinase wichtig für die Apoptoseinduzierung als Antwort auf genotoxischen Stress ist, im Fusionsprotein jedoch diese Funktion durch die Translokation verloren gegangen ist (44).

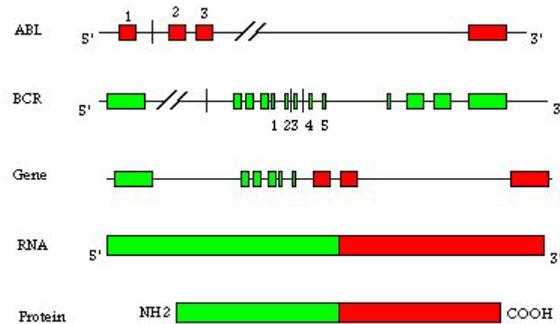


Abb. 8: Durch die reziproke Translokation wird die ABL-Sequenz strangaufwärts von Exon III des Chromosoms 9 mit der BCR-Sequenz strangabwärts von Exon III auf Chromosom 22 verbunden und es entsteht das BCR-ABL-Fusionsprotein (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bcr-abl_fusion_gene.jpg).

Man vermutet, dass das Onkogen BCR-ABL durch Doppelstrangbrüche während der Mitose entsteht, wenn die Zellen im pluripotenten hämatopoetischen Zustand vorliegen. Erleichtert wird die falsche Rekombination zwischen den Chromosomen 9 und 22 zusätzlich dadurch, dass auf beiden Chromosomen homologe Sequenzen vorliegen und diese in der Interphase näher beieinander liegen, als statistisch zu erwarten wäre. Bei BCR-ABL ist bekannt, dass es, verglichen mit dem Wildtyp c-ABL, eine abnorme Tyrosinkinase-Aktivität besitzt. Diese konstitutiv aktive Kinase ermöglicht das Ausbilden von Di- oder Tetrameren, die in der Lage sind, sich selbst zu phosphorylieren. Während das Wildtyp ABL-Protein in der Lage ist, sich zwischen dem Nukleus und Zytoplasma zu bewegen, ist das onkogene Fusionsprotein nur im Zytoplasma lokalisiert. Durch eine Vielzahl an Studien wurden einige zytoplasmatische Interaktionspartner von BCR-ABL identifiziert, wie DOK, SHC und GRB2. Über die Aktivierung der RAS-MAP-Kinase fördert BCR-ABL die Proliferation in den Leukämiezellen und die Aktivierung von STAT-Signalmolekülen verursacht im Nukleus eine gesteigerte Transkriptionsaktivität von einer Vielzahl an Genen. Die Interaktion mit PI3K/AKT verhindert, dass die Zellen in die Apoptose gehen. Über die GRB2/SOS-vermittelte Aktivierung von RAS werden die Kinasen RAF, MEK1/2 und ERK1/2 aktiviert und führen u.a. zur Transkription von FOS und JUN (43).

1. Einleitung

Mastozytosis ausschließen kann (49). Wird zusätzlich in der chronischen eosinophilen Leukämie eine hohe Klonizität klassifiziert, bezeichnet man sie als idiopathisches hypereosinophiles Syndrom (HES) (50). HES zeichnet sich durch eine unerklärliche, aber schwere periphere Bluteosinophilie ($>1.500/\text{mm}^3$) für mehr als 6 Monate aus, bei der meist die Organe Herz, zentrales und peripheres Nervensystem, Lunge und Haut durch Eosinophile infiltriert und letztendlich auch zerstört werden (51-53). Diese Krankheit ist bei Männern häufiger zu beobachten, als bei Frauen (9:1) und tritt meist im Alter zwischen 20 und 50 Jahren auf. Die absolute Leukozytenzahl ist in der Regel kleiner als $25.000/\text{mm}^3$ und besteht zu 30-70% aus Eosinophilen, im Knochenmark erhöht sich der Anteil auf 30-60%. Eine Gemeinsamkeit findet man bei 14 bis 60% aller Patienten mit HES durch den Nachweis des Fusionsproteins FIP1L1-PDGFR α . Das FIP1L1-PDGFR α -Fusionsprotein entsteht durch eine 800kb interstitielle Deletion del(4)(q12q12), wobei der Bruchpunkt des FIP1L1-Gens über einen Bereich von 40 kDa (Intron 7-10) streut, der Bruchpunkt für das PDGFR α -Gen hingegen auf einen sehr kleinen Bereich limitiert ist. Jedoch fällt auf, dass nach dem mRNA-Splicing normalerweise immer das identische Fusionsprotein exprimiert wird (54). Durch Mutationsanalysen hat man weiter festgestellt, dass nur die ersten 29 Aminosäuren des FIP1L1 nötig sind, um die PDGFR α Kinasedomäne zu aktivieren (52). Jedoch reicht der Anteil aus, um das Fusionsgen unter die Kontrolle des FIP1L1-Promoters und des FIP1L1-Translationsstarts zu stellen. Des Weiteren wird vermutet, dass auch die Stabilität und die subzelluläre Lokalisation unter der Kontrolle des FIP1L1 steht (49). Da durch die Deletion im Exon 12 die juxtamembrane Region des PDGFR α zerstört wird, wird die Region mit der funktionellen Autoinhibierung ausgeschaltet und somit ist die Kinase konstitutiv aktiv (54). Die durch FIP1L1-PDGFR α aktivierten Signalkaskaden sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch führen sie zur vermehrten Proliferation und geben die Überlebenssignale für die CEL. Einige Bindungspartner, wie PI3K, ERK1/2, STAT5 und AKT, konnten schon identifiziert werden und werden nach der Bindung durch die konstitutive Kinase phosphoryliert (49, 55).

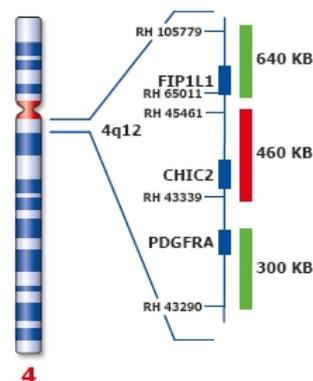


Abb. 10: Darstellung des Chromosoms 4 mit dem Detailausschnitt von 4q12.
(<http://www.veridex.com/fish/Default.aspx?tabid=207>)

Neben der chronischen eosinophilen Leukämie hat man das Fusionsprotein FIP1L1-PDGFR α auch noch in der primären Eosinophilie, in einer Untergruppe von Patienten mit systemischer Mastozytose mit Eosinophilie, in einigen Fällen mit akuter myeloischer Leukämie und akuter lymphoblastischer Leukämie mit T-Zellen nachweisen können (55). Die erste Zelllinie, die von einem Patienten mit CEL etabliert wurde, war EOL-1 (48).

1.6. Imatinib (Glivec/Gleevec)

Diese oben besprochenen molekularen Reorganisationen führen zu Fusionsproteinen mit einer konstitutiv aktiven Tyrosinkinase. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass BCR-ABL und FIP1L1-PDGFR α strukturelle und funktionelle Analogien aufweisen (56). Dies bietet einen guten Ansatz für die Entwicklung eines Inhibitors, um Leukämie zu therapieren. Ein bekannter Inhibitor, der zu beiden Onkoproteinen eine Bindungsaffinität besitzt, ist Imatinib. Imatinib hat eine interessante Entwicklungsgeschichte, die mit der chemischen Verbindung namens STI 571 begann.

Unter der Bezeichnung STI 571 versteht man ein 2-Phenylaminopyrimidin (46), dessen Vorläufermolekül sowohl für Serin-/Threoninkinasen als auch für Tyrosinkinasen eine Bindungsaffinität auswies. Durch den Austausch des Anilinophenylrings an der sechsten Position verlor der Inhibitor die Affinität für Serin-/Threoninkinasen. Durch die Anheftung der Methylgruppe an dieser Stelle wurde die Tyrosinkinase Affinität gesteigert (44). Diese Verbindung war bereits als potenter Inhibitor für PTK mit einer Spezifität für ABL und PDGFR beschrieben worden. Durch die Modifizierung und das Anhängen von Methyl- und Benzamidgruppen, wurde die Bindungsspezifität noch weiter erhöht (46). Die Wasserlöslichkeit verbesserte man durch die Einführung einer N-Methylpiperazin-Seitenkette. Letztendlich erhält man dadurch einen Inhibitor mit einer hohen Spezifität für CML-Zellen, der Effekt auf normale Zellen bleibt jedoch gering (44).

1. Einleitung

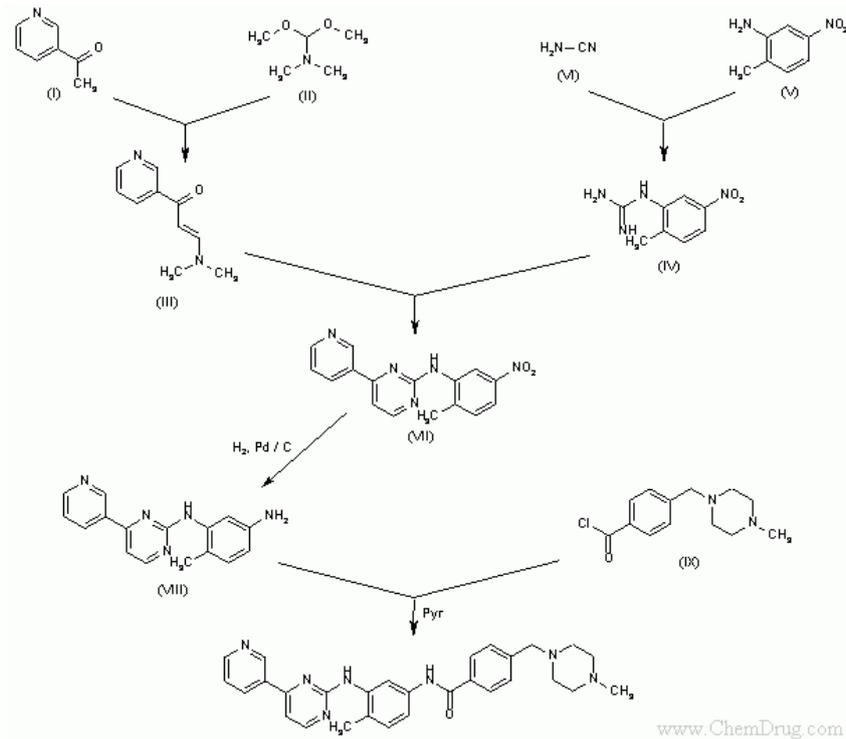


Abb. 11: Die chemische Synthese der Tyrosinkinase Imatinib (www.ChemDrug.com)

Die Wirkung der kleinen chemischen Verbindung Imatinib beruht auf einer kompetitiven Hemmung der ATP-Bindungsstelle, wodurch die Kinaseaktivität von BCR-ABL bzw. FIP1L1-PDGFR α inhibiert wird (43). Bei der aktiven Kinase befindet sich die Aktivierungsschleife in einer offenen Konformation, in der inaktiven in einer geschlossenen Form. Mit der inaktiven Kinase kann das Imatinib spezifisch eine feste Bindung eingehen und bildet mehrere Wasserstoffbrücken aus. Bereits der Austausch einer Aminosäure kann die Bindung zu Imatinib negativ beeinflussen (44). Durch die Bindung von Imatinib an die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL bzw. FIP1L1-PDGFR α wird die Phosphorylierung in den oben beschriebenen Signalkaskaden unterbunden und führt letztendlich zur Inhibierung des Zellwachstums und zur Apoptose der Zelle. Im unmutierten Zustand ist das FIP1L1-PDGFR α -Fusionsprotein ($IC_{50}=3,2$ nM (57)) sensitiver gegenüber Imatinib als BCR-ABL ($IC_{50}=0,47$ μ M (58)) und benötigt zur Inhibierung deshalb eine geringere Konzentration, um ein komplettes molekulares Ansprechen zu beobachten (55).

Imatinib hat daneben nur noch eine hemmende Wirkung auf die Proteine c-ABL, TEL-ABL, PDGFR und KIT. Daher wird Imatinib meist gut vertragen, hat aber die Überlebenschance von CML-Patienten drastisch erhöht. Die Gesamtüberlebensrate bei einer Imatinib behandelten CML beträgt nach 5 Jahren 89%, nur bei etwa 6% verliert Imatinib während der Therapie seine Wirkung, weil die Tyrosinkinase des Onkoproteins sich wieder aktivieren konnte. In 50% dieser Fälle liegt die Ursache in Punktmutationen, die entweder direkt die Bindungsaffinität zu

Imatinib verschlechtern, oder die das Gleichgewicht hin zur offenen Konformation des Proteins beeinflussen.

Betrachtet man das Fusionsprotein BCR-ABL, ist besonders eine Punktmutation (T315I) kritisch, da gegen diese Mutation auch Folgemedikamente wie Dasatinib und Nilotinib keine Wirkung zeigen (43). Die Aminosäure T315 liegt an der Kontaktstelle zwischen ABL und Inhibitor und ist an der Bildung der wichtigen, stabilisierenden, hydrogenen Brückenbindung beteiligt (53). Daneben gibt es etwa 90 weitere bekannte Mutationen bei BCR-ABL, die eine Resistenz gegen Imatinib aufweisen (32, 59). Die Mutation T674I im PDGFR führt ebenfalls zur Resistenz gegen Imatinib. Durch Kristallstrukturanalysen der katalytischen Domäne hat man festgestellt, dass die Aminosäure T674 im PDGFR an der entsprechend Stelle liegt wie T315 in c-ABL. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Mutation T674I im PDGFR eine gleich starke Resistenz gegenüber den Inhibitoren bewirkt, wie T315I (32, 52-54). Daneben hat man im FIP1L1-PDGFR α -Fusionsprotein noch die Mutationen D842V mit einer Resistenz gegen Imatinib identifizieren können (55).

Um eine alternative Therapie für resistente Zellen zu entwickeln, ist es nötig, die ablaufenden Mechanismen im Proteom besser zu verstehen und die beteiligten Proteine in der Signalkaskade zu identifizieren. Für diesen Ansatz braucht man ein Analyseverfahren, welches einen Überblick über das gesamte Proteom bietet und auch Veränderungen im PTM aufzeigen kann.

1.7. Massenspektrometrie

Seit dem Beginn der Massenspektrometrie (MS) vor etwa 25 Jahren, war das Ziel der proteomischen Analyse eine komplette Charakterisierung aller Proteine. Mit Hilfe der MS kann man die Expression von Proteinen, Proteininteraktionen und Proteinmodifikationen analysieren (60).

Zur Analyse werden dazu kurze Peptidsequenzen benötigt, was durch den Verdau der Proteine mit Trypsin erreicht wird. Trypsin gehört zu der Serinprotease-Familie und da dessen Substratbindungstasche charakteristisch stark ausgeprägt und negativ geladen ist, braucht die Substrataminosäure eine lange Seitenkette mit positiver Ladung. Diese Bedingung wird nur von Arginin und Lysin erfüllt und demzufolge ist das Enzym sehr spezifisch für die Spaltung am C-terminalen Rest von Arginin oder Lysin (61). Laut der Swiss-Prot-Datenbank haben die Aminosäuren Lysin und Arginin einen durchschnittlichen Anteil von 5,7% bzw. 5,4% in den Proteinen. Somit erwartet man bei einem vollständigen Verdau des Proteoms eine theoretische durchschnittliche Peptidlänge von etwa neun Aminosäuren. Praktisch findet man bei einem

Trypsin-verdauten Proteom Peptide mit Längen zwischen fünf und 25 Aminosäuren vor. Diese Peptidgrößen sind für die nächsten Schritte optimal geeignet (62), da das Peptidgemisch vor der MS über eine quantitative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) aufgetrennt wird. Anschließend werden die Peptide, Analyte genannt, in die Gasphase überführt, ionisiert und mit Hilfe eines elektrischen Feldes beschleunigt. Da jeder Analyt ein charakteristisches Masse zu Ladung-Verhältnis (m/z) aufweist, kann im Analysator des Massenspektrometers das m/z genau berechnet und im Detektor die Anzahl der Ionen für jeden m/z -Wert registriert werden (63).

Durch proteomische Studien ist theoretisch das gesamte Proteom analytisch zugänglich, besonders aber auch kann die Proteinausstattung eines Kompartiments, einer Zelle oder Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt umfassend untersucht werden.

1.7.1. MS für Proteomanalyse

Die klassische Methode, um Proteine zu identifizieren und analysieren, besteht aus einer eindimensionalen (DE) Gelelektrophorese mit anschließendem Antikörpernachweis im Western Blot. Dabei muss bedacht werden, dass diese Methode nur semiquantitativ ist, Antikörper oftmals nur eine geringe Spezifität für posttranslationale Modifikationen aufweisen und man bereits vor der Analyse wissen muss, welches Protein untersucht wird. Anders dagegen ist die proteomische Analyse. Hier ist es möglich, die meisten zellulären Proteine in einem quantitativen Experiment abzudecken (64). Mit der MS ist es möglich, aus einem komplexen Proteingemisch Komponenten zu identifizieren und zu quantifizieren. Aber auch hier stellte man bei der Analyse der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* im Jahr 2003 fest, dass nur die Proteine identifiziert wurden, die am häufigsten im Proteom vorkamen. Daher wurden eine Anzahl an verschiedenen Kombinationen der Protein- und Peptidauftrennung entwickelt (63), um die Komplexität der Proben zu reduzieren und Proteine mit einer geringen Häufigkeit im Proteom identifizieren zu können. Oftmals werden mehrere Schritte in der Probenvorbereitung zusammen kombiniert (65).

Die klassische Auftrennung der Proteine erfolgt im Gel mittels der Elektrophorese, bei der die Proteine anhand ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Das Gel kann in mehrere Fraktionen unterteilt werden und die Proteine in den einzelnen Gel-Fraktionen können anschließend mit Trypsin verdaut werden. Nach der Extraktion aus dem Gel können die einzelnen Proben für die MS-Analyse vorbereitet werden (65). Um ein komplettes Proteom zu dekomplexieren, können auch chromatische Auftrennungsverfahren verwendet werden, wie z.B. die der *strong cation exchange* (SCX)-Chromatographie. Dabei wird zuvor die in Lysepuffer gelöste Probe trypsiniert und anschließend trennt man, basierend auf den unterschiedlichen

Ladungszuständen, die Peptide in der SCX-Chromatographie in mehrere Fraktionen auf. Da die Puffer für die SCX einen pH-Wert von 2,7 aufweisen, tragen unphosphorylierte Peptide dabei eine Nettoladung von +2. Bei der gleichen Bedingung weisen phosphorylierte Peptide durch die negativ geladene Phosphatgruppe eine Nettoladung von +1 auf. Da die SCX die Peptide jedoch hauptsächlich über die Ladung der Ionen auftrennt, erwartet man, dass einfach positiv geladene Phosphopeptide als Erstes eluiert werden. Dadurch erreicht man in den ersten Fraktionen eine geringere Komplexität. Jedoch muss man bedenken, dass mehrfach phosphorylierte tryptische Peptide eine Nettoladung von 0 oder weniger haben und nicht von der stationären Phase erfasst werden und demzufolge nicht in den eluierten Fraktionen, sondern im Durchfluss auftauchen (65). Will man jedoch nur ein Subproteom oder individuelle Proteine analysieren, bietet sich die Anreicherung von bestimmten Peptiden oder Proteinen durch eine Immunpräzipitation an. Nach der Elution können die Proteine mit Trypsin verdaut und in der MS analysiert werden (65).

Vor der eigentlichen MS Analyse, wird im Allgemeinen das Peptidgemisch mit Hilfe einer Flüssigchromatographie im Nanomaßstab aufgetrennt und durch ein angeschlossene Elektrosprayquelle ionisiert. Ein Massenspektrum wird alle paar Sekunden aufgenommen, anschließend werden die intensivsten Peptide isoliert, in einem inerten Gas fragmentiert und deren Spektren aufgenommen, was als MS/MS (MS^2) Spektrum bezeichnet wird. Diese Fragmente bestehen fast ausschließlich aus N- und C-terminalen Fragmenten der Peptidionen und werden b- und y-Ionen genannt (66).

Ein neuer Typ der hybriden MS besteht dabei aus dem *linearen Iontrap* (LTQ)-Orbitrap Massenspektrometer (67). Dabei wird eine lineare Ionenfalle, die eine hohe Sensitivität für MS und MS/MS Spektren, aber eine relativ niedrige Auflösung und Massengenauigkeit hat, mit einer Orbitrap kombiniert, welche ein sehr akkurater Massendetektor mit hoher Auflösung ist. Zur Peptididentifikation wird die „Bottom Up“ Proteomanalyse verwendet. Hierbei arbeiten beide Masseanalysegeräte parallel. Mit der Orbitrap wird mit hoher Auflösung und Massengenauigkeit das Spektrum des Vorläuferions ermittelt und mit der linearen Iontrap wird schnell die Fragmentierung und Detektion der MS/MS Spektren der selektierten Peptide aufgenommen. Dazwischen befindet sich die C-Trap. Die C-Trap liegt nach der Iontrap und sammelt die Ionen auf, um sie dann an die Orbitrap abzugeben. Damit schafft man ca. 1 MS Spektrum pro Sekunde im Orbitrap-Detektor mit einer Auflösung von 60.000 (67-68) sowie 3-5 Fragmentationenspektren, welche mit geringerer Auflösung in der linearen Ionenfalle aufgenommen werden können

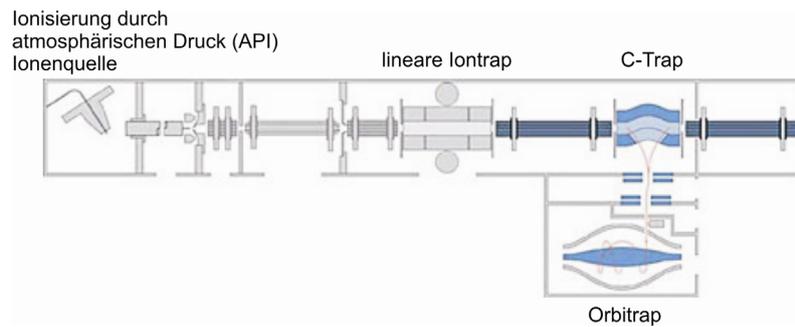


Abb. 12: Schematische Darstellung des hybriden linearen Iontrap-Orbitrap-Instruments (68).

Außerdem wurden Datenbanksuchen entwickelt, um die große Anzahl an Peptidspektren zu identifizieren und diese mit ihren dazugehörigen Proteinen auflisten zu können. All diese Methoden und Technologien werden kombiniert, um zusammen eine möglichst hohe und aussagekräftige, quantitative Hochdurchsatz-Proteomanalyse zu schaffen. Dabei kann man Aussagen über Protein-Protein-Verbindungen machen, Proteine identifizieren und Proteinexpressionsprofile analysieren (63).

1.7.2. Quantitative Proteomanalyse

Der Ursprung der proteomischen Analyse geht auf die vor 25 Jahren entwickelte zweidimensionalen Gelelektrophorese zurück. Hierbei kann das charakteristische Färbemuster der Proteine verglichen und Regulierungen bestimmt werden, die z. B. unterschiedlich behandelte Zelllinien von verschiedenen Gewebetypen ausbilden (69). Dabei konnte erstmalig eine ungefähre Aussage über hoch oder runter regulierte Proteine getroffen werden. Der Nachteil dieser Methode lag in dem begrenzten dynamischen Detektionsbereich und der Schwierigkeit, hydrophobe Membranproteine zu erfassen (70).

Doch auch die Methode der Massenspektrometrie an sich ist alleine noch nicht quantitativ. Das liegt vor allem an den variablen Ionisierungseigenschaften von Peptiden unterschiedlicher Sequenz bzw. PTM (69). Eine Möglichkeit, die Abundanz identischer Peptide in unterschiedlichen Proben vergleichend zu bestimmen, beruht auf der *extracted ion chromatography* (XIC)-basierten Quantifizierung, bei der die Peptide selbst nicht markiert werden. Hierbei werden die Intensitäten eines Peptides zwischen separaten chromatographischen Läufen miteinander verglichen und dadurch ihre relative Häufigkeit ermittelt (70). Um direkte quantitative Aussagen innerhalb von LC-MS Analysen treffen zu können, wurde die Isotopenmarkierung von Proteinen bzw. Peptiden in der Proteomik eingeführt (69). Für die differentielle Isotopenmarkierung vor der massenspektrometrischen Analyse gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen kann diese nach dem enzymatischen Verdau in Peptide eingebaut werden. Zu dieser Methode gehört z. B. die *isobaric tag for relative and absolute quantitation* (iTRAQ) Methode, bei der die N-terminalen Enden und

Lysinseitenketten der verdauten Peptide kovalent markiert werden (70). Die iTRAQ-Reagenzien sind isobarisch und spezifisch für Amine, wodurch nahezu alle Peptide in einer Probe markierbar sind ohne die Information über PTM zu verlieren. Die differentielle Markierung mit iTRAQ-Reagenzien ermöglichte ursprünglich die vergleichende Analyse von bis zu vier unterschiedlichen Proben, und die Anzahl könnte mit Einführung einer neuen iTRAQ-Generation auf bis zu acht gesteigert werden. Der größte Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie auch die vergleichende Analyse von nicht metabolisch markierbarem Material, wie z.B. Gewebeproben, ermöglicht. (71). Die Isotopenmarkierung basierte anfänglich auf der Kultivierung in entweder ^{14}N oder ^{15}N -markiertem Nährmedium, wodurch Peptide gleicher Sequenz und Modifikation aus den unterschiedlich markierten Zellpopulationen in der nachfolgenden MS Analyse charakteristische Massenverschiebungen entsprechend der Anzahl der eingebauten Stickstoffatome aufwiesen. Im Jahr 2002 wurde zum ersten Mal die Möglichkeit der stabilen isotopischen Markierung von Aminosäuren in der Zellkultur beschrieben (*stable isotope labelling with amino acids in cell culture*, SILAC). Mit Hilfe dieser Markierung kann man bis zu drei Zustände in einer LC-MS Analyse direkt miteinander vergleichen. Beispielsweise kann durch die Kombination von drei verschiedenen Isotopenvarianten der Aminosäuren Arginin und Lysin eine Zellpopulation mit den leichten Isotopen von Arginin und Lysin (leicht: L-Arginin: Arg0 und L-Lysin: Lys0), eine mit den mittelschweren (medium: L-Arginin- $^{13}\text{C}_6$ (Arg6) und L-Lysin- $^2\text{H}_4$ (Lys4)) und die dritte mit den schweren Isotopen (schwer: L-Arginin- $^{13}\text{C}_6$ - $^{14}\text{N}_4$ (Arg10) und L-Lysin- $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ (Lys8)) markiert werden. In den zu vergleichenden Zellpopulationen werden dann die jeweiligen Lys und Arg Varianten in neu synthetisiertes Protein eingebaut. Nach mehreren Zellteilungen (meistens 5-6) ist dann eine nahezu vollständige Inkorporation in das zelluläre Proteom erreicht (69). Der Vorteil bei SILAC besteht darin dass die SILAC Methode einfach in der Handhabung ist und für die Modifikation der Proteine keine chemischen Reaktionen, die in der Regel nicht zu 100% quantitativ ablaufen, nötig sind (70). Durch die Vermischung der verschiedenen Populationen in einem frühen Stadium minimieren sich quantitative Fehler, die durch die getrennte Prozessierung bei der anschließenden MS Probenvorbereitung auftreten könnten. Verwendet man anschließend zum Proteinverdau Trypsin, so besitzt bei vollständiger Spaltung jedes Peptid (mit Ausnahme der C-terminalen Peptide von Proteinen) eine markierte Aminosäure Arginin oder Lysin. Des Weiteren hat die Markierung mit den SILAC-markiertem Arg und Lys, im Gegensatz zur Markierung mit bestimmten deuterierten Reagenzien, keinen nennenswerten Einfluss auf die Retentionszeit der Peptide bei der nanoHPLC (72). In der MS sind die unterschiedlich markierten Populationen durch die bekannte Massendifferenz der Peptide leicht zu unterscheiden. In dem Massenspektrum tritt nun jedes Peptid als Paar (bei zwei Populationen) bzw. als Triplet (bei drei Populationen) auf (73). Die gewonnenen MS Daten werden

1. Einleitung

anschließend mit Computerprogrammen, wie MaxQuant in Verbindung mit dem Suchalgorithmus MASCOT, prozessiert um Peptide und Proteine sowohl zu identifizieren und zu quantifizieren. Das Programm berechnet die Intensitäten der unterschiedlich Isotopenmarkierten Peptidformen über ihren Elutionszeitraum in der MS-Analyse und bestimmt darüber die Verhältnisse der jeweils gleichen Peptide in den verschiedenen Zellpopulationen. Nachfolgend wird dann die Information aller quantifizierten Peptide eines Proteins zur Berechnung der Proteinratios herangezogen. (74).

So kann man bei der Kombination der proteomischen Analyse mit der SILAC-Methode z.B. leicht unterschiedliche Zelllinien direkt miteinander vergleichen und auch Experimente durchführen, bei denen neben der Proteinabundanz auch PTM Änderungen anhand von modifizierten Peptiden auf bestimmte Stimuli hin erfasst werden können, vergleichen (73).

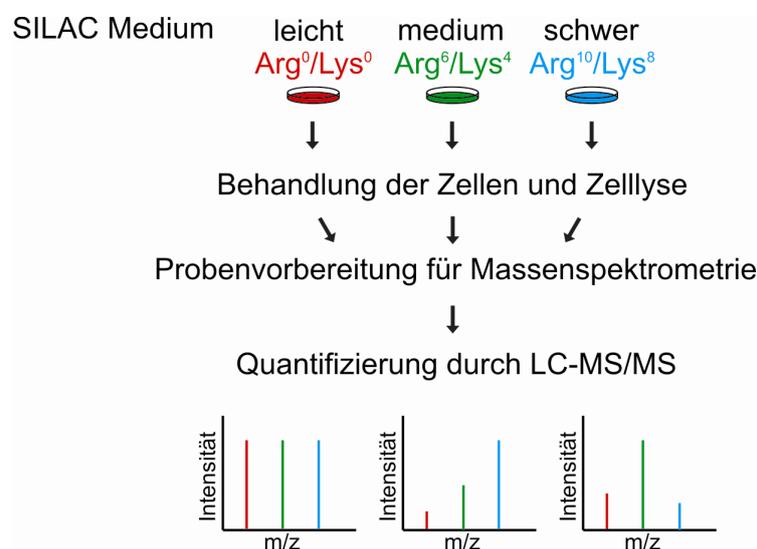


Abb. 13: SILAC-basierte quantitative proteomische Analyse. Zellen wachsen in einem Medium das entweder „leichte“, „medium“ oder „schwere“ Isotope der Aminosäuren enthält. Nach der kompletten Markierung können die unterschiedlich markierten Zellpopulationen z.B. mit Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren stimuliert werden und mit einer Zellpopulation, die unbehandelt ist, verglichen werden. Nach der Probenvorbereitung, die u.a. Anreicherungsschritte und Fraktionierungsschritte beinhalten kann, werden die Proteine verdaut und mit Hilfe der LC-MS/MS-Analyse die relative Intensität der markierten Peptide bestimmt. Die relative Quantifizierung wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Softwareprogramm MaxQuant durchgeführt.

Der große Vorteil der MS-basierten Proteomanalyse besteht darin, dass sie im Gegensatz zu Hypothesen-gestützten Forschungsansätzen in der Regel ergebnisoffen durchgeführt wird. Dadurch können u.a. noch unbekannte Modifikationsereignisse, wie z. B. Phosphorylierung in Abhängigkeit von Wachstumsfaktorbehandlung, in großem Umfang in zellulären Proteomen erfasst werden. Allerdings ist zu bedenken, dass nicht alle Peptide analysiert werden können. Manche Peptide sind zu klein bzw. zu groß und liegen dadurch nicht in dem Massebereich, der analysiert werden kann. Andere Peptide sind nicht geeignet, um auf der Chromatographiesäule

zu binden. Natürlich muss berücksichtigt werden, dass bei jedem Schritt der Probenvorbereitung ein unbekannter Anteil an der Probe verloren gehen kann (70).

1.7.3. Phosphoproteomanalyse

Seit 1906 glaubte man, dass die Phosphatgruppen kovalent an Proteine gebunden sind, doch erst 1933 isolierte man die erste Phosphoaminosäure (75). Heute weiß man, dass die Phosphorylierung die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation in der Zelle ist. In den eukaryotischen Zellen kommt die Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin im Verhältnis von 1.800:200:1 vor. Obwohl die Tyrosinphosphorylierung nur zu einem geringen Anteil vorliegt spielt diese besonders bei der Regulation von intrazellulären Signalübermittlungen eine wichtige Rolle. Durch die quantitative proteomische Analyse hat man nun die Möglichkeit, die globale Auswirkung verschiedener zellulärer Bedingungen auf die Phosphorylierung der Proteine zu untersuchen (72) und somit ein fundiertes Verständnis über die Signalwege einer Zelle zu erhalten. Bei der Identifizierung von phosphorylierten Peptiden geht die Massenzunahme von ca. 80 Da pro phosphorylierter Aminosäure mit ein. Zudem ist es anhand von charakteristischen Fragmentationenabfolgen in MS/MS-Spektren sogar oft möglich, Phosphorylierungsstellen mit hoher Konfidenz zu lokalisieren. Wegen der geringen Abundanz von phosphorylierten Peptiden in gesamtzellulären Peptidproben ist es aber wichtig, diese selektiv anzureichern. Da sich die Struktur von Phosphotyrosin durch die Größe deutlich von Phosphoserin oder -threonin unterscheidet, kann man leicht mit Antikörpern Proteine oder Peptide mit phosphoryliertem Tyrosin aus einem komplexen Zellysate herausziehen. Jedoch muss beachtet werden, dass eine Phosphotyrosin-basierte Anreicherung auf Protein- oder auf Peptidebene unterschiedliche Ergebnisse liefert. Werden Proteine präzipitiert, so reichert man intakte Proteine und ihre Bindungspartner an, wodurch die Identität der tatsächlich phosphorylierten Proteine sowie der regulierten Phosphorylierungsstellen zunächst unklar bleibt. Wird auf der Ebene der Phosphopeptide präzipitiert, so hat man die Möglichkeit, Regulationen auf der Ebene der Phosphorylierungsstellen direkt zu erkennen (76).

Möchte man das komplette Phosphoproteom analysieren, empfiehlt es sich, alle Phosphopeptide anzureichern (77). Dazu kann mit positiv geladenen, immobilisierten Metallionen wie Fe^{3+} oder Ga^{3+} , die in immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC)-Resins vorkommen, eine Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Peptide erreicht werden. Auch durch die Anlagerung von Phosphatgruppen an den bidentalen Oberflächenkomplexen von Titaniumdioxid (TiO_2) ist es möglich, die Phosphopeptide effizient anzureichern (78-79).

Durch diese Anreicherungsverfahren kann man in Verbindung mit vorgeschalteter Peptidfraktionierung, z.B. durch SCX Chromatographie, oftmals auch Phosphorylierungsstellen von Transkriptionsfaktoren und von anderen regulatorischen Proteinen identifizieren, die nur in einem geringen Maß im Lysat vorkommen. Dies wurde anhand von Ergebnissen von Olsen *et al.* deutlich, die 2006 die erste „globale“ quantitative Phosphoproteomanalyse veröffentlichten. Olsen *et al.* konnten nach EGF Stimulation mehr als 6000 Phosphorylierungsereignisse in ihrem zeitlichen Verlauf verfolgen, inklusive einer Reihe von Phosphorylierungsveränderungen an niedrig abundanten Transkriptionsfaktoren (76).

1.7.4. Anwendungen

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten die MS in Signaltransduktionsstudien und der Identifizierung zellulärer Zielprotein niedermolekularer Wirkstoffe anzuwenden. Hier soll nur ein kleiner Ausschnitt aufgezeigt werden.

Bantscheff *et al.* verwendeten die MS-Analyse in ihrem Versuchsansatz, um die zellulären Targets von den BCR-ABL Inhibitoren Imatinib, Dasatinib und Bosutinib zu untersuchen und zu analysieren, welche zellulären Phosphorylierungsänderungen diese Wirkstoffe in Proteinen hervorrufen, welche mittels einer Kombination von immobilisierten Kinaseinhibitoren aus Zellextrakt isoliert werden konnten. Dabei wurden für alle Inhibitoren u. a. neue Kinase- und Nicht-Kinase-Targets identifiziert (80).

Olsen *et al.* analysierten das Proteom und das Phosphoproteom im menschlichen Zellzyklus. Dabei hat diese Arbeitsgruppe herausgefunden, dass Proteine, die in der Regulation der metabolischen Prozesse involviert sind sowie nukleare Proteine eine hohe Phosphorylierungsaktivität in der Mitose haben. Daraus wurde gefolgert, dass die Phosphorylierung die Proteine in mitotischen Zellen inaktivieren könnte (81).

Daub *et al.* haben vor der MS-Analyse einen Proteinkinase-Anreicherungs-schritt mit Hilfe von immobilisierten Inhibitoren eingefügt, so dass diese oftmals nur niedrig exprimierten Enzyme mit hoher analytischer Sensitivität untersucht werden konnten. So wurde der Phosphorylierungszustand von mehr als 200 Kinasen während der S- und M-Phase vergleichend analysiert und eine Vielzahl neuer Regulationspunkte sowie potentielle Phosphorylierungsnetzwerke identifiziert (82).

Kürzlich wurde von Sharma *et al.* gezeigt, dass durch einen weiterentwickelten Versuchsansatz basierend auf immobilisierten Kinaseinhibitoren nicht nur eine eindeutige Identifizierung von zellulären Zielproteinen möglich ist, sondern diese hinsichtlich ihrer Wirkstoffaffinität quantitativ mit guter Genauigkeit bestimmt werden konnten (83).

Zusammengefasst kann man sagen, dass die proteomische Analyse in Kombination mit Anreicherungsverfahren eine geeignete Technik ist, um zelluläre Regulation von Proteinkinasen sowie deren Wechselwirkungen mit niedermolekularen Wirkstoffen zu analysieren. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass nicht immer eindeutig festzustellen ist, ob spezifisch von immobilisiertem Wirkstoff isolierte Proteine direkt oder indirekt (als Bindepartner eines direkten Targets) mit diesem interagieren.

2. Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der MS Rückschlüsse auf die Signalwege zu ziehen, die durch BCR-ABL und FIP1L1-PDGFR α in den chronischen myeloischen Leukämiezellen beeinflusst werden. Durch die Anreicherung von Phosphopeptiden erhofft man sich nach Behandlung mit Imatinib, die Regulierung auf Phosphorylierungsebene beobachten zu können. Dadurch könnte man wichtige Signalvermittler in der Zelle identifizieren, die dann als potentielle neue Angriffsproteine für neue Inhibitoren Verwendung finden.

Um bekannte wie auch potentiell neue Zielproteine von Imatinib zu identifizieren, wird außerdem nicht nur der Fokus auf die Phosphorylierungsebene gelegt, sondern auch untersucht, welche Proteine nach der Behandlung von Imatinib komplett gehemmt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
BSA (Rinder-Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Typon Imaging AG, CH-Krauchthal
Fixierlösung für Röntgenfilme	Typon Imaging AG, CH-Krauchthal
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonsäure))	Serva, Heidelberg
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
IAA (Iodoessigsäure)	Sigma, Steinheim
L-Glutamine	(GibCo) Invitrogen, Eggenstein
Natriumazide	Serva, Heidelberg
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Roth, Karlsruhe

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) in analytischer Qualität erworben.

3.1.2 Chemikalien für SILAC und MS-Analyse

Acetonitril für die HPLC	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumbcarbonate	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumhydroxide	Merck, Darmstadt

3. Material und Methoden

Antioxidanz	Invitrogen, Eggenstein
2,5-Dihydroxybenzoic acid	Fluka, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum, dialysiert	Gibco, USA
Iodoacetamid	Sigma, Taufkirchen
L-Arginin	Gibco, USA
L-Arginin: HCl, U-13C6 14N4 USA	Cambridge Isotope Laboratories, USA
L-Arginin: HCl, U-13C615N4 USA	Cambridge Isotope Laboratories, USA
L-Glutamin	Gibco, USA
L-Lysin	Gibco, USA
L-Lysin: 2 HCl, 2H4 USA	Cambridge Isotope Laboratories, USA
L-Lysin: 2 HCl, U-13C615N2 USA	Cambridge Isotope Laboratories, USA
Lys-C	WAKO, Neuss
n-Octosylglucosid	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin, 100x	PAA, Germany
SILAC RPMI	Gibco, USA; Thermo Fisher Scientific
Thiourea	Invitrogen, Eggenstein
Trypsin (seq. grade modified)	Promega, USA
Urea	Merck, Darmstadt

3.1.3 Weitere Materialien

Agarose	Gibco-BRL, Eggenstein
AMV RT Inkubationspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Cryo-Röhrchen	Nunclon, Dänemark
Desoxynukleotide (dNTPs)	Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
ECL-Kit	PerkinElmer/NEN, Köln
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia, Freiburg
K1, K2 Primer (CapFinder PCR synthesis Kit)	Clontech, USA
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin

Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Protein A-Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Reverse Transkriptase, AMV	Roche Diagnostics, Mannheim
ReadyMix redtaq PCR-Reaktionsmix mit MgCL ₂	Sigma, Taufkirchen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing
Zellkulturmaterialien	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, UK
Zellulosenitrate 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

3.2. Zellkulturmedium

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) und weitere Zusätze wurden von Invitrogen (Eggenstein) erworben. Das Einfriermedium bestand aus 70% RPMI Medium, 20% FCS und 10% DMSO.

3.3. Stocklösungen

Auftrennungsgel Puffer (4x)	0,5 M Tris/HCl pH 8.8
	0,4 % SDS
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol
	30,0 % Glycerin
	100,0 mM EDTA pH 8,0
Laemmli Puffer (3x)	100 mM Tris/HCl pH 6.8
	3.0 % SDS
	45.0 % Glycerol
	0.01 % Bromphenolblau
	7.5 % β-Mercaptoethanol
NET	50.0 mM Tris/HCl pH 7.4
	5.0 mM EDTA
	0.05 % Triton X-100
	150.0 mM NaCl

3. Material und Methoden

PBS	137.0 mM NaCl 27.0 mM KCl 80.9 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
Propidiumiodidpuffer	0,1 % Natriumcitrat 0,1 % Triton X-100 50 µg/ml Propidiumiodid
Sammelgel Puffer (4x)	0,5 M Tris/HCl pH6.8 0,4 % SDS
SD-Transblot	50.0 mM Tris/HCl pH 7.5 40.0 mM Glyzin 20.0 % Methanol 0.004 % SDS
Strip-Puffer	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 2.0 % SDS 100.0 mM β-Mercaptoethanol
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0 mM Tris/HCl pH 7,5 1918,0 mM Glyzin 1,0 % SDS
TAE (10x), pH 8,0	400 mM Tris 10 mM EDTA 50 mM Natriumazetat

3.4 Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
EOL-1	humane akute myeloische (eosinophile) Leukämie Positiv für das FIP1L1-PDGFR α Fusionsprotein	DSMZ ⁽¹⁾ , # ACC 386
K562	humane chronische myeloische Leukämie Positiv für das Philadelphia-Chromosom mit dem BCR-ABL Fusionsprotein	ATCC ⁽²⁾ , # CCL-243

3.5. Antikörper

3.5.1. Primäre Antikörper

Die gelisteten Antikörper wurden entweder für die Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper für die Analyse im Immunoblot eingesetzt.

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
c-ABL	Maus, monoklonal	SC #23
pABL	Kaninchen, monoklonal, erkennt phosphoryliertes Tyr 412	CST #2865
pERK 1+2	Kaninchen, polyklonal, erkennt phosphoryliertes Thr202/Tyr204	CST#9101
Fer LA	Kaninchen, polyklonal	(84)
Lamin AC	Maus monoklonal	SC #7292
PDGFRalpha	Kaninchen polyklonal	UBI #06498
Syk (4D10)	Maus, monoklonal	SC #1240
pSYK	Kaninchen, polyklonal erkennt phosphoryliertes Tyr525/526	CST #2711
Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma #T9026
pTyr (4G10)	Maus, monoklonal, erkennt phosphorylierte Tyrosinreste	UBI, USA

3.5.2. Sekundäre Antikörper

Für die Analyse im Immunoblot wurden sekundäre Antikörper verwendet, die mit der Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. *Horseradish*) konjugiert wurden.

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Ziege anti-Maus-HRP	1 : 20,000	Sigma, Taufkirchen
Ziege anti-Kaninchen-HRP	1 : 20,000	BioRad, München

3.6. Zellkultur

Die Zelllinien wurden in Inkubatoren (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) unter den Bedingungen 7% CO₂, 93% wassergesättigte Luft und 37°C kultiviert. Zur Zellzahlbestimmung wurde der *Z1 Coulter Particle Counter* (Beckman Coulter, Inc) verwendet. Dazu wurde die zu messende

Zellsuspension im Verhältnis 1:100 mit der *Coulter Isoton in Solution*-Lösung verdünnt und es wurde die Anzahl aller Partikel mit einer Größe zwischen 7 – 21 µm berechnet. Die Zelllinien wurden nach den Richtlinien der Herkunftszellbanken kultiviert.

3.7 Analytische Methoden mit Proteinen

3.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration in einem kompletten Zelllysat

Das *Micro BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Sankt Augustin) und das *BioRad protein assay* (BioRad, München) wurden, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet.

3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE Methode wurde durchgeführt, wie bereits beschrieben (85) wurde. Als molekulare Standardgrößen wurden folgende Proteine eingesetzt:

Protein	MW (kDA)
Myosin	205,0
B-Galaktosidase	116,25
BSA	66,2
Ovalbumin	42,7
Carboanhydrase	29,0
Trypsin-Inhibitor	21,5
Lysozym	14,4

3.7.3 Überführen von Proteinen auf die Nitrozellulosemembran

Für die Analyse von Immunoblots wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dazu wurde das Gel mit einer Nitrozellulosemembran zwischen mit Transblot-SD Puffer getränkte Membranen in einer *Semidry*-Blotkammer gelegt. Mit einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² wurden nach 2 h die Proteine durch den Stromfluss von dem Gel auf die Membranen überführt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S (2 g/l in 2 % TCA) angefärbt, um eine erste Ladekontrolle zu haben und die Standardproteine zu markieren. Entfärbt wurde die Membran mit destilliertem Wasser.

3.7.4 Proteinnachweis im Immunoblot

Die Proteine die auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden, konnten nun mit Antikörpern durch die spezifische Immunreaktion von Antigen-Antikörperbindung nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungen, die durch die Membran oder durch repetitive Sequenzen in den Proteinen entstehen können, zu vermeiden, wurden diese Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit dem Blockpuffer (1x NET, 0.25% Gelatine) abgesättigt. Dabei wurde der Blockpuffer mindestens dreimal gewechselt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, gelöst in Blockpuffer in der Verdünnung die vom Hersteller empfohlen wird, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit dem Blockpuffer wurde der Puffer, bestehend aus sekundärem Antikörper und Blockpuffer, für 90 min auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen, wurde die Membran mit dem ECL-Kit auf den chemolumineszenten Nachweis der Peroxidaseaktivität des sekundären Antikörpers vorbereitet. Die so entstandenen fluoreszierenden Signale wurden in der Dunkelkammer durch die Exponierung und anschließendem Entwickeln in einer Entwicklermaschine (Optimax X-Ray Film Processor, Modell 1170-1-0000, Protec Medizintechnik GmbH + Co KG, Oberstenfeld) auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Wurde die Membran für einen weiteren Protein-Antikörpernachweis gebraucht, wurden die gebundenen Antikörper der Membran mit Hilfe des Strip-Puffers, dem frisch β -Mercaptoethanol (0,85%) zugesetzt wird, entfernt. Der Strip-Puffer wirkte für etwa 1 h bei 50°C auf die Membran ein und wurde anschließend gründlich mit destilliertem Wasser von der Membran abgewaschen. Nach mindestens 1 h Stunde Inkubation mit dem Block-Puffer war die Membran für eine weitere Behandlung mit einem primären Antikörper bereit.

3.8 SILAC-Markierung, Lyse der Zellen und anti-pTyr Immunopräzipitation

3.8.1 SILAC Medium in der Zellkultur

Für quantitative Studien mit der Massenspektrometrie wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium kultiviert, das neben 10% dialysiertem Kälberserum von Invitrogen, 1% (10.000 Einheiten/ml) Penicillin / (10 mg/ml) Streptomycin (Invitrogen) und spezielle Aminosäuren enthielt. Die Aminosäuren waren entweder unmarkiertes L-Arginin (Arg0) mit der Konzentration 45 mg/l und L-Lysin (Lys0) mit der Konzentration 76 mg/l oder entsprechend gleiche Menge der Isotope L-[U- $^{13}\text{C}_6$]Arginin und L-[$^2\text{H}_4$]Lysin (Arg 6 , Lys 4) oder L-[U- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]Arginin und L-[U- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$]Lysin (Arg 10 , Lys 8) (Cambridge Isotope Laboratories oder Sigma). Die K562-Zellen wurden für die Analyse der Kinase aufgereinigten Datensätze anfangs

in 15 cm Petrischalen für fünf Zellverdopplungen kultiviert und anschließend in eine Spinnerflask (BellCo Glass, USA), ein Glaskolben mit magnetischem Rotor der für große Volumina gut geeignet ist, überführt. Dabei war die Anfangskonzentration der Zellen $0,25 \times 10^6$ in 500 ml frischem SILAC Medium. Nach zwei weiteren Zellverdopplungen waren die K562-Zellen bereit für die Imatinibbehandlung (ACC corporation, USA). Für 90 min wurden die Zellen entweder mit 1 μM , 10 μM oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Bei der Analyse des kompletten Zelllysates ohne Anreicherung wurden die Zellen für alle sechs Zellverdopplungen in 15 cm großen Petrischalen kultiviert. Eine Population wurde für 22 h mit DMSO und 2 h mit 10 μM Imatinib, die zweite Population wurde für 24 h mit 10 μM Imatinib und die Kontrollpopulation wurde für 24 h mit DMSO behandelt. Für beide Versuchsansätze wurden die Zellen anschließend durch Zentrifugation geerntet, mit kaltem PBS gewaschen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

Die EOL-1 Zellen wurden ebenfalls unter den gleichen Medienbedingungen wie die K562-Zellen in 15 cm großen Petrischalen kultiviert. Nach 6 Zellverdopplungen in SILAC Medium wurden die Zellen mit Imatinib behandelt. Für den Versuchsaufbau inklusive Kinaseanreicherung wurden die EOL-1 Zellen entweder mit 10 nM oder 100 nM Imatinib und als Kontrolle mit DMSO behandelt. Bei der Analyse des kompletten Zelllysates wurde die erste Zellpopulation für 22 h mit DMSO und 2 h mit 10 μM Imatinib, die zweite Population wurde für 24 h mit 10 μM Imatinib und die Kontrollpopulation wurde für 24 h mit DMSO behandelt. Nach der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation, wurde ein Waschschriff mit 4°C kalten PBS durchgeführt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor die Zellpellets bei -80°C gelagert wurden.

3.8.2 Zellyse mit Tritron X-100

K562 und EOL-1 Zellen wurden lysiert, indem 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2,5 mM Na_3VO_4 , 50 ng/ml Calyculin A (Alexis Biochemicals, San Diego, USA), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin und 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma) für 1 h bei 4°C auf die Zellen einwirkte. Nach Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm) und Filtrieren durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 μm (Millipore), wurden die Konzentration der Proteine in einem BCA-Assay (Pierce) bestimmt.

3.8.3 Zellyse mit NP-40 und anti-pTyr Immunopräzipitation

Das detaillierte Protokoll für die Anreicherung der Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurde bereits ausführlich beschrieben (86). Kurz zusammengefasst wurden SILAC markierte K562 oder EOL-1 Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen und für 20 min mit Lyse-Puffer (50 mM Tris,

pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 0.1 % Natrium-Deoxycholate; 1 mM EDTA; 1 mM Natrium-Orthovanadat; 1 mM PMSF; 0.1 µg/ml Aprotinin; 10 mM NaF) lysiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde die Proteinmenge mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt und die drei verschieden markierten Populationen im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die anti-pTyr Immunopräzipitation wurden während der 2-stündigen Inkubation in NP40 Lyse-Puffe 200 µg 4G10-Antikörper an 40 µl Protein A-Sepharosebeads (Amersham Biosciences) gekuppelt. Nach einem Waschritt mit Lyse-Puffer wurden die pTyr-Beads für 4h zum Zelllysatsmix gegeben. Die Präzipitate wurden viermal gewaschen bevor die Proteine zweimal für 10 min bei 37°C mit Urea-Puffer (7 M; 2 M Thiourea; 50 mM HEPES pH 7.5; 1 % n-Octosylglucosid) von den Beads eluiert wurden.

3.8.4 Zellyse mit 8 M Urea

Für die Analyse des kompletten Zelllysats der SILAC markierten EOL-1 / K562-Zellen wurde die Lyse mit Urea-Puffer (50 mM Tris pH 8.2, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2.5 mM Na₃VO₄, 50 ng/ml Calyculin A (Alexis Biochemicals, San Diego, USA) inklusive der Phosphataseinhibitoren 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin und 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (v/v)) durchgeführt. Dabei wurden die Pellets im eisgekühlten Urea-Puffer gelöst und anschließend bei 4°C 3 x 1 Minute mit Ultraschall beschallt (Sonoplus GM70, Brandelin electronic, Berlin, Germany). Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden die Zellbruchstücke entfernt und die Proteinmenge mithilfe des BioRad Protein Assays bestimmt. Anschließend wurden die verschieden markierten Proteinpopulationen im gleichen Verhältnis gemischt.

3.9. Quantitative Vergleichsanalyse zur Bestimmung des Imatinib-Einflusses auf das Proteom

Für die vergleichende Analyse mit SILAC wurden drei verschiedene Zustände entweder unterschiedliche Konzentrationen oder unterschiedlicher Inkubationsintervalle bei hoher Konzentration von Imatinib mit dem Zustand der Kontrollinkubation mit DMSO verglichen. Dazu wurden die unterschiedlichen Zustände mit den isotopischen Varianten der Aminosäuren markiert.

3.9.1 Identifizierung von direkten Zielproteinen und Phosphorylierungsstellen mit einer Sensitivität für Imatinib mit dem Focus auf Kinasen

Es wurde die Auswirkung von verschiedenen Imatinibkonzentrationen besonders auf die Expression von Kinasen der Zelllinien untersucht. Die K562-Zellen wurden dazu mit den

Imatinibkonzentrationen 1 μM , 10 μM bzw. DMSO für 90 Minuten inkubiert, die EOL-1-Zellen wurden mit den Imatinibkonzentration 10 nM, 100 nM bzw. DMSO für 90 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation und einem Waschschrift mit kaltem PBS wurden die Pellets bei -80°C eingefroren.

Die Kinasen im Zelllysats wurden wie folgt angereichert: Die Kinaseinhibitor-Resins wurden nach einem bereits publizierten Protokoll hergestellt (87-89). Die Kinaseanreicherung wurde im Batchverfahren durchgeführt. Dazu wurden die Kinaseinhibitor-Resins gemischt und dabei von VI16832 und Purvalanol B Resins 0,5 ml eingesetzt sowie von Bisindolylmaleimide X, AX14596 und SU6668 Resins jeweils 0,33 ml eingesetzt.

Die eingefrorenen Zellpellets der K562 bzw. EOL-1 Populationen wurden in 9 ml Lyse-Puffer (50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2.5 mM Na_3VO_4 , 50 ng/ml Calyculin A (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 1% Phosphatase Inhibitor mix 1 und 2 (Sigma)) für 1 h bei 4°C lysiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min und Filtration durch einen 0,22 μm Millipore-Filter wurden Zellbruchstücke entfernt. Mit Hilfe des BCA-Assays wurde die Proteinkonzentration bestimmt und anschließend die NaCl Konzentration auf 1 M eingestellt und das Volumen der Lösung mit destilliertem Wasser auf 10 ml verdünnt. Die drei verschiedenen SILAC Populationen wurden parallel mit je 0,7 ml der Mischung der Kinaseinhibitor-Resins für 2 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml Lyse-Puffer (1 M NaCl) wurde anschließend mit 150 mM NaCl Lyse-Puffer gewaschen. Für die Elution der an den Resins gebundenen Proteine wurde mehrmals für 10 min mit 1,4 ml Elutions-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM DTT, 0,5% SDS) bei 50°C inkubiert. Zur Kontrolle der Proteinmenge in den einzelnen Elutionsfraktionen wurden jeweils kleine Aliquots auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit Hilfe der Silberfärbung visualisiert. Nur Fraktionen, die nachweislich Proteine enthielten, wurden gepoolt und lyophilisiert. Das anschließende Resuspendieren der Proben in destilliertem Wasser war die Vorbereitung auf die Wessel & Flügge Präzipitation (90) der Proteine.

3.9.2. Identifizierung von direkten Zielproteinen und Phosphorylierungsstellen mit einer Sensitivität für Imatinib mit Analyse des kompletten zellulären Lysats

Dazu wurden drei Populationen von Zellen unterschiedlich mit SILAC-Medium markiert und für 2 h bzw. 24 h mit 10 μM (K562-Zellen) bzw. mit 100 nM (EOL-1-Zellen) Imatinib inkubiert oder zur Kontrolle mit DMSO behandelt. Danach wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen, anschließend pelletiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Probenvorbereitung bei -80°C gelagert.

3.10 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

3.10.1 In-Lösungsverdau der Proteine

Die mit den Proteinkinasen angereicherten Proben wurden direkt in 7 M Urea-Puffer (7 M Urea; 2 M Thiourea; 50 mM HEPES pH 7.5; 1% n-Octosylglucosid) gelöst. Die Proben aus dem totalen Zellysate wurden direkt mit Urea-Puffer (wie oben beschrieben) lysiert. Bei beiden Ansätzen wurden mit Hilfe von 2 mM DTT (finale Konzentration) innerhalb von 45 min bei RT die Thiolgruppen an den Proteinen reduziert und nachfolgend die Cysteingruppen mit 5,5 mM IAA für 30 min bei RT carboxymethyliert. Die Endoproteinase Lys-C (Wako) wurde bei RT für 4 h im Verhältnis von 1 : 100 von Enzym zu Substrat (meistens betrug die Menge an Lys-C 1-3 µg) zugegeben. Danach wurde der Verdau für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 4 verdünnt, so dass die finale Urea-Konzentration unter 2 M lag. Anschließend erfolgte der Verdau mit Trypsin (Promega) über Nacht bei RT im Verhältnis Enzym zu Substrat von 1 : 100. Am folgenden Tag wurde Trifluoressigsäure (TFA) zu einem finalem Volumen von 1% zugegeben, um den Verdau zu stoppen.

3.10.2 In-Gel Verdau der Proteine

Die Proben wurden auf einem *SDS-NuPAGE Novex Bis-Tris Gel* (Invitrogen) aufgetragen und nach der Beschreibung des Herstellers aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen) gefärbt. Die angefärbten Spuren wurden für die Kinase-angereicherten Proben in 16 Stücke geschnitten, die Proben ohne Anreicherung wurden in 15 Stücke geteilt und nach dem beschriebenen Protokoll verdaut (91). Dazu wurden die Gelstücke in kleine Teile geschnitten und mit 50 mM Ammonium-Bicarbonat (ABC) / 50% Ethanol solange gewaschen bis die Stücke vollständig entfärbt waren. Darauf folgte das Dehydrieren der Stückchen mit Ethanol und das Rehydrieren mit 10 mM DTT enthaltenem 50 mM ABC-Puffer. Dadurch wurden die Thiolgruppen innerhalb 1 h bei 56°C reduziert und anschließend folgte der Alkylierungsschritt mit 55 mM IAA gelöst in 50 mM ABC im Dunklen für 1 h bei 25°C. Die Stückchen wurden wieder zweimal mit 50 mM ABC / 50% Ethanol gewaschen und anschließend mit Ethanol dehydriert und in dem Konzentrator 5301 (Eppendorf) vollständig getrocknet. Jede Gelfraktion wurde mit einer Lösung bestehend aus 50 mM ABC und Trypsin (1 : 100 wt/wt) rehydriert und über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurde der Überstand gesammelt und die restlichen Peptide in den Gelstückchen wurden durch zweimalige Inkubation in 30%-igem Acetonitril (ACN) und 3% TFA, extrahiert. Anschließend wurden die

Gelstücke zwei Mal mit 100% ACN dehydriert. Alle Überstände wurden vereinigt und anschließend im Konzentrator 5301 eingedampft, um alles ACN zu entfernen. Zur Entsalzung wurden die Proben über eine C₁₈-StageTip Säule (91-92) gefiltert. Nach der Elution wurden die Proben im Eppendorfer Konzentrator 5301 auf ein finales Volumen von 3-4 µl eingedampft. Für die MS-Analyse wurde jede Probe mit einer Lösung aus 1% TFA und 5% ACN 1 : 1 gemischt.

3.10.3 Entsalzung der Proben

Die in Lösung verdauten Proben wurden zuerst mit einer PVDF Membran der Porengröße von 0,22 µm (Millipore) filtriert und anschließend mit SepPak C₁₈-Entsalzungssäulen nach dem Protokoll von Villen und Gygi (93) entsalzt. Im Detail wurden die Säulen zuerst mit 100% ACN (2 x Säulenvolumen), mit Elutionspuffer (50% ACN, 0,5% Essigsäure; halbes Säulenvolumen) und Waschpuffer 2 (0,1% TFA; 2 x Säulenvolumen) gewaschen, bevor die Proben auf die Säulen geladen wurden. Dabei wiesen die Proben einen pH Wert von 2,5-3 auf. Anschließend wurden die Säulen nochmals mit Waschpuffer 2 (2 x Säulenvolumen) und 4 (0,5% Essigsäure; halbes Säulenvolumen) gewaschen, bevor die Proben mit Elutionspuffer eluiert wurden (500 mg Säulen: 2 x 1,4 ml; 100 mg Säulen: 2 x 300 µl). Um technische Replikate zu erhalten, wurde jede Fraktion in zwei gleichgroße Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.10.4 Phosphopeptidenanreicherung durch Titaniumdioxid-Microspheres

Diese Phosphoanreicherung wurde für den Kinase angereicherten Datensatz angewendet. Nach dem Trypsinverdau der Proben wurden die Phosphopeptide mithilfe der Titaniumdioxid-Microspheres (TiO₂, GL Sciences Inc.) wie es bereits beschrieben wurde angereichert (76, 94-95). Die Peptidproben wurden im Verhältnis 1 : 6 mit dem Puffer bestehend aus 30 g/l 2,5-Dihydrobenzoesäure (DHB), 80% ACN / 0,1% TFA verdünnt. Die TiO₂-Beads wurden einmal mit dem Elutions-Puffer (NH₃-Wasser, 20% ACN, pH10,5) und anschließend mit Wasch-Puffer (50% ACN, 0,1% TFA) equilibriert. Die Vorbereitung der TiO₂-Beads mit DHB erfolgte durch einen Waschschrift mit dem Ladungs-Puffer (6 g/l DHB, 15% ACN). Jede Peptidprobe wurde auf 5 µg equilibrierte TiO₂-Beads geladen und für 30-60 min bei RT auf einem rotierendem Rad inkubiert. Danach wurden die Beads drei Mal mit Wasch-Puffer gewaschen und anschließend die gebundenen Phosphopeptide mit Elutionspuffer zweimal für 10 Minuten unter ständigem schütteln bei RT eluiert. Die eluierten Peptide wurden nochmals mit Hilfe einer C₈-Membran gefiltert. Die Peptide, die an der C₈-Membran zurück geblieben waren, wurden mit 30 µl 80% ACN / 0,5% Essigsäure eluiert und mit den gefilterten Peptidproben vereint. Mit der Zugabe von TFA wurde der pH Wert auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurden die Proben im

Konzentrator auf ein Volumen von 3-4 µl eingedampft und für die MS-Analyse mit einer Lösung aus 4% ACN und 0,2% TFA im Verhältnis 1:1 vermischt.

3.10.5 Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) zur Phosphopeptidanreicherung

Diese Phosphoanreicherung wurde für die Proben zur Analyse des kompletten Zellysats angewendet. Die lyophilisierten Proben wurden in 200 µl 40% ACN (vol/vol), 25 mM Ameisensäure gelöst und mit 2,5 µl *phos-Select Iron Affinity Gel* (Sigma), die die *Immobilized metal affinity chromatography* (IMAC)-Resins enthalten, für 1h bei 25°C in einem Thermomixer *comfort* (Eppendorf) bei 1.400 rpm inkubiert. Die C₁₈-StageTips wurden nach der Anleitung von Rappsilber et al. (92) hergestellt und nach dem Protokoll von Villen & Gygi (93) vorbereitet. Die eluierten Peptide wurden auf ein Volumen von 4 µl eingedampft und mit 4% ACN (vol/vol), 0,2% TFA (vol/vol) im Verhältnis 1:1 vermischt und waren somit für die MS-Analyse vorbereitet.

3.10.6 Auftrennung der Phosphopeptide mit der Strong Cation Exchange (SCX) Chromatographie (Resource S column)

Die SCX-Chromatographie wurde nach zwei bereits publizierten Protokollen durchgeführt (65, 96). SILAC markierte Proteine wurden mit Trypsin in Lösung verdaut. Anschließend wurde das Peptidgemisch mit destilliertem Wasser verdünnt, um eine Leitfähigkeit unter 4 mS / cm zu erreichen. Nun war die Probe bereit, um sie in einen 50 ml großen Superloop™ (Amersham Biosciences) einzufüllen und mit einer Flussrate von 1 ml / min auf eine 1 ml Resource S Säule (Amersham Biosciences) zu laden, die in einem *Äkta Explorer System* (GE Healthcare) mit einem Fraktionssammler integriert war. Durch den linearen Gradienten von 100% Puffer A (30% ACN, 5 mM KH₂PO₄, pH 2.7) zu 60% Puffer B (30% ACN, 5 mM KH₂PO₄, 350 mM KCl, pH 2.7) mit einer Flussrate von 1 ml / min bis zum Erreichen des 30-fachen des Säulenvolumen, wurden die Phosphopeptide aufgetrennt. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer Absorbtionsspektren gepoolt, so dass pro Chromatographielauf final 7 Proben entstanden. Diese wurden anschließend in einem Konzentrator 5301 (Eppendorf) eingedampft und die Phosphopeptide mit TiO₂-Microspheres weiter angereichert.

3.10.7 Auftrennung der Phosphopeptide mit der Strong Cation Exchange Chromatographie (polySULFOETHYL A column)

Lyophilisierte Peptide wurden in 600 µl Puffer (30% ACN (vol / vol), 7 mM KH_2PO_4 , pH 2,65) gelöst und auf eine polySULFOETHYL A Säule (250 x 9,4 mm, 200Å Porengröße, 5 mm Partikelgröße (PolyLC)) mit einer Flussrate von 3 ml / min geladen, die an ein *Äkta Explorer System* (GE Healthcare) angeschlossen war. Der Gradient verlief von 0 bis 105 mM KCl über 33 min, anschließend folgte für jeweils 10 min ein Elutionsschritt mit 350 mM KCl und 500 mM NaCl. Über den Gradienten wurden 3 ml Fraktionen gesammelt. Zusammen mit dem Durchfluss wurden die Fraktionen entsprechend dem Absorptionsspektrum bei 215 nm gepoolt, sodass 12 Proben entstanden. Diese wurden im Konzentrator 5301 eingedampft und mit Hilfe der 100 mg reverse-Phase *C₁₈-SepPak solid-phase extraction cartridges* (Waters) entsalzt. Anschließend wurden pro Probe zwei Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren, lyophilisiert und bei -20°C bis zur Phosphopeptidanreicherung mit dem IMAC-Protokoll gelagert.

3.10.8 Probenvorbereitung zur Identifizierung von Kinasen mit einer Sensitivität für Imatinib

Die Proteinmenge nach der Kinaseanreicherung wurde aufgeteilt und parallel prozessiert. Davon wurden 25% in Lösung verdaut und anschließend mit SCX-Chromatographie (ResourceS column) fraktioniert. Die verbliebenen 75% wurden in 1,5 x LDS-Puffer gelöst und im Gel verdaut. Davon wurden wiederum 20% für die Methode der C₁₈-StageTips verwendet. In den restlichen 80% wurden die Phosphopeptide mit TiO₂-Beads angereichert. Der gesamte Prozess wurde unabhängig voneinander zwei Mal durchgeführt.

3.10.9. Probenvorbereitung zur Identifizierung von Imatinib-sensitiven Proteinen

Die Proben zur Analyse des kompletten Datensatzes ohne Anreicherung eines Subproteoms wurden nach der Lyse und der Proteinbestimmung gepoolt. Für die Probenvorbereitung wurde die Proteinmenge aufgeteilt, etwa 5% im Gel verdaut und anschließend für StageTips vorbereitet. Die restlichen 95% wurden erst in Lösung verdaut, dann über SCX-Chromatographie fraktioniert und Phosphopeptide mit der IMAC-Methode angereichert. Diese Probenvorbereitung wurde insgesamt dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

3.11. MS-Analyse und Datenprozessierung

3.11.1 MS-Analyse mit der LTQ-Orbitrap

Die MS-Analyse folgte einem bereits publizierten Protokoll (76, 87). Für die Peptidauftrennung wurde eine Säule mit 15 cm Länge, 75 µm innerem Durchmesser und mit 3 µm C₁₈ Beads gefüllt (intern hergestellt, Reprosil-AQ Pur, Dr. Maisch), verwendet. Die dazugehörige Chromatographie erfolgte mit einem Nanoflow HPLC System (Agilent Technologies 1100), das an ein LTQ-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) mit einer Nanoelektrospray Ion Source (Proxeon Biosystems) angeschlossen war. Für die Messungen wurde die Orbitrap so programmiert, dass sie automatisch zwischen einem Full-MS-Scan mit dem Orbitrap Analyser (Auflösung R=60.000 bei m/z 400) und der Fragmentierung der fünf Peptide mit der stärksten Intensität entweder durch den MS/MS oder mit dem *multi-stage activation* Bereich, der LTQ wechselte. Der Multistage-Bereich wurde durch den Neutralverlust der Peptide bei 97,97; 48,99 oder 32,66 m/z unter dem Vorläuferion für 30 ms getriggert (97). Es ist noch anzumerken, dass für die Analyse des Totalzelllysats die 10 intensivsten Peptide zur Fragmentierung und MS/MS Analyse verwendet wurden. Wie bei Olsen *et al.* (98) beschrieben wurde, wurde zur internen Kalibrierung des Orbitrap-Detektors die Lock-Mass Strategie verwendet.

3.11.2 Peptididentifikation und Quantifikation mit MaxQuant

Alle Daten wurden mit MaxQuant prozessiert (<http://www.maxquant.org/>).

Alle MS-Raw Dateien die zu einem Experiment gehörten, wurden zusammen mit dem MaxQuant Programm der Version 1.0.13.12 prozessiert. Die Prozessierung mit MaxQuant enthält eine Signalliste (peak list), eine auf SILAC beruhende Quantifizierung, eine Abschätzung der durch Zufall identifizierten Peptide (False discovery rate; FDR), ein Zusammenfügen der Protein Gruppen durch Peptide, Filtern und die Präsentation der Daten (74). Die Daten wurden gegen eine Datenbank abgeglichen, die eine Kombination aus der vorwärts und rückwärts gelesenen Version der IPI (International Protein Index) Datenbank aufweist. Die hier verwendete Version 3.37 enthielt 69141 Proteineinträge und 175 der am häufigsten vorkommenden Kontaminationen (z.B. suidisches Trypsin, humanes Keratin und Lys-C) und wurde mit der Suchmaschine Mascot (Matrix Science, Version 2.2.04) verwendet. Weitere Einstellungen waren die unveränderliche Modifikation Cysteincarbamidomethylierung und variable Modifikationen wie oxidiertes Methionin, N-Acetylierung der Proteine, Verlust des Ammoniumhydroxid vom N-terminalem Glutamin und die Phosphorylierung der Serin-, Threonin- und Tyrosinreste. Spektren die aus den isotopisch markierten Peptiden bestanden, wie sie durch die Analyse von SILAC Partnern entstanden, wurden mit der unveränderlichen Modifikation Arg⁶ und Lys⁴ oder

Arg¹⁰ und Lys⁸ gesucht. Konnten nicht alle SILAC-Zustände identifiziert werden, wurden Arg⁶ und Lys⁴ oder Arg¹⁰ und Lys⁸ als variable Modifikation zugelassen. Für die Vorläuferionen wurde eine Massentoleranz bis 5 ppm und für die fragmentierten Ionen bis zu 0,5 Da zugelassen. Die Peptide mussten eine Mindestlänge von sechs Aminosäuren aufweisen und es waren bis zu drei ungetrennte Spaltstellen (missed cleavages sites) und drei Isotopen-markierte Aminosäuren erlaubt. Die FDR wurde auf 1% für die Protein- und Peptidentifikation gesetzt und der Grenzwert für die Falschpositivrate (PEP: posterior error probability) der Peptide wurde auf 10% festgelegt. Die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen wurde durch eine modifizierte Version des PTM-Scoring Algorithmus (76) die in MaxQuant implementiert wurde, erreicht. Dadurch wurden Klasse I Phosphorylierungsstellen durch ihre Lokalisierungswahrscheinlichkeit von mindestens 75% definiert.

3.11.3 Gene Ontology Analyse

Zur Kategorisierung der Daten wurde das bioinformatische Programm *Gene Ontology* im onlinetool *DAVID* angewendet. Mit diesem Programm kann man die identifizierten Proteine in biologische Prozesse, molekularen Funktionen oder zelluläre Komponenten einteilen. Dabei wurden die identifizierten Proteine mit dem kompletten Proteom verglichen, um statistisch überrepräsentierte Proteine in den einzelnen Kategorien zu erkennen (99).

3.12. Transfektionsanalyse mit K562-Zellen

Die K562-Zellen wurden 24h vor der Transfektion mit einer Konzentration von 100.000 Zellen / ml ausgesät. Für die Transfektion wurden in ein 24-well 200.000 Zellen in 100 µl Komplettmedium ausgesät und im Brutschrank bereitgestellt. Von der siRNA, der Stockkonzentration 2 µM, wurde 5,4 µl in 100 µl Medium ohne Serum mit 8 µl *HiPerfect*-Transfection-Reagent (Qiagen) für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung langsam auf die Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h wurden 400 µl Komplettmedium auf die Suspension gegeben.

3.13. Assay zum Test auf Apoptose

Im Durchflusszytometer wird bei jeder Zelle gemessen wie viel Licht die Zelle absorbiert und reflektiert und welche Fluoreszenz sie emittiert. Da Propidiumiodid ein fluoreszierender Farbstoff ist der an Nukleinsäure bindet, kann somit der DNA-Gehalt einer Zelle berechnet werden. Da in einer normalen Zelle der DNA-Gehalt durch die Anzahl der Chromosomen

bestimmt wird, liegen in der ruhenden Zelle 46 Chromosomen vor, in proliferierenden Zellen verdoppelt sich die chromosomale DNA. Mit interkalierenden Farbstoffen ist somit die Fluoreszenz einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt und somit kann indirekt der Zellzyklusstatus bestimmt werden. Bei apoptotischen Zellen wird die DNA jedoch zu kleinen Bruchstücken von 180 Basenpaare abgebaut, zusätzlich wird der Zellkern fragmentiert und in die Zelle freigesetzt. Dadurch ist der DNA-Gehalt einer apoptotischen Zelle geringer als bei einer gesunden Zelle und ist als Peak unterhalb der G1-Zellen sichtbar. Die DNA Färbung kann somit auch dazu benutzt werden, um Apoptose in einer Zellpopulation zu quantifizieren (100).

Für den Test auf Apoptose wurden mindestens 500.000 Zellen aliquotiert und für 5 min bei 2.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl hypotonischer Propidiumiodid-Lösung (0,1% Natriumzitrat (wt/v), 0,1% Triton X-100 (v/v), 50 mg/l Propidiumiodid in destilliertem Wasser) resuspendiert. Die Proben wurden im Dunkeln für 1h bei 4°C inkubiert. Bei der Messung an einem FacsCalibur (BD Biosciences) Durchflusscytometer (FACS: Fluorescence - Activated Cell Sorting) wurden die Einstellungen mit Hilfe des WorklistManager (Beckton Dickinson) vorgenommen. Mit dem Computerprogramm CellQuest Pro (BD Biosciences) wurden die Daten ausgewertet und der prozentuale Anteil der apoptotischen Kerne bestimmt. Gemessen wurde im roten Fluoreszenzbereich (>600 nm).

3.14. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (sq RT-PCR)

3.14.1 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA wurde das Kit *RNeasy* von Qiagen laut Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde mit H₂O bidest. eluiert.

3.14.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde in einem Spektralphotometer (Thermo Scientific Nanodrop) bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm durchgeführt. Zum notwendigen Nullausgleich wurde H₂O bidest. als Referenz verwendet, in dem die RNA resuspendiert wurde.

3.14.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurde ein *Oligo-dT-Primer*, der an das 3'-Ende von mRNA bindet (K1, Clontech Inc., USA) und ein *SMART-Primer* (K2, Clontech Inc., USA), der an die 5'-terminale CAP-Struktur von mRNA bindet, verwendet. Es wurden jeweils 5 µg der totalRNA eingesetzt und es erfolgte nur die Synthese des RNA komplementären DNA-Stranges. Die RT-PCR wurde wie folgt

3. Material und Methoden

angesetzt: Von der extrahierten RNA wurden 5 µg RNA eingesetzt. Es wurden 1,0 µl Primer K1 und 0,5 µl Primer K2 hinzugegeben und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Für 2 min erfolgte eine Inkubation bei 68°C, anschließend wurde die Probe für 10 sek auf Eis abgekühlt. Danach wurde 4,0 µl 5x RT Puffer, 2,0 µl 10 mM dNTPs und 2,0 µl AMV-RT zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 10 min und dann bei 42°C für 60 min.

Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt. Vor der weiteren Verwendung wurde die DNA-Menge nochmals im Spektralphotometer (Thermo Scientific Nanodrop) bestimmt. Zur Quantifizierung des Expressionslevels einzelner Gene können Fragmente eines Gens aus der cDNA mittels PCR vervielfältigt und das Produkt quantifiziert werden. Diese Methode wurde zur Bestimmung der Effizienz von Knock-Down-Experimenten mit cDNA, die aus siRNA transfizierten Zellen gewonnen wurde, angewendet. Bei semiquantitativer PCR zur Bestimmung des relativen Expressionslevels muss berücksichtigt werden, dass sich die Amplifizierungsreaktion zum Zeitpunkt der Messung in einer linearen Phase befindet. Dies wurde durch Parallelansätze erreicht, deren Reaktion nach unterschiedlichen Zyklusanzahlen abgestoppt wurde. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte nach Auftrennung im Agarosegel (1,5 %), die Aufnahme mittels einer CCD-Kamera (LAS-1000, Fujifilm) und die Auswertung der Banden mit der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Alle Reaktionen wurden dabei in Duplikaten durchgeführt und gemittelt. Zur Normalisierung der zu vergleichenden cDNA-Proben wurde ein Fragment des housekeeping-Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) vervielfältigt und die cDNAs so verdünnt, dass bei gleicher Zyklusanzahl die gleiche Menge an PCR-Produkt entstand. Die Quantifizierung des zu untersuchenden Gens wurde mit den normalisierten cDNAs durchgeführt. Dabei wurde erneut für diese PCR-Reaktion die lineare Phase der Amplifikation durch Parallelansätze mit verschiedener Zyklusanzahl bestimmt. Es wurden folgende Primer, erstellt mit Hilfe der Software *PrimerSelect* aus dem Software-Paket *DNASar*, verwendet, die jeweils ein Produkt von ca. 300bp vervielfältigen:

Gene:	Upper Primer (5->3)	Lower Primer (5->3)
BTK	ACATTTGGGCTTTTGGGGTTTTG	AGAGGGGCCTTTTTGTATTGAGTG
FER	ACGCTGCTGCTGGTATGTTGT	ACTTAGGGCGATTTTCAGGTTTAT
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Der Reaktionsansatz (je 10 µl) für die PCR war folgender: Es wurde pro Ansatz 5 µl *ReadyMix redtaq PCR reaction mix with MgCL₂* mit 1 µl Upper Primer und 1 µl Lower Primer als Mastermix angesetzt und erst kurz vor der PCR-Reaktion pro Ansatz 3 µl DNA hinzugegeben. Die PCR wurden in einem Thermocycler *Mastercycler EP gradient S* von Eppendorf durchgeführt: Die Denaturierung erfolgte bei 94°C für 3 min, anschließend erfolgte die Amplifikation (30 sek 94°C, 1 min 55°C, 30 sek 72°C). Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt.

3. Material und Methoden

Es wurden je nach amplifiziertem Gen unterschiedlich viele Zyklen der Amplifikation gefahren und die Parallelproben im Abstand von 2 Zyklen abgestoppt (z.B. nach 23, 25 und 27 Zyklen). Für die Quantifizierung von GAPDH wurden 17, 19 und 21 Zyklen gefahren.

4. Ergebnisse

Proteinkinasen sind wichtige Regulatoren in den meisten Signalkaskaden eukaryotischer Zellen. Sie ändern die Funktion ihrer Substratproteine durch reversible Phosphorylierungen an den Serinen, Threoninen oder Tyrosinen. Durch ihre Beteiligung an vielen wichtigen biologischen Prozessen sind Überexpression oder eine veränderte Aktivität der Kinasen oftmals ursächlich für die Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Krebs. Daher wurden bei der Entwicklung von neuen Medikamenten Proteinkinasen als potentielle Wirkstoffziele anvisiert.

Im ersten Projekt der Arbeit wurde der Einfluss des BCR-ABL Inhibitors Imatinib (Glivec/Gleevec) auf die Kinasen der Zelle untersucht. Hierbei wurden die Kinasen vor der eigentlichen Probenvorbereitung im Batchverfahren mit niedermolekularen Kinaseinhibitoren, die an Resins gekoppelt waren, angereichert, um die Mengen gebundener Kinasen nach der Inhibitorbehandlung in Kompetitionsassays untersuchen zu können. Dadurch wurden sowohl bekannte aber auch noch unbekannte Zielproteine von Imatinib identifiziert. Diese Versuche wurden in zwei verschiedenen Leukämiezelllinien durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Fokus auf das komplette Proteom gelegt, um von Imatinib beeinflusste Signalübertragungsvorgänge global zu analysieren. Hierzu wurde das komplette Zelllysate zur Probenvorbereitung genutzt ohne speziell Kinasen anzureichern. Dieser Ansatz wurde ebenfalls mit zwei verschiedenen Leukämiezelllinien durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser beiden Projekte zusammen ergeben einen guten Überblick der direkten zellulären Effekte von Imatinib sowie die von dem Wirkstoff regulierten Signalwege.

4.1. Identifizierung von direkten und indirekten zellulären Imatinib-Bindungspartnern

Durch fehlregulierte Proteinkinasen wird eine Reihe von Krankheiten wie z.B. Krebs ausgelöst. Daher ist das Ziel der therapeutischen Forschung die Aktivität fehlregulierter Kinasen zu inhibieren (101). Betrachtet man die chronische myeloische Leukämie (CML) wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem exprimierten Fusionsprotein BCR-ABL und dem Auftreten der multiklonalen leukämischen Vorläuferzellen festgestellt (102). Es konnte der sehr effektive Inhibitor Imatinib entwickelt werden, der die Kinaseaktivität von BCR-ABL inhibiert und somit eine hohe Überlebenschance für Patienten mit CML in der chronischen Phase ermöglicht (103-104). In späteren Phasen dieser Krankheit oder im Verlauf der jahrelangen Einnahme des Inhibitors verliert Imatinib oftmals seine Wirkung, weil sich Resistenzen

ausbilden (105-106). Daher ist es nötig, sich detailliert mit den Signalkaskaden, die von Imatinib beeinflusst werden, auseinander zu setzen, um alle zellulären Bindungspartner und weitere wichtige Komponenten in Imatinib-regulierten Signalkaskaden zu identifizieren. Die Hoffnung hierbei liegt in der Aufdeckung neuer Kandidaten als alternative Zielmoleküle für therapeutische Maßnahmen für den Fall, dass Imatinib aufgrund von desensitisierenden Mutationen in BCR-ABL seine Wirksamkeit einbüßt.

4.1.1. Konzentrationsbestimmung für die Imatinibbehandlung in der Leukämiezelllinie K562

Die Wahl der Imatinibkonzentrationen können die Ergebnisse beeinflussen. Daher wurden mehrere Konzentrationen von Imatinib getestet (0,1 μM ; 0,3 μM ; 1 μM ; 3 μM ; 10 μM) und mit der Kontrollinkubation von DMSO verglichen. Die Zellen wurden lysiert und mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ziel war es, möglichst alle BCR-ABL-vermittelten Phosphorylierungsaktivitäten in K562 Zellen zu unterbinden. Zur Kontrolle wurden aktivierende Phosphorylierungen der *extracellular-signal regulated kinases* (ERK) 1 und 2, zentrale Mediatoren von BCR-ABL-vermittelter Zellproliferation, sowie generell zelluläre Tyrosinphosphorylierung im Westernblot betrachtet.

Die Inhibierung mit der Imatinibkonzentration von 1 μM hatte auf die allgemeine Tyrosinphosphorylierung in K562 Zellen eine Reduktion auf die Hälfte zur Folge (s. Abb. 5), geringere Konzentrationen zeigten kaum einen Effekt. Bei der Imatinibkonzentration von 10 μM wurde die Signalübermittlung auf der Ebene der Tyrosinphosphorylierung nahezu vollständig unterbunden.

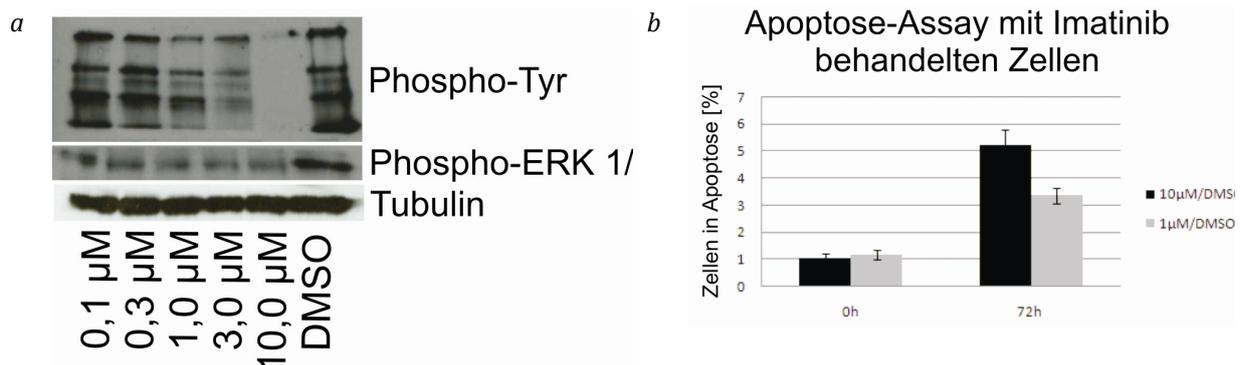


Abb. 5: Bestimmung der Imatinibkonzentration für K562 Zellen. (a) Unterschiedliche Konzentrationen von Imatinib wurden für 90 min zu verschiedenen Zellpopulationen gegeben bevor diese lysiert wurden. Die Phosphorylierungslevel von Tyrosinresten und Erk1/2 wurden mittels Westernblot analysiert. Dabei wurde mit wachsender Imatinibkonzentration eine Reduzierung der Phosphorylierung festgestellt. Im Westernblot ist ersichtlich, dass die Konzentration von 1 μM die Tyrosinphosphorylierung zur Hälfte und 10 μM diese nahezu komplett inhibiert. (b) Dies spiegelt sich auch in der Apoptoserate wieder, die bei 10 μM Imatinib deutlich höher ist als bei 1 μM Imatinib.

Zur weiteren biologischen Validierung wurde der Einfluss dieser beiden Imatinibkonzentrationen auf das Apoptoseverhalten der Zellen getestet. Dazu wurden Zellpopulationen entweder mit 1 μM Imatinib, 10 μM Imatinib oder mit DMSO inkubiert. Zum Test auf Apoptose wurden die behandelten Zellen abzentrifugiert, für eine Stunde mit Propidiumjodid inkubiert und mit Hilfe der FACS-Analyse die apoptotischen Zellen gezählt. Dort zeigte sich, dass die Apoptoserate bei Behandlung der Zellen für 72h mit Imatinib in beiden Fällen im Vergleich zu den Kontrollzellen, erhöht war und zwar um das Dreifache bei 1 μM bzw. das Fünffache bei 10 μM . Das heißt, die Apoptoserate war nochmal um 40% höher bei Behandlung mit 10 μM Imatinib verglichen zu der Zellpopulation, die mit 1 μM Imatinib behandelt wurde. Diese beiden Imatinibkonzentration wurden für die großangelegte proteomische Analyse gewählt, um einen Einblick in die bekannten und noch nicht beschriebenen Bindungsproteine von Imatinib und die Auswirkung von Imatinib auf die Signalwege der Zelle zu identifizieren.

4.1.2. Kinaseanreicherung im Batchverfahren (K562 Zelllinie)

In Vorversuchen wurden zwei verschiedene Ansätze zur Kinaseanreicherung miteinander verglichen. Zum einen wurde ein Multisäulenansatz mit verschiedenen Inhibitoren für die säulenchromatographische ÄKTA-Auftrennung und zum anderen die direkte Inkubation des Lysates mit den immobilisierten Inhibitoren (Batch-Verfahren) durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Inhibitoren VI16832, Purvalanol B, Bisindolylmaleimide X, AX14596 und SU6668 im gleichen Verhältnis eingesetzt (82). Diese niedermolekularen Inhibitoren weisen breite, überlappende Kinaseselektivitäten auf, so dass sie zusammen ca. 70% aller zellulär vorhandenen Proteinkinasen binden können. Aus früheren Versuchen, welche in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden waren, ging hervor dass das Batch-Verfahren für die Identifizierung direkter Bindungsproteine von Imatinib das geeignetere ist. Daher wurde ein Protokoll für die Batch-Methode etabliert, in dem Zelllysate von unterschiedlich Imatinib-behandelten Zellen parallel im Batch-Ansatz inkubiert wurden, um Kinasen anzureichern.

Für den kompletten Versuchsansatz haben wir drei K562-Zellpopulation für fünf Zellteilungen im SILAC-Medium auf 15 cm Petrischalen wachsen lassen, um sie dann anschließend für zwei weitere Teilungen in einen Kolben mit Magnetrührer (spinner flask) zu überführen. Nun waren die Zellen vollständig markiert und konnten für 90 min entweder mit 1 μM oder 10 μM Imatinib sowie als Kontrolle mit DMSO behandelt werden. Nach anschließendem Zentrifugieren und Waschen mit PBS wurden die Pellets aliquotiert, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nach der Lyse und der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde alle drei verschiedenen markierten Zellpopulationen auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt und für die Proteinkinase-Aufreinigung mit dem jeweils gleichen Gemisch aus immobilisierten Inhibitoren inkubiert. Nach 4h Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben gewaschen und gebundenes Protein in mehreren Elutionsschritten eluiert. Kleine Proben der Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels einer Silberfärbung auf Proteingehalt hin untersucht. Alle Fraktionen, die nachweislich Proteine enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und nach dem Protokoll von Wessel und Flügge (90) präzipitiert. Etwa ein Viertel der Proteine wurde in Lösung verdaut und über die SCX-Chromatographie in sieben Fraktionen aufgeteilt (s. Abb. 6). Der große Rest wurde auf ein eindimensionales Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Banden mit Coloidal Blue-Lösung (Invitrogen) wurde das Gel in 16 Molekulargewichts-Regionen geschnitten; dabei orientierte sich die Einteilung nach der jeweiligen Intensität der Proteine. Die Proteine wurden im Gel verdaut und die so generierten Peptide anschließend extrahiert. Sowohl 20% der Fraktion aus dem Lösungsverdau als auch 20% der Fraktion aus dem Gelverdau wurden über die C₁₈-StageTips entsalzt und aufgereinigt (92). Die übrigen Peptide wurden mit Hilfe der TiO₂-Beads auf Phosphopeptide angereichert (94-95). Dabei wurden die Fraktionen aus dem Gel auf acht Proben reduziert, indem jeweils zwei aufeinanderfolgende Proben zu einer vereint wurden. Alle Proben wurden mittels LC-MS/MS-Methode in der LTQ-Orbitrap analysiert. Mit Hilfe des Softwareprogramms MaxQuant in Verbindung mit dem Suchalgorithmus MASCOT wurden die aus der MS resultierten Rohdaten prozessiert, um die Peptide und die ihnen entsprechenden Proteine zu identifizieren und quantifizieren (107).

4. Ergebnisse

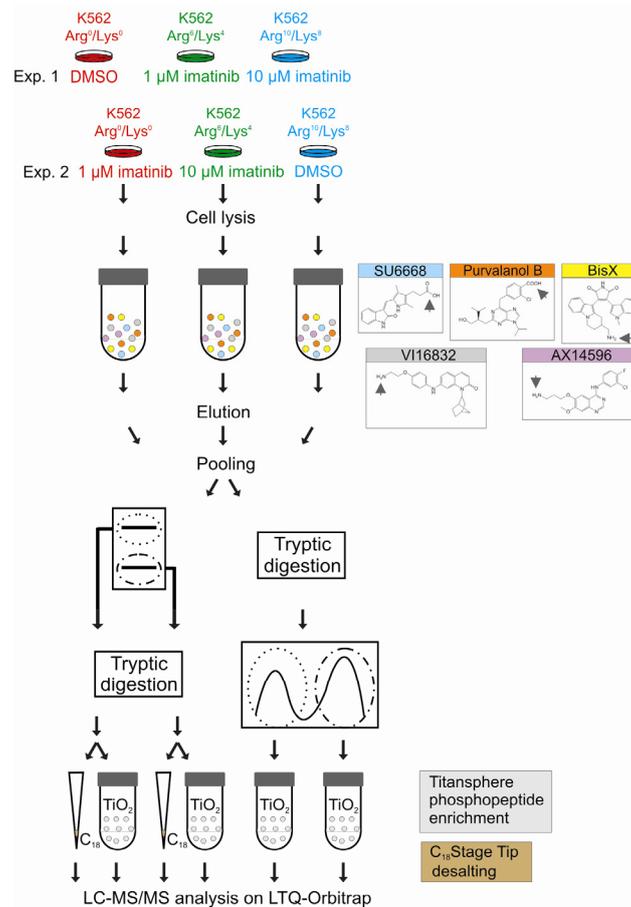


Abb. 6: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung. Drei Zellpopulationen der K562 CML Zelllinie wurden mit der SILAC-Methode entweder mit normalen oder isotonenmarkierten Versionen von Arginin und Lysin markiert und vor der Lyse entweder mit 1 µM Imatinib, 10 µM Imatinib oder DMSO behandelt. Dieser Ansatz wurde in zwei unabhängigen biologischen Replikaten mit unterschiedlichen SILAC Schemata durchgeführt. In beiden Experimenten wurde jedes der drei Lysate separat im Batch-Verfahren mit fünf immobilisierten Kinase-Inhibitoren aufgereinigt. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und vereinigt. Anschließend wurden Fraktionen des angereicherten Materials aufgetrennt: entweder über die SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Trypsinverdau oder über die SCX-Chromatographie mit vorangegangenem Trypsinverdau. Darauf folgt die Phosphopeptidanreicherung über Titaniumdioxid-Beads. Von allen Peptidfraktionen wurden C₁₈-Stage Tips von entsalzten Totalpeptidproben angefertigt. Alle Proben wurden mit der LC-MS/MS-Methode an der LTQ-Orbitrap analysiert.

Dieses Experiment wurde mit den gleichen Bedingungen aber modifizierter Isotopenmarkierung wiederholt. Ziel dieses Ansatzes war es Kinaseinhibitor-bindende Proteine zu identifizieren, die Teil der Signalkaskade der Imatinib-inhibierten Kinasen sind und deswegen ein reduziertes Phosphorylierungslevel aufweisen ohne aber auf Proteinebene eine Veränderung aufzuweisen. Zudem sollten direkte Bindungspartner von Imatinib aufgrund reduzierter Bindung nach zellulärer Imatinibbehandlung identifiziert werden.

4.1.2.1. Quantitative Analyse des K562 Datensatzes mit Kinaseinhibitoranreicherung

Insgesamt konnten über 2000 Proteine identifiziert werden, wobei die Filterkriterien so gewählt waren, dass die geschätzte *false-discovery rate* (FDR) unter 1% lag. Es konnte für 1275

verschiedene Proteine die relative Bindung aus Imatinib zu kontrollbehandelten K562 Zellen quantitativ bestimmt werden. Davon waren für 683 Proteine unabhängige Quantifizierungen in beiden biologischen Replikaten möglich. Durch die Kinaseaufreinigung gelang es mehr als 170 Mitglieder der Kinase-Superfamilie zu quantifizieren, was eine erhebliche Anreicherung bedeutet wenn man bedenkt, dass nur 1,7% des menschlichen Genoms Proteinkinasen codieren. Neben Kinasen wurden durch die Anreicherung mit immobilisierten Kinaseinhibitoren auch andere Proteine angereichert, deren Bindung vermutlich auf direkte Inhibitorinteraktionen zurückzuführen waren. Dazu gehören z.B. Enzyme, die andere Nukleotide verwenden, wie Dehydrogenasen und Lipidkinasen.

Insgesamt konnten 13500 Phosphopeptide quantifiziert werden, in welchen, 1842 verschiedene Phosphorylierungen mit hoher Sicherheit spezifischen Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten zugeordnet werden konnten (sogenannte Klasse I Phosphorylierungsstellen mit einer Lokalisierungswahrscheinlichkeit von über 75%). Davon gab es 898 Klasse I Stellen, die in beiden biologischen Replikaten gefunden wurden und 504 von diesen wurden an Proteinkinasen nachgewiesen. Fasst man beide Experimente zusammen, so konnte man 868 verschiedene Phosphorylierungen an Proteinkinasen in den K562 Zellen quantifizieren. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Experimenten von Bantscheff et al., so wurden mit unserem Ansatz dreimal mehr Phosphorylierungsstellen an Proteinkinasen identifiziert (80). Für 23% aller Proteine konnten sowohl Phosphorylierungsänderungen als auch Proteinabundanzen quantifiziert werden. Erwähnenswert ist, dass dieser Anteil im Subproteom der Proteinkinasen mit 64% deutlich höher ausfiel. Die meisten Phosphorylierungen (81%) wurden an Serinen identifiziert; Threonin- und Tyrosinphosphorylierungsstellen hatten eine Häufigkeit von 13% und 6%.

Außerdem wurde erwartet, dass in der MS-Analyse auch zelluläre Interaktionspartner der direkten Inhibitorbindungspartner identifiziert werden, die während der Zellyse und Aufreinigungsschritte gebunden blieben. Um das nachzuweisen und die globalen Verbindungen innerhalb der aufgereinigten Proteine aufzuzeigen, wurde das Programm STRING verwendet. STRING ist ein Algorithmus, der auf der Basis von bekannten und prognostizierten Interaktionen Proteine in Proteinnetzwerken visualisiert. Hierbei können die Informationen zu den jeweiligen Interaktionen verschiedenen Ursprungs sein, wobei für die Analysen in dieser Arbeit ausschließlich Interaktionsdaten aus Hochdurchsatz-Experimenten oder zielgerichteten Interaktionsstudien herangezogen wurden (108). Für diese Analyse wurden hier jene 900 Proteine aus dem Gesamtdatensatz verwendet, die in beiden biologischen Wiederholungsexperimenten quantifiziert wurden. Hiervon konnte STRING 489 Proteine in ein komplexes Netzwerk einbeziehen. Zusätzlich wurde die Information integriert, ob es sich bei den jeweiligen Proteinen um Phosphoproteine und Proteinkinasen handelt. Die Verbindungen

zwischen den Proteinen waren durch mehr als 3400 einzelne Interaktionen gekennzeichnet. Bei der Kontrollanalyse einer gleichen Anzahl an zufällig ausgewählten Proteinen aus der verwendeten Proteindatenbank wurden zwanzigmal weniger Interaktionen gefunden. Dies deutet auf eine hohe Interaktionsrate bei den mittels Kinaseinhibitoren isolierten Proteinen hin, was zum Teil auf die Identifizierung vieler Proteine zurückzuführen ist, die mit Proteinkinasen interagieren, wie z.B. Cycline, Proteine mit SH2-Domänen sowie zahlreiche weitere regulatorische Untereinheiten von Proteinkinasen. Des Weiteren wurden viele Proteine identifiziert, die wichtige Komponenten von Prozessen wie z.B. Translation, RNA Prozessierung und proteosomale Proteindegradation sind. Diese Proteine sind möglicherweise nicht aufgrund spezifischer Bindung zu den immobilisierten Inhibitoren aufgereinigt worden, sondern könnten auch aufgrund von z. B. unspezifischer Bindung höher molekularer Komplexe bei der Affinitätsaufreinigung detektiert worden sein. Trotzdem sind sie im Vergleich zu unfraktioniertem Lysat deutlich überrepräsentiert und ihre präferentielle Detektion könnte ein Nebeneffekt des Versuchsansatz sein.

4.1.2.2. Identifizierung der Bindungspartner von Imatinib

Mit dem hier beschriebenen Versuchsansatz können u.a. all jene Proteine identifiziert werden, die eine verminderte Bindung an die Resins nach zellulärer Behandlung mit Imatinib aufweisen. Dies ist für Proteine zu erwarten, die entweder direkt an Imatinib binden oder mit diesen direkten Bindungspartnern interagieren. Um falschpositive Daten auszuschließen wurde nach Proteinen gefiltert, die in beiden unabhängigen Experimenten bei 10 μ M Imatinibbehandlung mindestens eine 50%ige Reduzierung ihrer Bindung an die Resins aufwiesen.

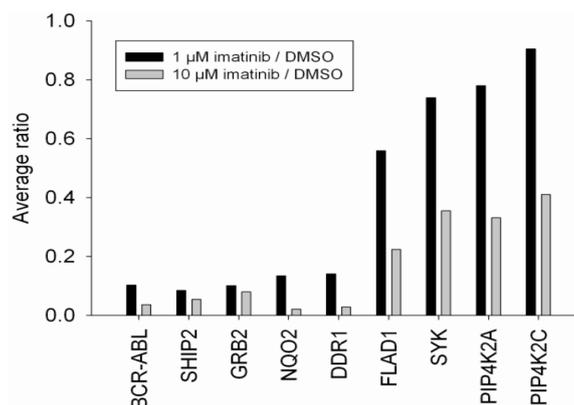


Abb. 7: Quantifizierte K562-Proteine zeigen eine reduzierte Bindung an Inhibitor-Resins nach der zellulären Behandlung mit Imatinib. Es sind die Durchschnittswerte aller quantifizierter K562 Proteine angegeben, die bei der Behandlung von 10 μ M Imatinib mindestens eine 50% reduzierte Interaktion mit den immobilisierten Kinaseinhibitoren aufweisen.

Dies war bei BCR-ABL und seinem Bindungspartnern *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) und *SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 2* (SHIP2) zu beobachten. GRB2

bindet abhängig von der Phosphorylierung des Tyrosins-209 über die SH2 Domäne, SHIP2 dagegen bindet über eine SH3 Domäne an ABL (109-110). Da BCR-ABL eine sehr hohe Affinität zu Imatinib aufweist, zeigte es bereits bei 1 μM Imatinib eine stark reduzierte Resinbindung (s. Abb. 7). Ähnlich verhielt sich das Protein *discoidin domain receptor 1* (DDR1), welches auch bei Bantscheff et al. als hoch affines Bindungsprotein für Imatinib identifiziert wurde (80). Des Weiteren wurden andere bekannte Imatinibbindungsproteine wie die *quinone reductase 2* (NQO2) und die Tyrosinkinase SYK (80, 111-112) entdeckt. NQO2 verhielt sich wie ein hochaffines Zielprotein und war schon bei 1 μM Konzentration von zuvor zelluläre gebundenem Imatinib fast komplett kompetitiert. SYK dagegen wies eine geringere Affinität zu Imatinib auf. Die Reduzierung des Proteinlevels erfolgte dosisabhängig und selbst bei der Konzentration von 10 μM Imatinib war noch 35% Restbindung zu verzeichnen. Diese Ergebnisse werden von früheren biochemischen Daten basierend auf *in vitro* Analysen von SYK gestützt, aus denen ein K_i Wert von 5 μM für Imatinib abgeleitet wurde (111). Als potentielle neue Imatinibbindungsproteine kommen die zwei *Phosphatidylinositol-4-Kinase Type-2 Isoformen α und γ* (PIP4K2A und PIP4K2C) in Frage, die eine ähnliche Affinität wie SYK aufwiesen. Als weiteres, potentiell neues Zielprotein wurde die *Flavin Adenin Dinucleotid (FAD) Synthetase* (FLAD1-Gen) identifiziert. Diese Synthetase ist in dem metabolischen Prozess beteiligt, in dem aus Flavinmononucleotid mittels Adenylierung FAD synthetisiert wird (113). Da FAD ein Redox Co-Faktor sowie Bestandteil vieler Flavoproteine ist, ist es für viele biologische Prozesse essentiell und somit naheliegend, dass ein therapeutisches Ausschalten von FLAD1 schädigenden Einfluss auf die Zelle hätte. Erwähnenswert ist außerdem, dass FAD als prosthetische Gruppe in dem Protein NQO2 beschrieben ist und in diesem Protein die Katalyse des Elektronentransfers übernimmt. Das könnte einen Hinweis darauf geben, dass Imatinib Enzyme binden kann, die FAD enthalten oder binden können. Andererseits könnte Imatinib auch mit der ATP-Bindungsstelle der FAD-Synthetase interagieren. Da das Proteinlevel der FAD Synthetase um 45% bzw. 79% bei 1 μM bzw. 10 μM reduziert wurde, interagiert Imatinib weniger stark mit dieser Synthetase als mit BCR-ABL und NQO2, aber stärker als mit SYK und den PIP4-Kinasen.

4.1.2.3. Identifizierung von Imatinib-regulierten Kinasen in der nachgeschalteten Signaltransduktion

Mit dem beschriebenen Analyseverfahren ist es möglich, mit hoher Sensitivität Phosphopeptide von Proteinkinasen zu identifizieren und zu quantifizieren. Auch hierfür wurden nur Phosphorylierungsstellen analysiert, die in beiden unabhängigen Experimenten mit vergleichbarer Sensitivität für Imatinib quantifiziert wurden. Für die meisten

Phosphorylierungsstellen wurde keine signifikante Veränderung nach Imatinib festgestellt, da sich ihr SILAC Verhältnis auch bei 10 μM Imatinib in beiden Experimenten nur unwesentlich von eins abwich. Sensitive Phosphorylierungsstellen wurden als signifikant hoch bzw. runter reguliert definiert, wenn sie entweder unabhängig in beiden Experimenten eine mindestens zweifache Veränderung aufwiesen oder im Durchschnitt der Experimente mindestens zweifach reguliert waren, wobei sich in diesem Fall die SILAC Verhältnisse der Einzelexperimente um weniger als den Faktor 2 unterscheiden durften. Biologisch reproduzierbar inhibiert waren nach der Behandlung mit 10 μM Imatinib demnach 70 verschiedene Phosphorylierungsstellen. Davon waren 15 Tyrosinphosphorylierungsstellen, die auf dem BCR-ABL Fusionsprotein identifiziert wurden. Erwartungsgemäß wiesen diese Stellen sehr geringe SILAC Verhältnisse auf, was auf den kombinierten Effekt ihrer Dephosphorylierung sowie der stark reduzierten BCR-ABL Bindung nach der Imatinibbehandlung zurückzuführen ist. Aufgrund des oftmals geringeren dynamischen Bereichs bei Phosphopeptidquantifizierung konnten diese Phosphorylierungsstellen nicht entsprechend der reduzierten Proteinmenge normalisiert werden. In Fällen, in denen sich Imatinib weniger stark auf die Bindung an die Kinaseaffinitätsresin auswirkte, wie z.B. bei SYK, war hingegen die Normalisierung von Phosphorylierungsänderungen auf Proteinänderungen möglich und sinnvoll, da hier bei Phosphorylierungsstellen eine ca. dreimal stärkere Reduktion nach 10 μM Imatinib im Vergleich zur Proteinbindung auftrat. Bei SYK waren die Tyrosine Y323, Y348 und Y352 betroffen, die nachweislich die zelluläre Kinaseaktivität von SYK beeinflussen (114). Somit kann gefolgert werden, dass bei höheren Imatinibkonzentrationen die zelluläre SYK Aktivität signifikant gehemmt wird.

Das Ziel dieser Studie war es, Proteinkinasen zu identifizieren, die an der Weiterleitung der Signale von direkten Imatinibbindungspartnern beteiligt sind. Dadurch könnten potentielle neue Zielproteine identifiziert werden für den Fall, dass Mutationen im BCR-ABL-Protein zu einer Resistenzbildung gegen Imatinib führen. Daher wurde hier nicht auf direkte Bindungspartner von Imatinib fokussiert sondern auf Proteinkinasen, die nur auf der Phosphorylierungsebene durch Imatinib beeinflusst werden; ein Indiz dafür, dass sie an Phosphorylierungsabhängiger Signalweiterleitung beteiligt sein könnten. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Phosphorylierungsstellen gelegt, für welche bereits in einem anderen Kontext eine regulatorische Funktion nachgewiesen wurde. Diese Voraussetzungen erfüllte die Phosphorylierungsstelle Y551 auf der zytoplasmatischen Tyrosinkinase BTK. Hier war ein dosisabhängiger Effekt bei steigender Imatinibkonzentration zu beobachten, so dass bei 10 μM Imatinib eine zu fast 70% reduzierte Phosphorylierung vorlag. Bei der Quantifizierung der unphosphorylierten Peptide konnte dagegen keine Reduzierung der BTK Proteinmenge nach Imatinibbehandlung festgestellt werden. Ähnlich verhielten sich die

Phosphorylierungsstellen Y714 der zytoplasmatischen Tyrosinkinase FER und Y774 der Rezeptor-Tyrosinkinase EphB4. Die regulierten Phosphorylierungsstellen der Kinasen BTK, FER und EphB4 liegen alle in der Aktivierungsschleife in einer konservierten Position, wodurch sie die aktive Konformation bei diesen Kinasen bekanntermaßen stabilisieren (7, 115). Somit ist anzunehmen, dass diese reduzierten Phosphorylierungen nach Imatinib auch zelluläre Hemmung der Kinaseaktivität zur Folge haben, so dass BTK, FER und EphB4 als Kandidaten für die Weiterleitung von BCR-ABL-vermittelten Signalen in Frage kommen. Zwar wurde in murinen, BCR-ABL transformierten Zellen gezeigt, dass die Inaktivierung von BTK keinen inhibitorischen Effekt auf die Zellviabilität hat (116), aber es ist denkbar, dass es Zelltypbedingte Abweichungen hinsichtlich der Funktion von BTK gibt. So könnte in BCR-ABL transformierten, Mauszellen die Signalweiterleitung durch ein anderes Mitglied der gleichen, Proteinkinasefamilie, z.B. mittels der strukturell und funktionell verwandten Tyrosinkinase TEC, erfolgen.

Eine weitere Imatinib-induzierte Dephosphorylierung fand man auf der *focal adhesion Kinase* (FAK) an Y883 (entsprechend dem identifiziertem Eintrag in der verwendeten IPI Datenbank), welche Y861 gemäß dem meist in der Literatur verwendeten Eintrag in der UniProt Datenbank entspricht. Frühere Analysen haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Phosphorylierung von FAK an der Stelle Y861 und der Ras-vermittelten Transformation von Zellen und sogar der Tumorentstehung in Mausmodellen besteht (117). Daher könnte die Dephosphorylierung von Y861 auf FAK als interessante Zielkinase für therapeutische Ansätze hinweisen. Eine weitere konzentrationsabhängige Dephosphorylierung ist bei der Proteinkinase C δ (PKC δ) an den Stellen Y313 und Y334 nach Imatinibbehandlung zu beobachten. Diese Stellen liegen zwischen dem Bereich zwischen den regulatorischen und katalytischen Domänen der Kinase und regulieren Vorgänge wie Apoptose, Transkription und die molekulare Assoziation von PKC δ Interaktionspartnern (118-119). Aufgrund dieser Imatinib-sensitiven Phosphorylierungsstellen an PKC δ erscheint eine weitere Untersuchung dieser Proteinkinase hinsichtlich ihrer Rolle bei der Transformation von CML-Zellen sinnvoll.

Es wurden auch eine Reihe von Imatinib-regulierten Phosphorylierungsstellen identifiziert, die bis jetzt funktionell noch nicht näher charakterisiert sind, wie eine N-terminale Phosphorylierung auf der Kinase YES, die zur SRC-Familie gehört, und eine Phosphorylierung nahe dem C-terminalen Ende der zytoplasmatischen Tyrosinkinase ACK.

Neben Tyrosin- wurden auch Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen quantifiziert, die durch Imatinib gehemmt wurden. Dazu gehören Phosphorylierungsstellen auf der *Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase 3* (Map3K3), *90 kDa ribosomal Protein S6 Kinase* (RSK1), *Casein Kinase 2* (CK2 α 2) und *PCTAIRE1*. Beim letzteren Protein wurde bereits bei einer

4. Ergebnisse

Imatinibkonzentration von 1 μ M eine Reduzierung der Phosphorylierung von 75% an S71 nachgewiesen.

Um die Beziehungen aller Imatinib-sensitiven Proteine untereinander zu veranschaulichen, wurden sie mit Hilfe der STRING Analyse untersucht. Dabei weisen Imatinib-sensitive Phosphoproteine wie BTK, FER, FAK eine starke Verbindung zu direkten Imatinibbindungsproteinen wie BCR-ABL und SYK auf (s. Abb. 8), was die Wahrscheinlichkeit unterstreicht, dass sie eine Rolle in der Signalweitergabe dieser Proteine spielen.

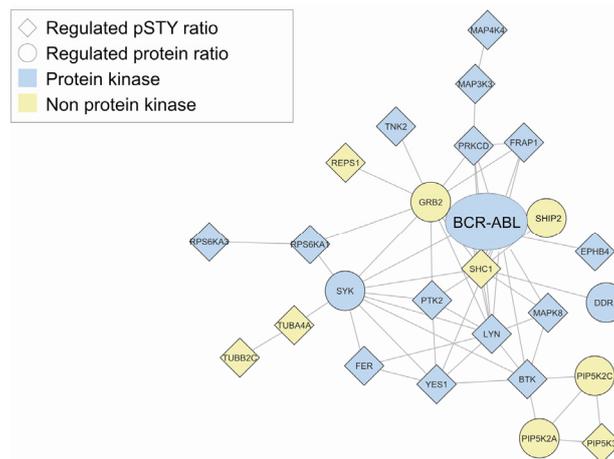


Abb. 8: Interaktionsnetzwerk der Imatinib-regulierten Proteine. Hier wurden alle Proteine analysiert, die entweder eine reduzierte Kinaseinhibitor-Bindung oder von Imatinib gehemmte Phosphorylierungsstellen aufwiesen. Das Netzwerk wurde mittels STRING ermittelt und mit Programm Cytoscape visualisiert.

Neben reduzierten Phosphorylierungen gab es auch Fälle, in der die Imatinibbehandlung die Phosphorylierung förderte. Das war aber nur an Phosphorylierungsstellen mit Serinen oder Threoninen zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass Tyrosinphosphorylierung bei Imatinibbehandlung meist nur gehemmt wird. Gesteigerte Phosphorylierung wurde z.B. bei der Proteinkinase *Polo-like Kinase 1* (PLK1), TTK, Wee1 und *Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory Kinase* (MYT1) entdeckt, für die alle gut untersuchte Funktionen beim Eintritt und Ablauf der Mitose beschrieben sind. Interessanterweise ist PLK1 in vielen Leukämiezellen hoch exprimiert und. Kürzlich wurde diese Proteinkinase zudem als neue Zielstruktur für therapeutische Ansätze in hämatologischen Tumoren beschrieben (120). Die Stelle der Phosphorylierung an der PLK1 war T210. Da sich diese in der Aktivierungsschleife befindet, deuten unsere Daten auf eine Imatinib-induzierte enzymatische Aktivierung der Kinase hin. Vermutlich wird PLK1 als schnelle, möglicherweise kompensatorische Zellantwort auf das Ausschalten der BCR-ABL Kinase aktiviert.

4. Ergebnisse

4.1.3. Transfektion zur Ausschaltung potentieller neuer Zielproteine

Durch die Analyse der Proteinkinasen wurden diejenigen identifiziert, die auf der Phosphorylierungsebene durch Imatinib beeinflusst werden. Das macht diese Proteine zu potentiellen Kandidaten in der Weiterleitung von Signalen, welche von BCR-ABL ausgehen. Zur weiteren Überprüfung der möglichen funktionellen Relevanz dieser Proteinkinasen bei der Proliferation bzw. dem Überleben von BCR-ABL-transformierten Zellen wurden einige mittels RNA Interferenz weiter charakterisiert.



Abb. 10: Lokalisation der regulierten Phosphorylierungsstellen auf der Proteinsequenz von FER, BTK, SYK und TEC (www.phosphosite.org).

Als erster Kandidat wurde SYK ausgewählt, da diese Proteinkinase nicht nur als direkter Interaktionspartner von Imatinib identifiziert sondern auch zellulär auf Phosphorylierungsebene gehemmt wurde. Die Tyrosinstellen Y323, Y348 und Y352 spielen im SYK-Protein eine wichtige Rolle bei der enzymatischen Aktivierung und sie regulieren wichtige molekulare Assoziationen (s. Abb. 10). Zusätzlich wiesen sie eine konzentrationsabhängige

4. Ergebnisse

Hemmung in ihre Phosphorylierung nach Imatinibzugabe auf. Daher wurde getestet, ob die Hemmung der zellulären SYK-Expression Auswirkungen in den untersuchten Zellen hat. Dazu wurden K562-Zellen 24h vor der Transfektion mit einer Konzentration von 100.000/ml ausgesät. Für die Transfektion am darauffolgendem Tag wurden 200.000 Zellen pro 100 µl Medium ausgesät und SYK-spezifische Duplex-siRNA in einer Konzentration von 2 µM in Medium ohne Serum mit dem Transfektionsreagenz HiPerfect für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung für 6h mit den Zellen im Brutschrank inkubiert bevor wieder normales Medium zugegeben wurde. Für den Test auf Apoptose wurden dann nach 96h mindestens 300.000 Zellen pro Ansatz in 500 µl Propidiumjodid-Lösung resuspendiert (121). Nach der einstündigen Inkubation wurde die Apoptoserate in der FACS-Analyse bestimmt. Zudem wurde nach 72h je ein Aliquot an transfizierten Zellen im Westernblot analysiert um die Effizienz der Hemmung der SYK-Expression nachzuweisen.

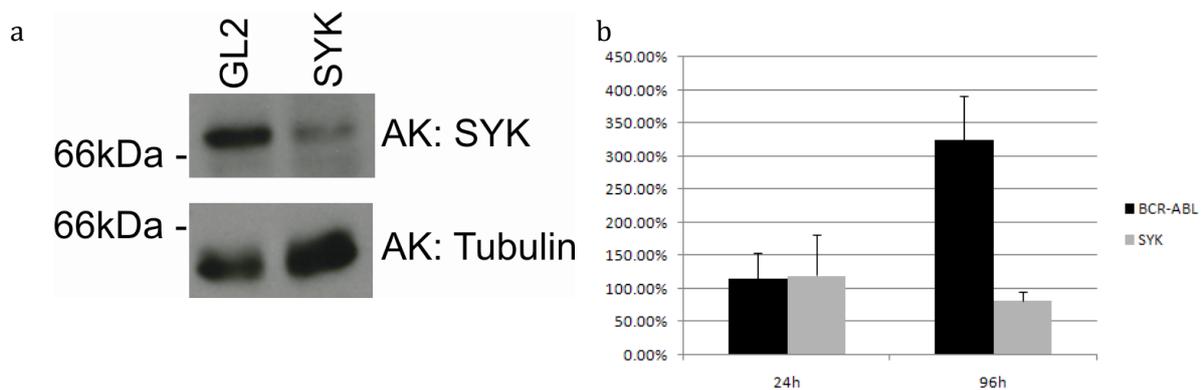


Abb. 11: Nachweis der Effizienz der Transfektion mit SYK. (a) Die Intensität des Knock-Downs wurde nach 72h im Westernblot untersucht und (b) Apoptose nach der Transfektion in der FACS-Analyse analysiert.

Im Westernblot konnte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.41o (list.nih.gov/archives/imagej.html) das Verhältnis der Bandenintensitäten ermittelt werden. Die Knock-Down-Effizienz bei der Transfektion der SYK-siRNA betrug 64%, entsprechend einem Restnachweis von 36% des Proteins im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit GL2 (s. Abb. 11, 12).

	Intensität der Bande (normalisiert)	*/Kontrolle	*/GL2
BTK	20.4925	0.325352971	35.0%
FER	4.08	0.679207591	23.7%
SYK	31.461	0.55046016	36.4%

Abb. 12: Die Intensitäten der Banden zum Nachweis der Effizienz der Transfektion.

Bei der Analyse auf Apoptose konnte jedoch bei dieser Effizienz des Knock-Down kein signifikanter Effekt gesehen werden. Im Vergleich zur positiven Kontrolle (Knock-Down der

BCR-ABL-Expression) war keine gesteigerte Apoptoserate feststellbar und bleibt auf gleichem Niveau wie bei dem 24 h Wert. Jedoch lässt sich daraus nicht eindeutig ableiten, dass die Kinase SYK nicht doch essentiell für das Überleben der Zelle ist, da bei Kinasen oftmals eine kleine Menge an aktivem Protein ausreichen kann, um die zellulär benötigte Aktivität aufrechtzuerhalten. Jedoch war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich ein komplettes Ausschalten der zellulären SYK-Expression mittels siRNA-Transfektion zu erreichen.

Ein weiterer möglicher Kandidat für die Entwicklung eines therapeutischen Inhibitors ist die Proteinkinase BTK. Die Phosphorylierungsstelle Y551 auf der zytoplasmatischen Tyrosinkinase BTK besitzt eine regulatorische Funktion und ihre Modifikation korreliert mit der enzymatischen Aktivität. In den bereits beschriebenen Experimenten konnte ein Dosis-abhängiger Effekt bei steigender Imatinibkonzentration beobachtet werden, so dass bei 10 μM Imatinib die Phosphorylierung von Y551 mehr als 70% reduziert vorlag. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die TEC Kinasefamilie ein wichtiger Bestandteil in der Signalweiterleitung des BCR-ABL Onkoproteins ist und Ihre Aktivierung Imatinib-vermittelte BCR-ABL Hemmung kompensiert.

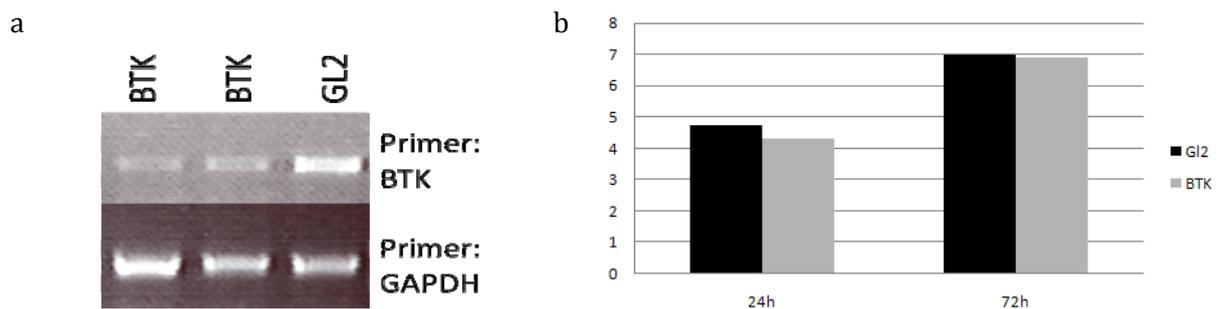


Abb. 13: Transfektion mit siRNA gegen BTK. (a) Der Nachweis der Effizienz der Transfektion mit Hilfe der RT-PCR und (b) die Auswirkung auf Apoptose nach Transfektion in der FACS-Analyse.

Der Nachweis der Apoptose verlief genau wie bei SYK beschrieben, der Nachweis der Effizienz der Transfektion erfolgt jedoch über die RT-PCR. Wie bei der Westernblot-Analyse wurde die Quantifizierung der Banden mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Hier entsprach die Restmenge von BTK mRNA etwa 35% in der Kontrolltransfektion mit GL2 gemessenen (s. Abb. 12). Es konnte auch hier keine gesteigerte Apoptoserate im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden (s. Abb. 13). Allerdings kann aufgrund des unvollständigen Knock-Downs eine Rolle von BTK für das Zellüberleben nicht ausgeschlossen werden, da die verbleibende restliche Aktivität der Kinase möglicherweise ausreicht, um K562 Zellen nicht in Apoptose gehen zu lassen. Alternativ ist auch denkbar, dass nahe verwandte Kinasen wie TEC reduzierte BTK Expression kompensieren können.

Ähnlich wie bei BTK verhielt sich die Phosphorylierungsstelle Y714 der zytoplasmatischen Tyrosinkinase FER nach zellulärer Imatinibbehandlung. Es wurde bereits gezeigt, dass die

Proteinkinase FER eine wichtige Rolle im Zellzyklus bestimmter malignen Zellen spielt und bei Prostata- und Brustkrebszellen eine Inhibierung des Proteinlevels von FER die Zellproliferation hemmt (122). Da Y714 von FER nach Imatinibbehandlung dephosphoryliert wurde ohne dass eine direkte Interaktion mit dem Wirkstoff beobachtet wurde, war auch FER ein möglicher Kandidat für die Transduktion Imatinib-abhängiger Signale. Die regulierte Phosphorylierungsstelle der Kinase FER liegt zudem in der Aktivierungsschleife und stabilisiert bekanntermaßen, die aktive Konformation der Kinase (7, 115).

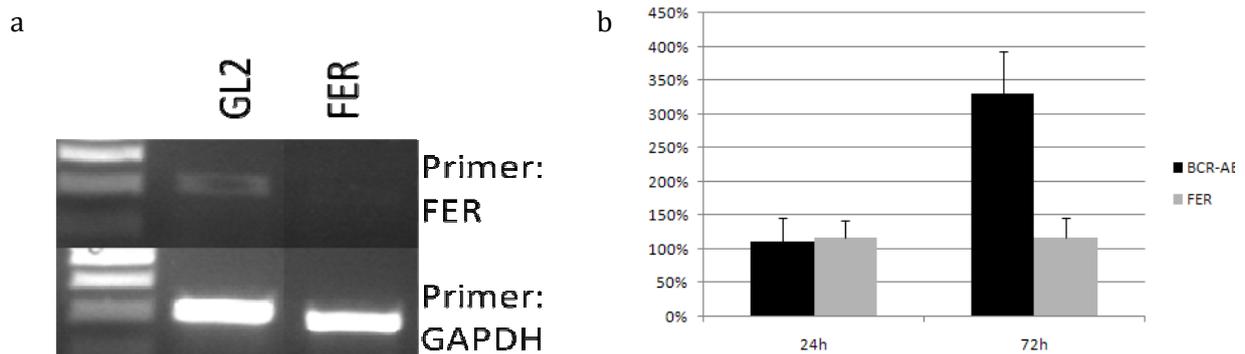


Abb. 14: Transfektion mit der siRNA FER. (a) Der Nachweis zur Effizienz der Transfektion erfolgt mit der RT-PCR und (b) der Test ob FER-Knock-Down die Apoptose auslöst erfolgt mit der FACS-Analyse.

Auch hier wurde die FER siRNA in die Zellen transient transfiziert. Der Nachweis der Apoptose und die Effizienz der Hemmung ihrer Genexpression erfolgte genau wie bei dem BTK. Aus der RT-PCR ließ sich schließen, dass die Kinase auf Ebene der mRNA bis auf 24% im Vergleich zur Kontrolltransfektion gehemmt wurde. Einen Effekt auf die Zellapoptose konnte auch hier nicht gezeigt werden. Nach 72h war die Rate der Zellen in Apoptose vergleichbar mit der nach 24h. Die Positivkontrolle mit dem Knock-Down von BCR-ABL zeigte wie erwartet auch hier eine drastische Steigerung der apoptotischen Zellen um fast das Dreifache nach 72h. Genau wie bei den Kinasen BTK und SYK könnte auch hier die verbleibende Proteinmenge für die Zelle ausreichend sein, um die benötigte Aktivität für die Zelle bereit zu stellen. Daher wären hier insgesamt weiterführende Untersuchungen mit z.B. stabilen Transfektionsansätzen von Nöten.

4.1.4. Konzentrationsbestimmung für die Imatinibbehandlung von EOL-1-Zellen

Auch bei der zweiten Leukämie-Zelllinie EOL-1, in welcher das Imatinib-sensitive Fusionsprotein FIP1L1-PDGFR α ursächlich für die Transformation ist, wurde vor der proteomischen Analyse getestet, welche Konzentration von Imatinib am geeignetsten für anschließende MS-basierte Analysen ist. Auch hier galt es für die Identifikation von Kinasen, die potentiell an der Weitergabe Imatinib-regulierter Signale beteiligt sind, regulierte

4. Ergebnisse

Phosphorylierungsstellen zu finden. Initial wurde eine Konzentrationsreihe von Imatinib auf EOL-1 Zellsuspensionen für 90 min ausgetestet.

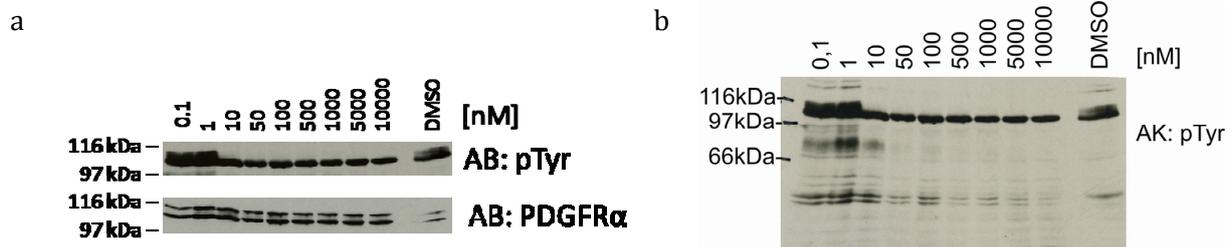


Abb. 15: Nachweis des Phosphorylierungslevel (a) des FIP1L1-PDGFR α Fusionsproteins und (b) des kompletten Lysats nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Imatinib.

Da das Fusionsprotein FIP1L1-PDGFR α sensitiver gegenüber Imatinib ist als BCR-ABL, begann die Konzentrationsreihe bereits bei 0,1 nM und endete bei 10.000 nM. Bereits bei einer Konzentration von 10 nM wird die Phosphorylierung auf des FIP1L1-PDGFR α Fusionsproteins vollständig gehemmt, jedoch war auf zellulärer Ebene noch Phosphorylierung an den Tyrosinen nachweisbar. Dies deutete daraufhin, dass FIP1L1-PDGFR α -induzierte Signalweiterleitung noch nicht vollständig unterbrochen und eine restliche Aktivität des Onkoproteins vorhanden ist. Somit wurde im Folgenden zudem eine weitere Imatinibkonzentration von 100 nM verwendet.

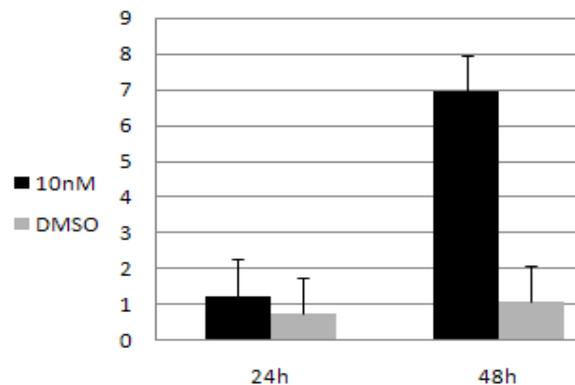


Abb. 16: Test auf Apoptose nach Imatinibbehandlung der EOL-1 Zelllinie

Nachfolgend wurde getestet bei welcher Imatinibkonzentration die EOL-1 Zellen in Apoptose gehen. Dabei wurde die FACS-Analyse mit Propidiumjodid-Lösung wie bei den K562-Zellen durchgeführt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass bereits die Konzentration von 10 nM die Apoptoserate der Zellen auf das 6 bis 7-fache, verglichen mit der DMSO Kontrolle, erhöht.

4.1.5. Kinaseanreicherung im Batchverfahren (EOL-1-Zelllinie)

Die Probenvorbereitung für die Kinaseanreicherung aus EOL-1-Zellen wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt wie für die Kinaseanreicherung bei K562-Zellen.

Für den kompletten Versuchsansatz wurden drei EOL-1 Zellpopulation für sechs Zellteilungen im SILAC-Medium auf 15 cm Petrischalen kultiviert. Danach waren die Zellen vollständig markiert und konnten für 90 min entweder mit 10 nM Imatinib, 100 nM Imatinib oder als Kontrolle mit DMSO behandelt werden. Nach anschließender Zentrifugation und Waschen mit PBS wurden die Pellets aliquotiert, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend wurde die Kinaseanreicherung über das Batchverfahren und die Lyse der Zellen, sowie der Trypsinverdau über das Gel oder in Lösung inklusive der Phosphopeptidanreicherung wie oben beschrieben durchgeführt (s. Kapitel 4.1.2.).

4.1.5.1. Quantitative Analyse von EOL-1 Proteinen nach Kinaseinhibitoranreicherung

Insgesamt wurden 2321 verschiedene Proteingruppen identifiziert und davon 1152 Proteingruppen in beiden Experimenten quantifiziert. Hinzu kamen noch die Proteingruppen die nur in je einem Experiment quantifiziert wurden. Dies waren 691 Proteingruppen in dem ersten Experiment und 514 Proteingruppen im zweiten Experiment. Auf der Ebene der Phosphorylierungsstellen wurde 487 in beiden Experimenten quantifiziert, berücksichtigt man Stellen die nur in einem Experiment quantifiziert wurden, kommen aus dem ersten Experiment 338 und aus dem zweiten Experiment noch 859 weitere Stellen hinzu. Für die weitere Auswertung wurden jedoch nur die 386 Phosphorylierungsstellen berücksichtigt, die mit hoher Konfidenz in beiden biologischen Wiederholungsexperimenten lokalisiert und quantifiziert werden konnten.

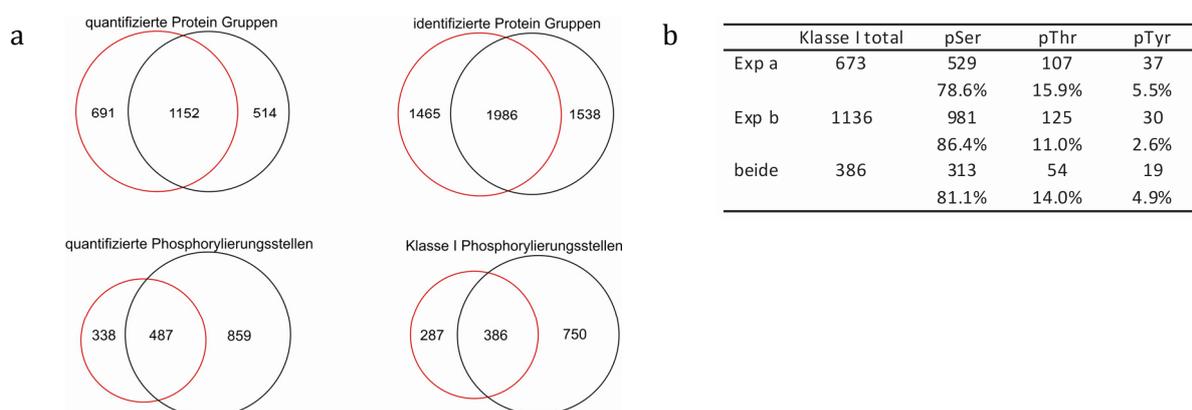


Abb. 17: Quantitative Auswertung des EOL-1-Datensatzes (a) Verteilung der quantifizierten Proteingruppen bzw. der Phosphorylierungsstellen in den beiden Experimenten. (b) Darstellung der quantitative Verteilung der Aminosäuren bei Klasse I Phosphorylierungsstellen

4.1.5.2. Identifizierung der Bindungspartner von Imatinib

Auch bei dieser Zelllinie wurden Proteine identifiziert, die eine verminderte Bindung an die Kinaseinhibitor-Resins nach der zellulären Behandlung mit Imatinib aufwiesen. Um falschpositive Daten auszuschließen, wurde nach den Proteinen gefiltert, die in beiden

unabhängigen Experimenten bei 100 nM Imatinibbehandlung mindestens ein 50%ige Reduzierung ihrer Bindung an die Resins aufzeigten. Dies trifft auf Proteine zu, die entweder direkt an Imatinib binden oder mit direkten Bindungspartnern interagieren. Prinzipiell ist aber auch nicht auszuschließen, dass nach 90 min Imatinib bei manchen Proteinen, die mit immobilisierten Kinaseinhibitoren wechselwirken, bereits Expressionsänderungen auftreten könnten. In geringerer Abundanz nach Affinitätsaufreinigung wurde das Protein *Coagulationsfaktor XIII* (F13A1) gefunden, das durch Thrombin und Kalziumionen aktiviert wird und somit in der Stabilisierung des Fibrin-Koagulat bei der Blutgerinnung mithilft. Zudem waren auch die Proteine *cleavage and polyadenylation specific factor 1, 2 und 3* in geringerer Menge nachweisbar. (s. Abb. 18). Diese Faktoren sind an der 3'-Prozessierung von prä-mRNA beteiligt, erkennen die Signalsequenz der AAUAAA und interagieren zudem mit der Poly(A)Polymerase. Somit sind sie bei der prä-mRNA Spaltung und der anschließenden Poly(A)-Anheftung funktionell wichtig. Die drei Faktoren bilden zusammen mit CPSF4 und FIP1L1 den *Cleavage and Polyadenylation Specifity Factor* (CPSF) Komplex (123). Generell bedarf es weiterer Untersuchungen, um bei diesen Proteinen die genaue Ursache für ihre reduzierte Bindung an den Kinaseinhibitorresin nach zellulärer Imatinibzugabe zu klären.

Hinzu kam das bekannte Imatinib-Target NQO2, welches zuvor schon in K562 Zellen identifiziert wurde.

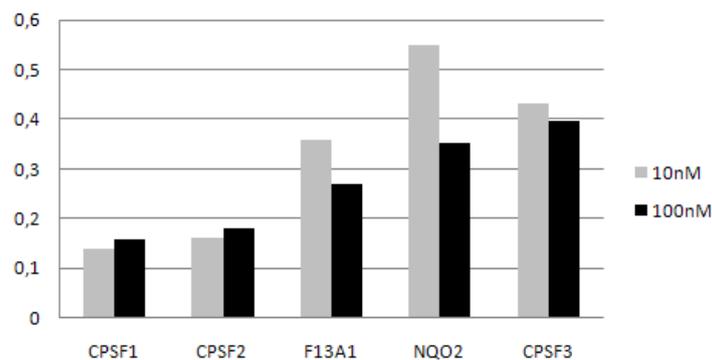


Abb. 18: Proteine, welche nach Imatinibbehandlung in den EOL-1 Zellen in reduzierter Menge an immobilisierte Kinaseinhibitoren gebunden waren

4.1.5.3. Identifizierung von regulierten Kinasen in Imatinib-behandelten EOL-1 Zellen

Nach der Behandlung mit Imatinib wurden auch ein Reihe von Phosphorylierungsstellen an Proteinkinasen gehemmt, wie z. B. S280 bei der Proteinkinase CHK1. Normalerweise wird diese Kinase benötigt, um nach DNA-Schäden oder bei unreplizierter DNA den Zellzyklus zu arretieren und diese zelluläre Aktivität wird durch Phosphorylierung an S280 negativ beeinflusst. Auch bestimmte MAP-Kinasen waren wie bei den K562-Zellen betroffen. U. a. war

4. Ergebnisse

bei der Serin/Threonin Kinase MEKK3 die Phosphorylierungsstelle S368, die in der Proteinkinase-Domäne liegt, nach Imatinib runter reguliert. Zudem waren Komponenten anderer wichtiger Signalwege beeinflusst, wie die regulatorischen Untereinheit der Phosphoinositide-3-Kinase an den Phosphorylierungsstellen S280 und Y607. Jedoch sind noch keine Funktionen dieser Phosphorylierungen bekannt. Eine weitere Hemmung lag bei der 90 kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (p90RSK) an den Phosphorylierungsstellen S28, S372 und S389 vor, wobei S372 in einer Proteinkinase C Domäne des Proteins lokalisiert ist. P90RSK wird durch ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert, welche bekanntermaßen *downstream* des konstitutiv aktiven FIP1L1-PDGFR α Onkoproteins angeschaltet sind. Außerdem wurde bei der *Lymphocyte-oriented Serin/Threonin Protein Kinase* (LOK) eine infolge Imatinibbehandlung reduzierte Phosphorylierung an S454 identifiziert, die allerdings außerhalb der Proteinkinase-Domäne liegt und funktionell nicht charakterisiert ist. Zudem wurden eine Reihe von Phosphorylierungsstellen der bekannten Imatinib-Targets ABL und FIP1L1-PDGFR α gehemmt.

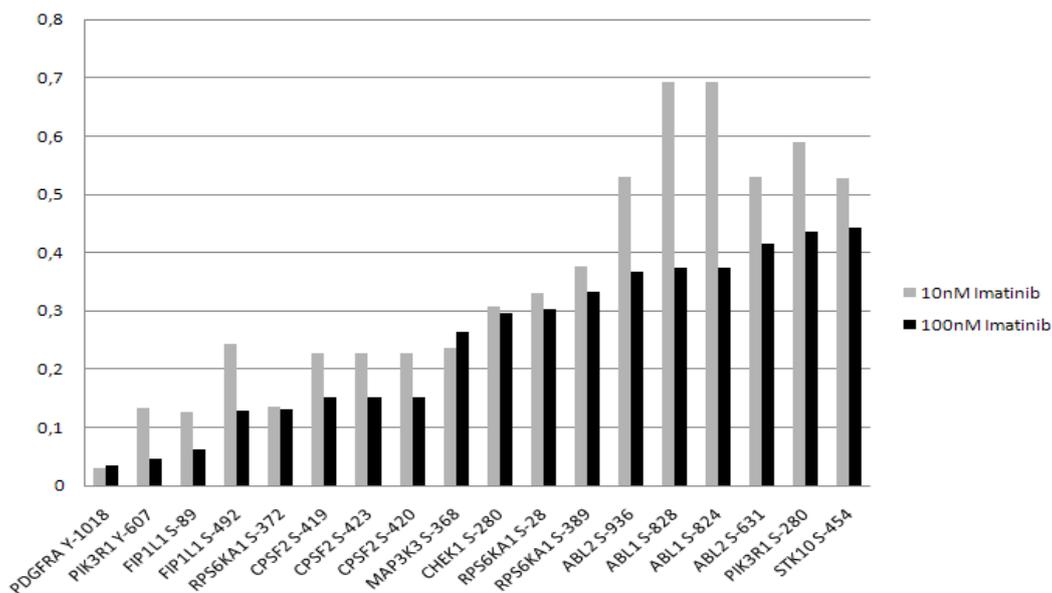


Abb. 19: Auswirkung von Imatinib auf die Phosphorylierung von affinitätschromatographisch aus EOL-1 Zellen aufgereinigten Proteinen. Alle Phosphorylierungsstellen, die signifikant quantifiziert wurden und eine Sensitivität für Imatinib aufwiesen.

In Abb. 19 kann man deutlich erkennen, dass FIP1L1-PDGFR α eine höhere Sensitivität gegenüber Imatinib als ABL aufwies. Bereits bei der geringeren Konzentration des Inhibitors ist FIP1L1-PDGFR α fast vollständig an den Phosphorylierungsstellen gehemmt während bei ABL noch mehr als 50% Restphosphorylierung detektiert wurde.

Ansonsten gab es, abgesehen von der Hemmung von Phosphorylierungsstellen an p90RSK, keine großen Übereinstimmungen zwischen den beiden Leukämie-Zelllinien K562 und EOL-1. In den EOL-1 wurde z.B. im Gegensatz zu den K562 Experimenten keine Phosphoregulation nach zellulärer Imatinibbehandlung an BTK, FER, SYK oder EPHB4 detektiert. Insgesamt war

die Anzahl sowohl der reproduzierbar quantifizierten als auch der als reguliert identifizierten Phosphorylierungsstellen in den EOL-1-Zellen deutlich geringer und für nur wenige sind mit bekannten regulatorischen Funktionen belegt. Daher war es nicht möglich, systematische und aussagekräftige Vergleiche zwischen den beiden Zelllinien zu ziehen.

4.2. Gesamtzelluläre Proteom- und Phosphoproteomanalyse in Imatinib-behandelten EOL-1 Zellen

Bei der Anreicherung mit Kinaseinhibitoren lag der Fokus auf der zellulären Analyse von Subproteomen, welche sich zu einem großen Anteil aus Proteinkinasen zusammensetzten. Dadurch konnte die analytische Sensitivität für Proteinkinasen erhöht werden, allerdings blieben dabei zelluläre Phosphorylierungsänderungen an Substratproteinen weitgehend unberücksichtigt. Um die bereits beschriebenen Daten weiter zu komplementieren wurden daher weitere proteomische Analysen durchgeführt, bei denen keine Anreicherung mit Inhibitoren erfolgte und insbesondere Phosphopeptide aus Gesamtzellextrakten angereichert wurden. Zudem wurde neben einer kürzeren Inkubationszeit auch für 24h mit Imatinib behandelt, um auch nachgeschaltete Proteinexpressionsänderungen erfassen zu können.

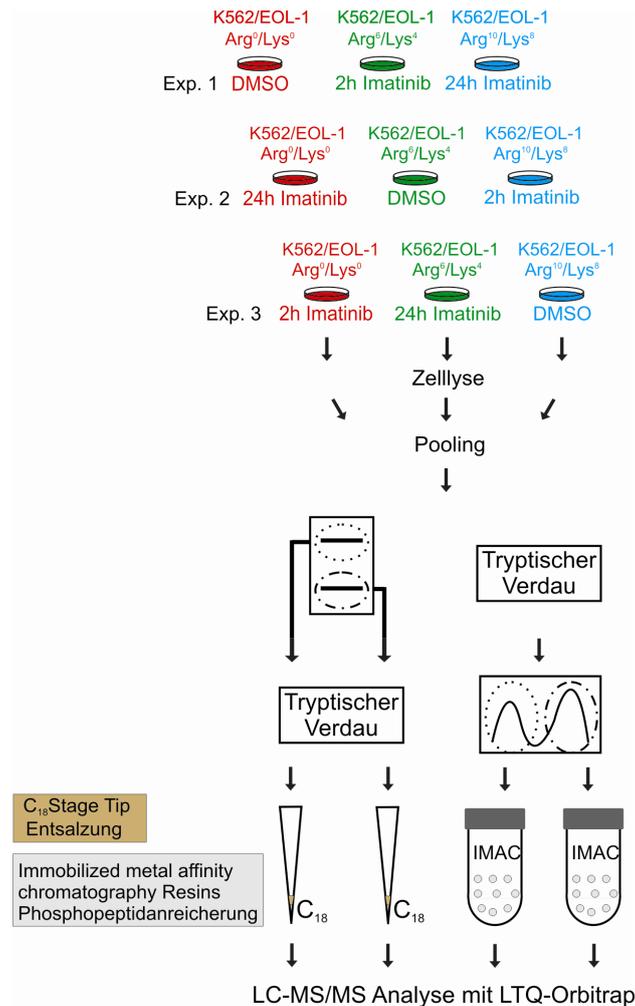


Abb. 20: Schematische Darstellung der gesamtzellulären Proteom- und Phosphoproteomanalyse von Leukämiezellen. SILAC-basierter Versuchsansatz zur Analyse des kompletter Zellysat nach der Behandlung mit Imatinib. Für die Proteomanalyse erfolgte der Verdau im Gel mit anschließender C₁₈-StageTip-Entsalzung, bei der parallelen Phosphoproteomanalyse erfolgte der verdau Verdau in Lösung gefolgt von SCX-Chromatographie und IMAC-Präzipitation.

Die Zellen wurden mit Imatinib behandelt (bei der K562-Zelllinie in einer Konzentration von 10 μ M, bei der EOL-1-Zelllinie in einer Konzentration von 100 nM) und für entweder 2h oder 24h inkubiert, um auch auf der Ebene der Proteinexpression und Proteindegeneration Veränderungen beobachten zu können. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert und gepoolt. In jedem SILAC-Experiment wurde das Gesamtlysat aufgeteilt und etwa 200 μ g wurden elektrophoretisch in 15 Fraktionen aufgetrennt und im Gel mit Trypsin verdaut. Nach der Extrahierung der Peptide aus dem Gel wurden diese nochmals über C₁₈-StageTips aufgereinigt. Die restlichen 6 mg wurden direkt in Lösung verdaut und anschließend mit Hilfe der SCX-Chromatographie in 12 Fraktionen separiert. In diesen Proben wurden die Phosphopeptide mit den IMAC-Beads angereichert und vor der Messung mit der LTQ-Orbitrap nochmals mittels C₁₈-Membranen entsalzt. Dieser Ansatz wurde sowohl bei EOL-1 als auch bei K562-zellen dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

4.2.1. Imatinib und seine gesamtzellulären Auswirkungen in K562-Zellen

Nach der Datenprozessierung mit MaxQuant wurde zunächst untersucht, wie viele unterschiedliche Proteine (repräsentiert durch Proteingruppen) entsprechend einer akzeptierten FDR von 1% identifiziert und anhand nicht phosphorylierter Peptide in ihrem Expressionsverhalten analysiert werden konnten. Die Zahlen der vollständig quantifizierten Proteingruppen waren 2115, 1861 und 2017 in den Experimenten a, b und c. Insgesamt wurden 2424 verschiedene Proteingruppen quantitativ erfasst von denen 1588 in allen drei Experimenten identifiziert und für die Bedingungen 2h Inkubation bzw. 24h Inkubation mit Imatinib im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen quantifiziert worden. Bei diesen quantifizierten Proteinen wurden für jeweils 994, 894 bzw. 950 Phosphorylierungsereignisse quantitativ erfasst, was eine Gesamtzahl von 1146 verschiedenen Phosphoproteinen in allen drei Experimenten ergab. Am aussagekräftigsten konnten die 757 verschiedenen phosphorylierten Proteine analysiert werden, die in allen drei unabhängigen Experimenten quantifiziert wurden. In allen drei Experimenten zusammengenommen, wurden 8199 verschiedene Phosphorylierungsstellen quantifiziert, welche eine Lokalisierungswahrscheinlichkeit von mindestens 0,75 aufwiesen (Klasse I Phosphorylierungsstellen). Von diesen Klasse I Phosphorylierungsstellen wurden 4240 über alle Experimente hinweg erfasst, und 5897 Stellen konnten in mindestens zwei der drei Experimente quantifiziert werden (s. Abb. 21).

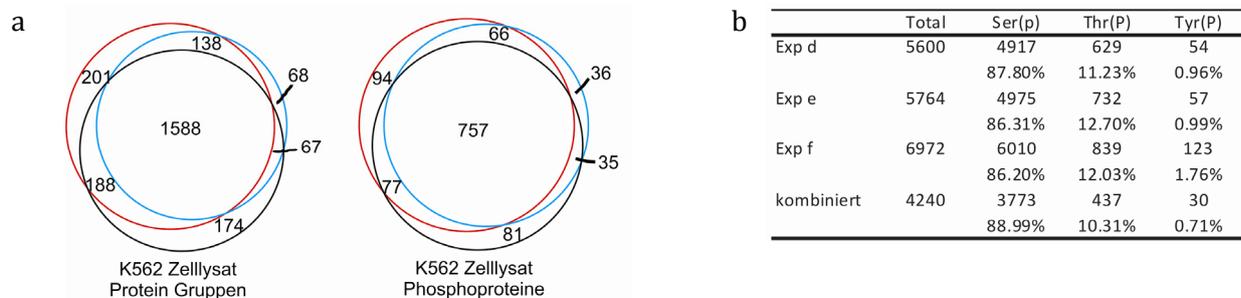


Abb. 21: Quantitative Auswertung des kompletten Zellysats der K562-Zellen. (a) Schematische Darstellung der Verteilung von quantifizierten Proteingruppen und Phosphoproteinen in den K562-Zellen in den einzelnen Experimenten. (b) Die Verteilungen der Aminosäuren über die Phosphorylierungsstellen in den einzelnen Experimenten

Am häufigsten (ca. 86%), wurde erwartungsgemäß die Aminosäure Serin phosphoryliert gefunden. Die restlichen Phosphorylierungsstellen verteilten sich auf Threonin (10-13%) und Tyrosin (weniger als 2%) (s. Abb. 21). Interessanterweise war auf Proteinebene kaum Regulation nach Imatinibbehandlung nachzuweisen, abgesehen von wenigen Änderungen wie z. B. bei dem Protein *Spinster 1*. Bei beiden Zeitwerten war dieses Protein in den Experimenten hoch reguliert und erreichte einen gemittelten Wert von jeweils über 2,0. Dieses Protein ist bekannt für seine Interaktionen mit BCL2 und BCL2L1. Beide Proteine sind in der Regulation

des programmierten Zelltod involviert (124). Somit könnte auch die Imatinib-vermittelte Induktion von *Spinster 1* in diesem Prozess beteiligt sein.

4.2.2. Imatinib und seine gesamtzellulären Auswirkungen in EOL-1 Zellen

In EOL-1-Zellen wurden etwas weniger Proteine als in den K562-Zellen quantifiziert. Die Zahlen der Proteine in den einzelnen Experimenten a, b bzw. c waren 1616, 1419 bzw. 1182. Zusammengefasst konnte man dadurch insgesamt 1809 verschiedene Proteine quantifizieren, von denen 1385 mindestens zweimal und 1024 Proteine unabhängig voneinander in allen drei Experimenten quantifiziert wurden. Das sind etwa 35% weniger Proteine die dreifach quantifiziert wurden als bei dem K562-Datensatz. Auch die Ausbeute bei den phosphorylierten Proteinen fällt geringer aus als bei den K562-Zellen. So wurden mit 833 Phosphoproteinen in allen drei Experimenten zusammen etwa 100 weniger quantifiziert verglichen mit der anderen Zelllinie. (s. Abb. 22).

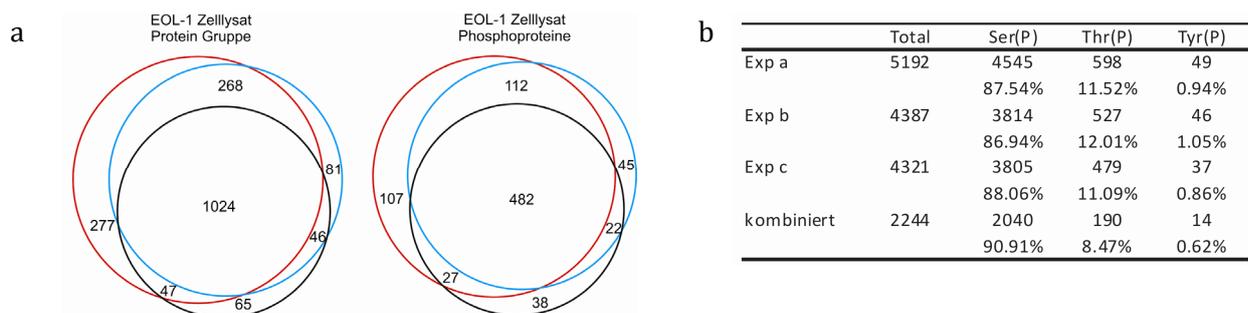


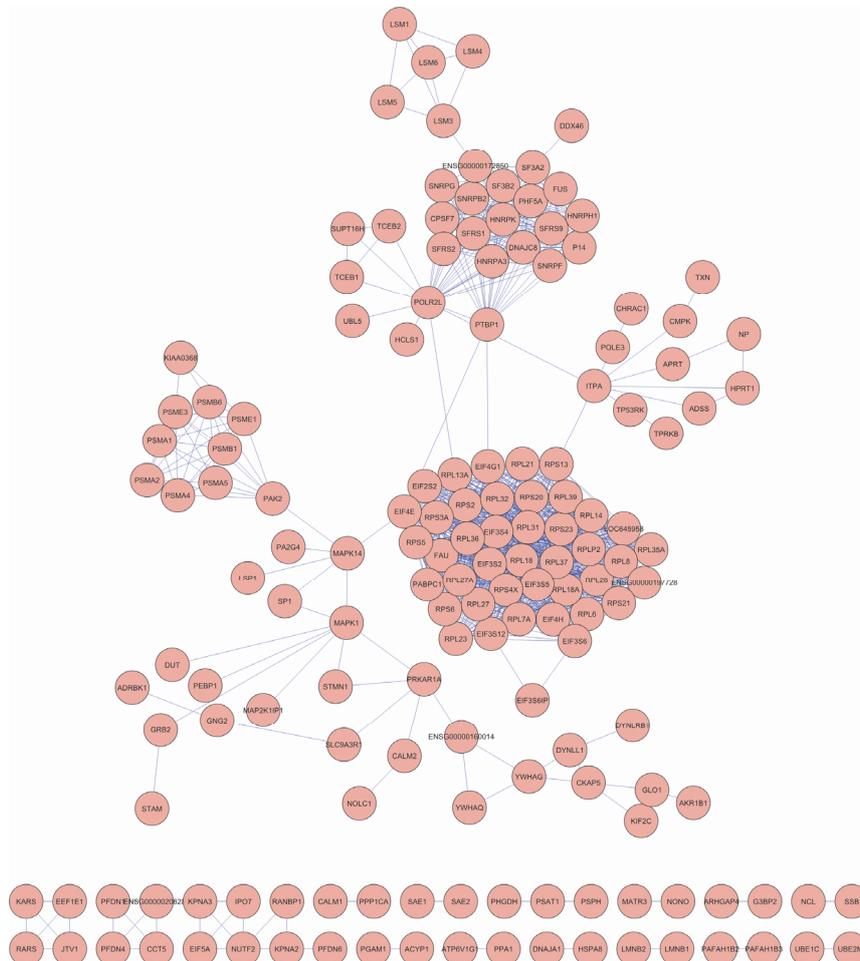
Abb. 22: Quantitative Auswertung des kompletten Zelllysate-Daten der EOL-1-Zelllinie. (a) Schematische Darstellung der Überlappung von quantifizierten Proteingruppen und Phosphoproteinen zwischen den einzelnen Experimenten in den EOL-1-Zellen. (b) Verhältnis der Aminosäuren an den Klasse I Phosphorylierungsstellen

Die Phosphorylierungsstellen auf den Phosphoproteinen waren hauptsächlich an Serin (min 86%) lokalisiert. Auch die Phosphothreonin- und Phosphotyrosinanteile (ca. 10% und 1%) weichen nicht stark von denen ab, die aus den K562 Daten hervorging. Betrachtet man die biologischen Prozesse in denen die Phosphoproteine involviert sind, fällt auf, dass diese Proteine überproportional stark an der Expressionskontrolle beteiligt sind. Dazu gehören die Prozesse wie Regulierung der mRNA Prozessierung, Translation und Proteinfaltung. Interessanterweise gab es auch biologische Prozesse, für die nur Phosphoproteine in K562 Zellen gefunden wurden, jedoch keine Phosphoproteine im EOL-1-Datensatz. Dabei handelt es sich um Proteine, die mit der Synthese, Degradation und Prozessierung von rRNA in Zusammenhang stehen bzw. an der mRNA-Polyadenylierung beteiligt sind.

Im Unterschied zu den K562-Zellen fand man bei den EOL-1-Zellen Imatinib-vermittelte Regulation von Proteinexpression. Nach zwei Stunden Behandlung mit Imatinib wurde u. a. *Snf2-related CBP activator* (SRCAP), die Metalloprotease ADAM17 und das Actin-bindende

4. Ergebnisse

Protein CORO1C bereits in deutlich geringeren Mengen detektiert. SRCAP ist bekannt dafür, dass es abhängig von ATP eine Chromatin-Umstrukturierung hervorruft und somit zu transkriptionellen Regulierung beiträgt. Durch die Hemmung von SRCAP wird die Transkription vom Steroidrezeptoren nicht aktiviert und es kann nicht als Coaktivator für CREB und Notch dienen (125). ADAM17 ist wahrscheinlich ebenso im Notch-Signalweg involviert. Außerdem ist ADAM17 an der proteolytischen Abspaltung von Zelloberflächen-Proteinen beteiligt, wie Interleukin 1 Rezeptor Typ II, p55 TNF-Rezeptor (126). CORO1C könnte in der Zytokinese und Signaltransduktion beteiligt sein. Nach 24h Behandlung mit Imatinib wurden eine Vielzahl von Proteinen reguliert. Insgesamt waren 360 Proteine in ihrer Expression signifikant reduziert. Davon sind 36% der Proteine im weiteren Sinne an der Kontrolle der Proteinexpression beteiligt (s. Abb. 23), z.B. ribosomale Proteine, Initiationsfaktoren der Translation, nukleäre Ribonukleoproteine und Splicingfaktoren. Zudem waren viele der regulierten Proteine an zellulären Transportprozessen beteiligt.



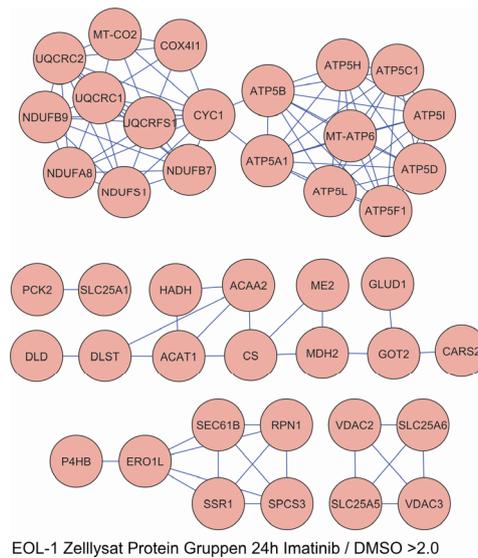
EOL-1 Zelllysate Protein Gruppen 24h Imatinib / DMSO <0.5

Abb. 23: STRING-basiertes Netzwerk aus allen Proteinen, die in den EOL-1-Zellen nach 24h Imatinibbehandlung weniger stark exprimiert wurden

4. Ergebnisse

Da Imatinib in EOL-1 Zellen Apoptose auslöst, wie es auch in der FACS-Analyse bestätigt wurde, ist es nicht verwunderlich, dass Prozesse wie Gentranskription und Translation der Proteine und ihr Transport in die jeweiligen Zielkompartimente reduziert wird.

Zudem wurde eine Reihe von Proteinen detektiert, die nach Imatinibbehandlung verstärkt auftraten (s. Abb. 24). Viele dieser Proteine waren mitochondrialen Ursprungs oder am Ionentransport beteiligt.



EOL-1 Zellysyt Protein Gruppen 24h Imatinib / DMSO >2.0

Abb. 24: STRING-basiertes Netzwerk aus allen Proteinen die bei den EOL-1 Zellen nach 24h Imatinibbehandlung hoch reguliert werden.

Unter den nach Imatinib stärker abundanten Proteinen waren 17% im Metabolismus von Ketokarbonsäuren beteiligt. Dazu gehörten die Proteine *Citrat-Synthase*, Dehydrogenasen wie *Glutamat-Dehydrogenase* und *Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase*.

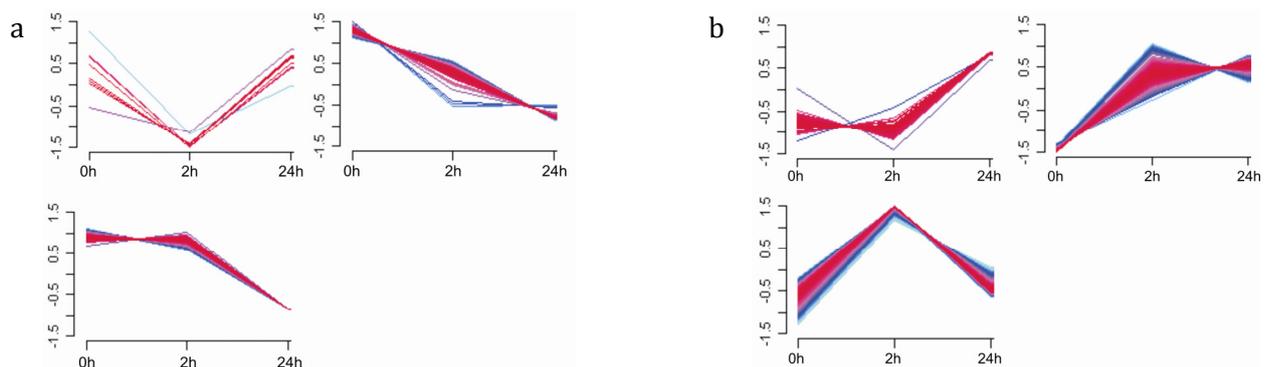


Abb. 25: Gruppierung der Proteine nach ihrem Verhalten auf Imatinibinkubation über die Zeit (a) Proteine mit einem reduzierten Level nach Imatinibbehandlung. (b) Proteine mit einem gesteigertem Level nach Imatinibbehandlung

Mittels *fuzzy c-means clustering* wurden die regulierten Proteine in Cluster eingeteilt und die einzelnen Cluster mittels *Gene Ontologie*-Analyse im Vergleich zum Gesamtdatensatz aller quantifizierten Proteine auf signifikant überrepräsentierte Prozesse hin charakterisiert. In Abbildung 25a sind alle Proteine zusammengefasst, deren zelluläre Abundanz nach

Imatinibbehandlung abnimmt. Im Cluster 1 befinden sich nur 8 Proteine. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur kurzzeitig durch Imatinib gehemmt werden (2h), aber nach 24h wieder das gleiche Level wie vor der Inkubation erreichen. Das Cluster 2 umfasst alle Proteine die bereits nach der kurzen Inkubation mit Imatinib gehemmt werden und diese Hemmung entweder beibehalten oder noch verstärkt wird. Diese Proteine sind vor allem in den biologischen Prozessen wie „Entstehung von Vorläufermetaboliten und Energie“, „zelluläre katabolische Prozesse“, „Translation“ und „Zellzyklus“ beteiligt. Das Cluster 3 definiert sich über eine Regulation der Proteine erst nach einer langen Inkubation mit Imatinib. Nach 2h ist so gut wie kein Effekt im Proteinlevel ersichtlich, die Proteine werden aber nach 24h deutlich gehemmt. Prozesse, die dadurch beeinflusst werden, sind jene wie Metabolismus von Nitrogenverbindungen, Genexpression, sowie generell biosynthetische Prozesse zellulärer Makromoleküle.

Auch die Proteine die eine Hochregulierung auf Proteinebene nach Imatinib erfuhren wurden der gleichen Analyse zugeführt. Im Cluster 1 findet man alle Proteine, die bei einer kurzfristigen Imatinibbehandlung keine Regulierung aufweisen, aber nach 24h deutlich hochreguliert werden. Die Proteine gehören zu biologischen Prozessen wie „Membran Organisation“, „Vesikel-vermittelter Transport“, sowie „negative Regulation der Apoptose“. Im Cluster 2 finden sich alle Proteine, die bereits früh ein erhöhtes Level aufweisen und diesen bis 24h aufrechterhalten. Hier sind die Proteine besonders in den Prozessen der „makromolekularen Lokalisation“, der „Antwort auf chemische Stimuli“, „metabolische Prozesse der Kohlenhydrate“ und „Proteinfaltung“ beteiligt. Im Cluster 3 sind alle Proteine zusammengefasst, die auf eine Imatinibbehandlung mit einem kurzzeitig erhöhten Level der Proteinmenge reagieren, aber nach 24h bereits ein normales Level wieder erlangen. Dazu gehören die Prozesse wie „Metabolismus von Makromolekülen“ wie „Nitrogenverbindungen und Proteine“, „Translation“, „RNA Prozessierung“ und „Regulierung des Zellzyklus“.

Es fällt auf, dass nur im EOL-1 Datensatz auf Proteinlevel Regulation auftrat. Von den 1385 mindestens zweifach detektierten Proteingruppen wiesen nahezu 550 Proteingruppen nach 24h geringere und 122 Proteine höhere Expressionslevel auf, während in K562-Zellen nahezu keine Proteinveränderungen nach 24h Behandlung mit Imatinib verzeichnet wurden (127). Es fiel weiterhin auf, dass die einzelnen Wiederholungsexperimente in den K562-Zellen bzgl. Der Quantifizierung weniger gut reproduzierbar waren als in den EOL-1-Zellen, so dass in K562 Zellen auch möglicherweise potentielle Proteinregulationen aufgrund der höheren biologischen Variabilität nicht als signifikant erkannt werden konnte.

4.2.3. Quantitative Phosphoproteomanalyse Imatinib-behandelter Zellen

Im Gegensatz zu den K562-Zellen findet man in den EOL-1 Datensatz eine Reihe von Proteinen die durch die Behandlung von Imatinib in ihrer zellulären Abundanz reguliert wurden. Vor diesem Hintergrund war es wichtig zu bestimmen, in welchem Maße dies in die Phosphopeptid-basierte Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen einging. Beispielsweise könnte eine Phosphopeptidreduktion entweder auf eine insgesamt geringere Proteinexpression oder auf zelluläre Dephosphorylierung zurückzuführen sein. Falls Ersteres der Fall ist, ist eine Normalisierung von Phosphorylierungsänderungen auf geänderte Proteinabundanz sinnvoll. Es kann jedoch nicht für jede quantifizierte Phosphorylierungsstelle auch das korrespondierende Proteinverhältnis ermittelt werden und somit würden viele Phosphorylierungsstellen unnormalisiert bleiben. Eine weitere Möglichkeit ist, generell die Auswirkung der Proteinregulation auf die quantifizierte Phosphoregulation zu analysieren. Dies kann im Scatterplot (s. Abb. 32) visualisiert werden, in dem die unnormalisierten Werte für die Phosphorylierungsstellen gegen die auf Proteinabundanz normalisierten Phosphorylierungswerte aufgetragen werden. Sind dabei die meisten Datenpunkte nahe einer der diagonalen Linie, die die x- und y-Achse im 45° Winkel schneidet, so kann man davon ausgehen, dass die unnormalisierten nicht stark von den normalisierten Werten abweichen. Trotz der beobachteten Proteinregulation war dies für die Mehrzahl der EOL-1 Phosphoprotein der Fall, so dass die quantifizierten Phosphorylierungsstellen des EOL-1 Datensatzes im Weiteren unnormalisiert verwendet wurden. Genauso wurden die Phosphorylierungswerte der K562-Zellen nicht durch die Proteinwerte normalisiert, jedoch hier lag auf der Ebene der Proteine keine Regulation vor. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die veränderte Proteinexpression kaum eine Rolle spielt und Phosphorylierungsstellen der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse reguliert wurden.

4. Ergebnisse

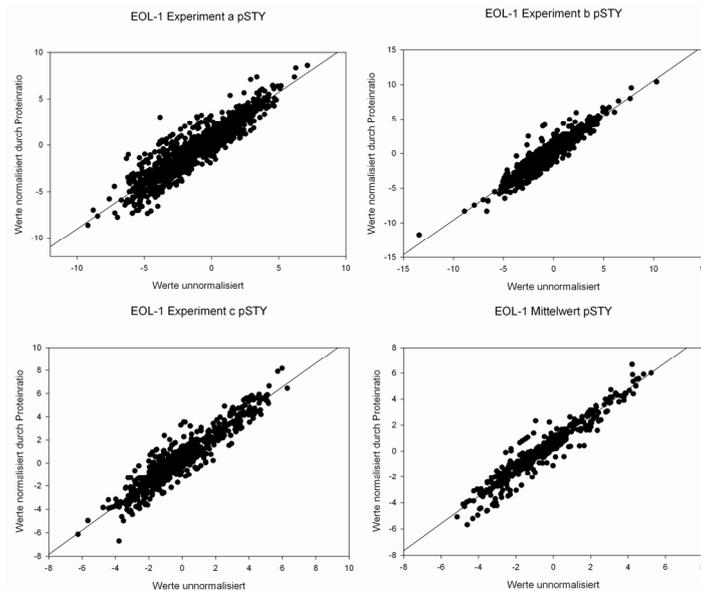


Abb. 26: Scatter Plot. Vergleich der unnormalisierten Werte für die Phosphorylierungsstellen und der anhand der Proteinratios normalisierten Werte für die quantifizierten Phosphorylierungsstelle in EOL-1 Zelllinien.

Insgesamt wurden in K562Zellen etwas mehr Phosphorylierungsstellen als in EOL-1-Zellen quantifiziert, wobei auch insbesondere die Überlappung zwischen den biologischen Wiederholungsexperimenten in den K562-Zellen größer war (s. Abb. 26).

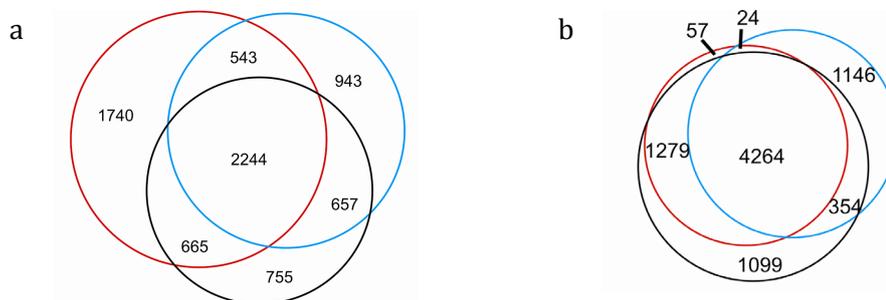


Abb. 27: Schematische Darstellung des quantitativen Verhältnisses der Klasse I Phosphorylierungsstellen. (a) Verteilung der Phosphorylierungsstellen in den Experimenten von EOL-1 und (b) Verteilung der Phosphorylierungsstellen in den Experimenten von K562

Betrachtet man die regulierten Phosphorylierungen nach 2h Behandlung mit 10 μ M bzw. 100 nM Imatinib wurden weitere Unterschiede zwischen K562 und EOL-1 offensichtlich. Bei den K562-Zellen waren nur 33 Phosphorylierungsstellen in den Experimenten übereinstimmend inhibiert.

4. Ergebnisse

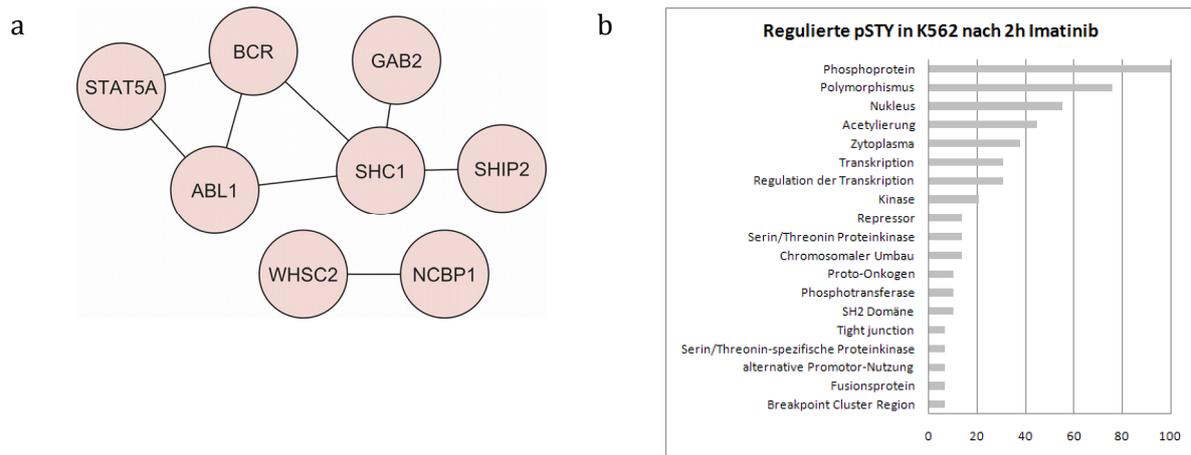


Abb. 28: In K562 inhibierte Phosphorylierungsstellen nach 2h Imatinibbehandlung (a) Proteine mit reduzierter Phosphorylierung bilden ein Netzwerk aus. (b) Einteilung der Phosphoproteine mit nach 2h Imatinibbehandlung gehemmten Phosphorylierungsstellen aus den K562-Zellen in funktionelle Kategorien entsprechend ihrer gene-ontology Annotationen

Während in den EOL-1-Zellen bei gleicher Inkubationsdauer 63 Phosphorylierungsstellen übereinstimmend gehemmt vorlagen, jedoch ordneten sich im Gegensatz zu K562 die regulierten Phosphoproteine nicht in ein zusammenhängendes Netzwerk ein. Die in EOL-1-Zellen regulierten Phosphoproteine lassen sich in verschiedenen funktionellen Kategorien zuordnen (Abb. 29a) und sind oftmals an der Regulation der Genexpression sowie an Spleißvorgängen beteiligt.

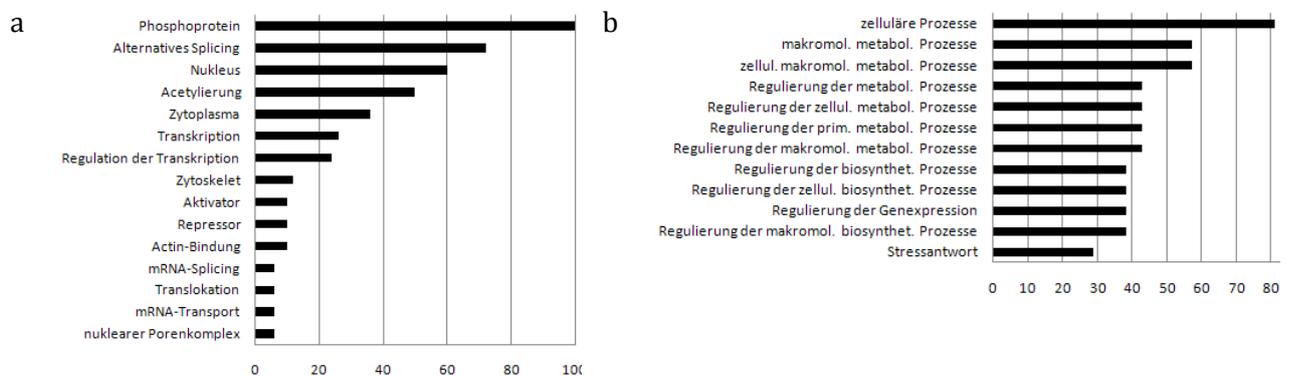


Abb. 29: Genontologie-basierte Einteilung der nach 2h Imatinibbehandlung regulierten Phosphoproteine in den EOL-1-Zellen in Kategorien. (a) Einteilung der dephosphorylierten Proteine in funktionelle Kategorien. (b) Einteilung der Proteine mit hochregulierten Phosphorylierungsstellen in biologische Prozesse.

Die wenigen Phosphorylierungsstellen, die in beiden Zelllinien übereinstimmend nach 2h Imatinib gehemmt vorlagen, waren S5 auf dem Protein *lymphocyte cytosolic protein 1* (LCP1) sowie S236 des *ribosomale Protein S6* (RPS6). LCP1 bindet Actin und ist an der Aktivierung von T-Zellen als Antwort auf die Costimulierung durch TCR/CD3 und CD2 oder CD28 involviert und verändert die Zelloberflächenexpression von IL2RA/CD25 und CD69 (128). Die Phosphorylierungsstelle S5 ist unter anderem an der Regulation der Zelladhäsion und der

4. Ergebnisse

zytoskeletalen Reorganisation zuständig. Bei RPS6 wird vermutet, dass es in der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation eine Rolle spielt, indem es die Translation bestimmter mRNA Klassen kontrolliert. Außerdem ist es Teil des mTOR-Signalweges und reguliert darüber die Apoptose. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass S236 die molekulare Assoziationen reguliert.

Nach 2h Imatinibbehandlung waren im K562 Datensatz keine Phosphorylierungsstellen hoch reguliert. Im Gegensatz dazu waren in EOL-1-Zellen 26 Stellen übereinstimmend in den Experimenten hoch reguliert. Jedoch bildete sich auch hier kein zusammenhängendes Netzwerk gemäß der STRING Analyse aus. Acht der induzierten Phosphoproteine (kodiert von den Genen ZNF326, RREB1, C11ORF30, GTF2F1, HSPB1, SAP30L, PRKCD, MYBBP1A) sind in der Regulierung der Genexpression involviert, die Proteine LSP1, CUL4A, C11ORF30, PDGFR α , HSPB1 und IPCEF1 gehören zu den Prozessen die auf Stress antworten. Jedoch fällt auf, dass die Hälfte aller kategorisierter Proteine an metabolischen Prozessen beteiligt sind. Obwohl das Protein PDGFR α ein direkter Bindungspartner von Imatinib ist, findet man neben der dephosphorylierten Y742-Stelle, die für die molekulare Assoziation zuständig ist, die hoch regulierte Stelle S767. Jedoch ist bei letzterem keine regulatorische Funktion bekannt.

Tabelle 1: Übereinstimmend inhibierte Phosphorylierungsstellen nach 24h Imatinibbehandlung

IPI Nummer	Genname	Aminosäure	Position	K562-Wert	σ (K562)	EOL-1-Wert	σ (EOL-1)
IPI00021812	AHNAK	S	135	0.227	0.07	0.120	0.04
IPI00306195	AKT1S1	T	266	0.479	0.04	0.080	0.07
IPI00007722	AMPD2	S	168	0.476	0.17	0.321	0.01
IPI00012788	CD3EAP	S	130	0.317	0.13	0.107	0.06
IPI00004924	DEF6	S	590	0.468	0.13	0.151	0.04
IPI00552639	EIF4G1	S	1232	0.271	0.05	0.136	0.10
IPI00301248	EVI2B	S	268	0.341	0.13	0.075	0.03
IPI00552881	FUNDC2	S	180	0.491	0.16	0.100	0.07
IPI00013439	JUNB	S	259	0.224	0.06	0.062	0.03
IPI00872997	KIF21B	S	1167	0.406	0.13	0.337	0.13
IPI00294742	LARP7	S	307	0.381	0.01	0.210	0.10
IPI00010471	LCP1	S	5	0.472	0.10	0.092	0.04
IPI00410590	LSM14A	S	178	0.422	0.17	0.035	0.01
IPI00219497	MYB	S	653	0.259	0.05	0.495	0.18
IPI00033016	MYC	S	359	0.494	0.12	0.157	0.00
IPI00001654	PCM1	S	93	0.487	0.05	0.431	0.02
IPI00183002	PPP1R12A	S	507	0.455	0.13	0.055	0.01
IPI00021840	RPS6	S	236	0.385	0.05	0.037	0.01
IPI00020898	RPS6KA3	S	369	0.213	0.14	0.183	0.11
IPI00020898	RPS6KA3	T	365	0.103	0.02	0.183	0.11

Nach 24h ist erwartungsgemäß die Regulation deutlicher ausgeprägt. Vergleicht man den Datensatz der K562-Zelllinie mit dem der EOL-1-Zelllinie findet man 20 verschiedene Phosphorylierungsstellen die in beiden Zelllinien eine Sensitivität für Imatinib aufweisen (s. Tabelle 1). Auffällig ist, dass diese Phosphorylierungsstellen nur aus Serin oder Threonin und nicht aus Tyrosin bestehen. Zu den Proteinen mit einer sensitiven Phosphorylierungsstelle gehört z.B. das *ribosomale Protein S6*, dem eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Zellwachstum und Proliferation zugesprochen wird, indem es selektiv verschiedene mRNA-Klassen translatiert. Die Stelle S236 die eine Dephosphorylierung nach der Imatinibbehandlung aufweist, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der molekularen Assoziation und wird vermutet, dass es bei Phosphorylierung die Bindung von mRNA erhöht. Ebenso hat die *ribosomalen S6 Kinase 2* eine gehemmte Stelle bei S369. Dieses Protein wird durch ERK1 und 2 als Antwort auf viele Wachstumsfaktoren, Polypeptidhormone und Neurotransmitter phosphoryliert (129). Die Stelle S369 reguliert die Transkription, für die zweite gehemmte Stelle an T365 ist noch keine funktionelle Regulation beschrieben worden. Daneben gibt es noch vier Transkriptionsfaktoren mit sensitiver Phosphorylierungsstelle. Das JUNB Proto-Onkogen reagiert auf primäre Wachstumsfaktoren und aktiviert die Transkription, nach 24h Imatinibbehandlung zeigt das Protein eine Dephosphorylierung an der Stelle S259. Das *La ribonucleoprotein domain family member 7* (LARP7) gilt als negativer Transkriptionsregulator der Polymerase II Gene und weist eine sensitive Stelle an S307 auf. Die viralen Onkogene MYB und MYC gehören ebenfalls zu der Gruppe der Transkriptionsfaktoren mit einer gehemmten Phosphorylierungsstelle an S653 bzw. S359. Jedoch konnte an keiner dieser Stellen eine funktionelle Regulation festgestellt werden, die für die Aktivität der Protein wichtig ist. Am mTOR-Signalweg sind eine Reihe von Proteinen beteiligt. Dieser Signalweg reguliert die Translation von Proteinen die das Zellwachstum und den Zellzyklus steuern. Beeinflusst wird mTOR über Wachstumsfaktoren, den Energiehaushalt und durch die Sauerstoffkonzentration der Zellen (130). Neben RPS6KA3 und RPS6 sind noch die Proteine *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent guanine nucleotide exchange factor* (DEF6, S590), das *Proline-rich AKT1 substrate 1* (AKT1S1, T266) und das *eukaryotic translation initiation* Protein (EIF4G1, S1232) mit einer sensitiven Phosphorylierungsstelle vertreten. Auch Protoonkogene wie *ecotropic viral integration site 2B* (EVI2B, S268) und der Zellzyklusregulator *Pericentriolar material 1 protein* (PCM1, S93) und das *cervical cancer oncogene 3* (FUNDC2, S180) zeigen eine Dephosphorylierung nach Imatinibbehandlung. Auch andere Proteine die im Metabolismus beteiligt sind, wie das *CD3-epsilon-associated Protein* (CD3EAP, S130), oder die *AMP Deaminase* (AMPD2, S168), *Kinesin-like protein* (KIF21B, S1167) oder *Neuroblast differentiation-associated protein* (AHNAK, S135), *Actin-binding protein* (LCP1, S5) und die *Myosin-Phosphatase*

4. Ergebnisse

(PPP1R12A, S507) wurden durch Imatinib dephosphoryliert. Aber auch hier sind den Phosphorylierungsstellen keine funktionelle Bedeutungen zugeordnet worden.

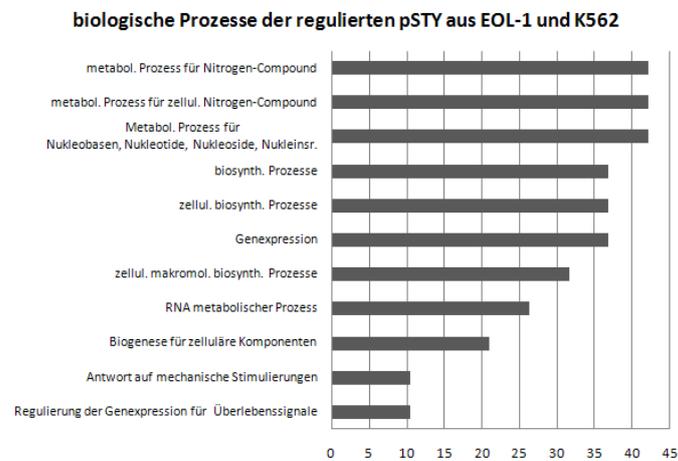


Abb. 30: Einteilung der übereinstimmend regulierten Phosphorylierungsstellen aus beiden Zelllinien in biologische Prozesse.

Daneben gibt es nach 24h Imatinibbehandlung weitere 91 dephosphorylierten Stellen auf 72 verschiedenen Proteinen, die nur in den K562-Zellen gehemmt vorkommen.

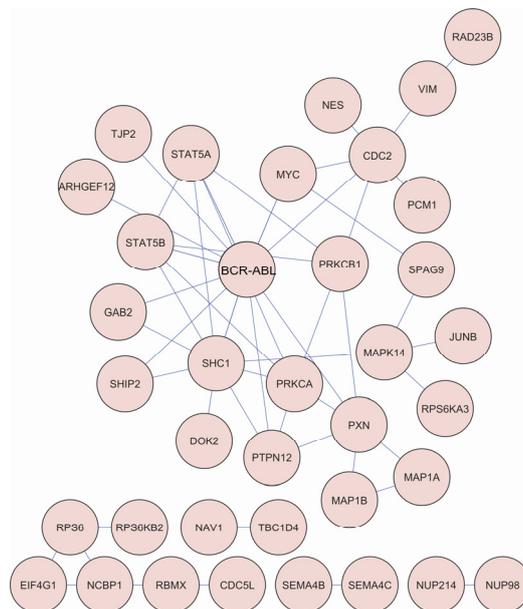


Abb. 31: Netzwerk aus allen K562 Proteinen mit einer sensitiven pSTY-Stelle nach Behandlung für 24h mit Imatinib

Zu diesen sensitiven Phosphorylierungsstellen zählen vor allem Proteine die direkte Bindungspartner vom Fusionsprotein BCR-ABL sind (s. Abb. 31). Dazu gehören die *signal transducer and activator of transcription 5 A* und *B* (STAT5A, B), GAB2, SHIP2, SHC1 und PRKCA. Nur sechs Phosphorylierungsstellen aus dem kompletten Zelllysate der K562-Zellen stimmten auch mit dem Kinase angereicherten Datensatz überein, dazu gehörten die

4. Ergebnisse

Phosphorylierungsstellen auf den Proteinen von BCR-ABL, LYN, REPS1, RPS6KA3 und SHC1. BCR war an der Stelle Y644 in der RhoGEF-Domäne gehemmt. Da BCR eine Serin/Threonin Kinaseaktivität besitzt und durch GTPasen wie RAC1 und CDC42 aktiviert wird (131), könnte diese Stelle in der Guaninnukleotid-Austauschdomäne wichtig sein für die Aktivität des Proteins. Bei dem Protein SHC1 lag an der Stelle Y428 nach Imatinibeeinfluss dephosphoryliert vor. Dieses Protein besitzt als Adaptorprotein eine SH2-Domäne und eine Phosphotyrosin-Bindungsdomäne. Die Stelle Y428 liegt zwischen diesen beiden Domänen und ist bekannt dafür wichtig für die Regulation der Apoptose, des Zellwachstums, der Zellmotilität und der molekularen Assoziation zu sein (132).

Bei den EOL-1 verteilen sich die 1289 Klasse I Phosphorylierungsstellen auf 800 Proteine.

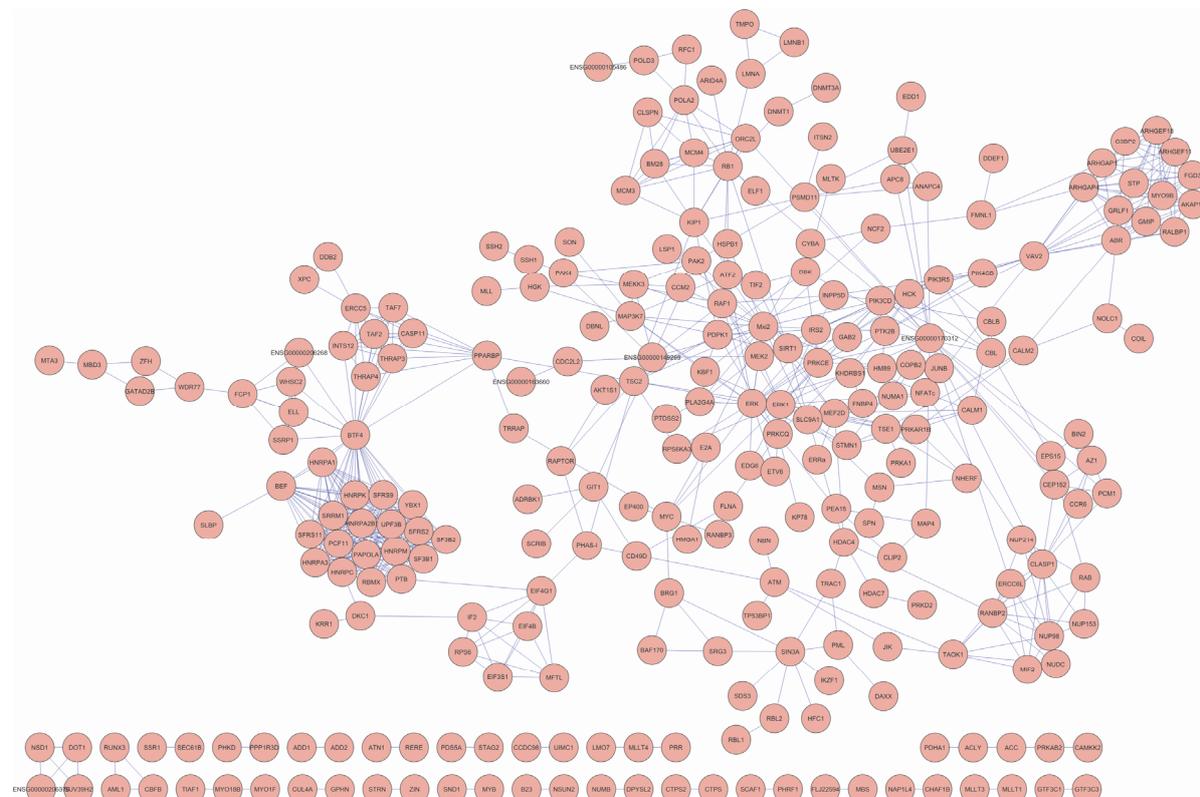


Abb. 32: Netzwerk aus allen signifikanten dephosphorylierten Proteinen die in den EOL-Zellen nach 24h Imatinibbehandlung entdeckt wurden.

Unter den Proteinen mit einer sensitiven Phosphorylierungsstelle befinden sich auch 14 Proteine (ATM, B23, DIDO1, EAF2, EDD1, GRLF1, MYO18B, PDCD4, RB1, SDS3, TP53BP1, TP53BP2, TSC2, URB1) die mit einer Tumorsuppressor Funktion belegt sind. Bei dem *Nucleolar Phosphoprotein* B23, das in der Kontrolle der Zentrosomenverdopplung und in der Aktivierung der Translation eine Rolle spielt, wurde eine Phosphorylierungsstelle (T234) gehemmt die den Zellzyklus und die molekulare Assoziation reguliert (133). Der Tumorsuppressor PDCD4 interagiert direkt mit der RNA-Helikase eIF4A und kann durch die

Bindung an dem Initiationskomplexes die Translation unterbinden. Nach der Imatinibbehandlung wurde die wichtige Phosphorylierungsstelle S457 gehemmt, die normalerweise für Veränderung der intrazellulären Lokalisation verantwortlich ist (134). Das *Retinoblastoma Tumorsuppressor-Protein* Rb1 wirkt regulierend auf die Zellproliferation ein, indem es in der G1-Phase die Entwicklung kontrolliert. Die dephosphorylierte Stelle T826 ist dafür verantwortlich, das Zellwachstum und die molekulare Assoziation zu kontrollieren (135). Der Tumorsuppressor *Tuberin* (TSC2) beeinflusst die Signalkaskade von mTOR indem es bereits den Signaleingang blockiert. Die Phosphorylierungsstelle S1799 wurde nach 24h Imatinibbehandlung gehemmt und ist normalerweise für die Inhibierungsfunktion zuständig (136). Neben den Tumorsuppressorproteinen gibt es im Datensatz auch Protoonkogene die nach 24h Imatinibeinwirkung dephosphoryliert werden. Von diesen 15 Protoonkogenen (AFF1, AFF3, AKAP13, AML1, CBL, CBLB, CCNL1, EVI9, FLI1, MYB, MYC, RAB8A, RAF1, RUNX3, SLC4A1AP) gibt es das RAF1 Protoonkogen, dass bei Aktivierung das Protein MEK1 und 2 phosphoryliert, aktiviert und darüber ERK1 und 2 aktiviert und phosphoryliert wird. Die Stelle S296 auf dem Protein ist für die enzymatische Aktivierung sowie für die Inhibierung als auch für die Regulation der molekularen Assoziation zuständig (27).

Um die Datensätze der beiden Zelllinien besser vergleichen zu können, wurden die Phosphoproteine in biologische Prozesse eingeteilt. Dazu wurden bei den K562-Zellen alle 1145 identifizierten Phosphoproteine und bei den EOL-1-Zellen alle 833 identifizierte Phosphoproteine mittels dem Programm *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) Version v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) analysiert. Mit Hilfe dieses Internetprogramms wurde die *Gene Ontology*-Anreicherungsanalyse über die biologischen Prozesse mit dem EASE-Algorithmus (signifikant < 0,05) durchgeführt. Als Hintergrund diente das gesamte humane Proteom. Betrachtet wurden dabei nur die Proteine die mit einem p-Value kleiner als 0,05 zu den jeweiligen Kategorien eingeordnet wurden. Das Interesse galt außerdem nur den biologischen Prozesse die in den Datensätzen eine mindestens zweifache Überrepräsentation im Vergleich zu dem gesamten Proteom aufweisen konnten.

Die Übereinstimmung in den biologischen Prozessen war bei den Phosphoproteinen stark ausgeprägt. Fast 300 Kategorien trafen auf beide Zelllinien zu und nur 150 Prozesse waren spezifisch für eine der beiden Zelllinien (s. Abb. 33). Die Divergenz war allerdings bei den dephosphorylierten Proteinen deutlich ausgeprägter. Nur 56 Prozesse waren sowohl in den K562 als auch in den EOL-1-Zellen involviert. Der weitaus größerer Teil der biologischen Prozesse waren spezifisch für die sensitiven Proteine der EOL-1-Zelllinie (238 Kategorien) bzw. für die K562-Zelllinie (61 Kategorien).

4. Ergebnisse

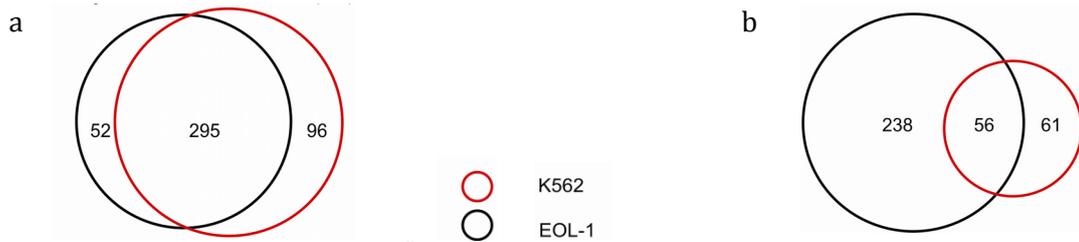


Abb. 33: Quantitative Auswertung der Übereinstimmung in den biologischen Prozessen. (a) Einteilung aller Phosphoproteine in biologische Prozesse (b) Einteilung der nach 24h dephosphorylierten Proteine in biologische Prozesse.

Die biologischen Prozesse, die in beiden Leukämiezelllinien dephosphorylierte Proteine aufwiesen (s. Abb. 34), beeinflussen die Genexpression über die Prozesse des „RNA-Metabolismus“, den „Transport der mRNA aus dem Nukleus“, dem „RNA Splicing“, der „Translation“ und weitere „RNA metabolische Prozesse“, sowie über Proteine die in der „Translation“ involviert sind. Andere biologische Prozesse, wie die Proteinmodifikation, inklusive Proteine die an der „Faltung“, der „Markierung“, der „Komplexbildung“ sowie dem „Transport von Proteinen zu bestimmten Organellen“ oder dem „Ubiquitin-vermittelten Abbau“, weisen eine Runterregulierung auf der Phosphorylierungsebene auf. Ebenfalls durch Imatinib beeinflusst werden Proteine die die Chromosomenstruktur über die „Organisation“, „Replikation“ und „Rekombination“ prägen. Aber auch biologische Prozesse wie „Glykolyse“, „Alkoholabbau“ und „Mitose“ enthalten dephosphorylierte Proteine. All diese biologischen Prozesse werden durch die Behandlung von Imatinib in beiden Leukämiezellen beeinflusst. Das bedeutet, dass die lebenserhaltenden Prozesse der Zelle wie die Energieversorgung durch den Abbau energiereicher Verbindungen eingeschränkt ist, genauso wie die komplette Genexpression und die Zellteilung.

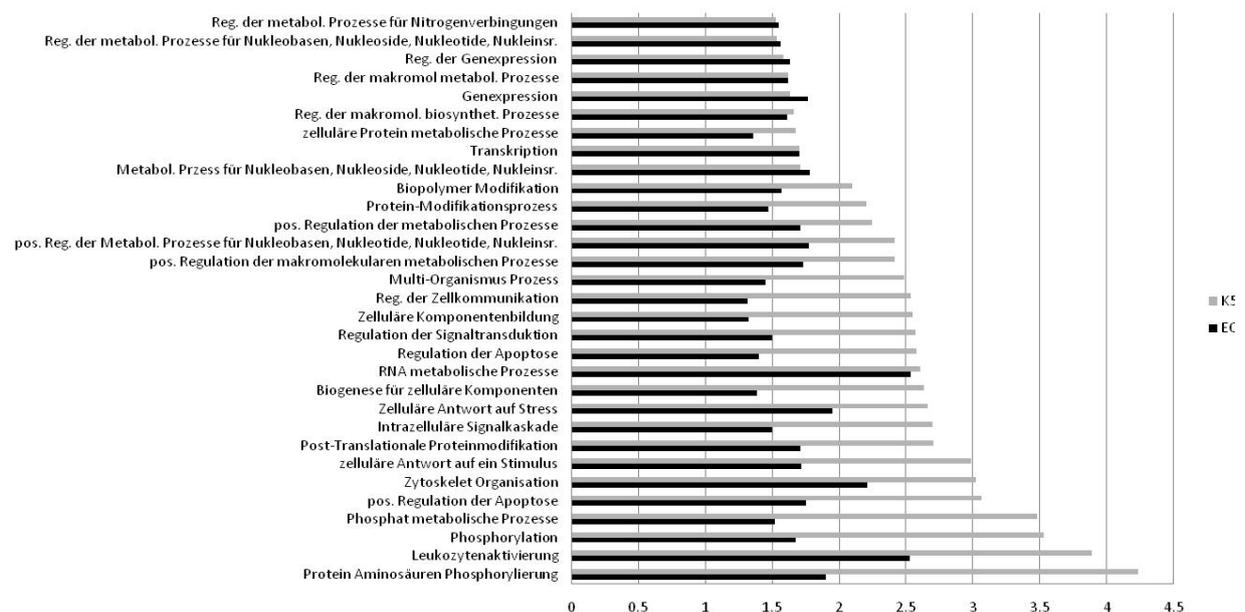


Abb. 34: Biologische Prozesse aller nach 24h dephosphorylierte Proteine die in beiden Leukämiezelllinien

identifiziert wurden.

Biologische Prozesse die nur in den K562 Zellen sensitive Phosphorylierungsstellen aufweisen, sind an der „Zellantworten auf Stress“ wie „oxidative Verbindungen“ und „Temperaturen die Apoptose auslösen können“ involviert, auch der „Auf- und Abbau von Aktin und Mikrotubuli“ weist dephosphorylierte Proteine auf. Es finden sich auch sensitive Proteine die in der „Immunantwort mit natürlichen Killerzellen gegen Viren“, an dem „viralen mRNA Export“, an der „Interaktion zwischen Wirt und Virus“ sowie an anderen Virusinfektionsschritten vorkommen.

Bei den EOL-1 Zellen findet man dephosphorylierte Proteine in biologische Prozesse die für den „Zuckermetabolismus“, „Antwort auf reaktive Teilchen“ wie „UV Schutz oder Schutz vor reaktive Sauerstoffteilchen und Hydrogenperoxid“ beteiligt sind. Aber auch Prozesse wie „Proteinpolymerisierung und -metabolismus“ und Prozesse zur „Erhaltung der Erythrozyten“ haben Imatinib sensitive Proteine.

Ein auffälliger Unterschied des EOL-1 Datensatzes im Vergleich zu den K562-Daten liegt in der Beeinflussung von drei wichtigen Signalwegen. Proteine aus dem EOL-1 Datensatz mit einer Dephosphorylierung an regulatorisch wichtigen Stellen kommen als Mediatoren in dem mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalweg (MAPK-Signalweg) auf dem *activating transcription factor 2* (ATF2; T69), der *extracellular signal-regulated Kinase 1/2* (ERK1/2; T202, Y204, T187), dem *Leukemia-associated Phosphoprotein p18* (STMN1; S16, S25), der *MAP-Kinase p38 alpha* (MAPK14; Y182), der Proteinkinase PAK1 (S174, S82), dem *heat shock 27kD protein 1* (HSP27; S82) und dem Onkogen RAF1 (S296) vor. Des Weiteren findet man wichtige sensitive Phosphorylierungsstellen im mTor-Signalweg auf dem *Tuberin Suppressorprotein* (TSC2; S1799), dem eukaryotischen Translation-Initiationsfaktor 4B (eIF4B; S422), dem eIF4E-Bindungsprotein 1 (4E-BP1; S65), dem *ribosomale Protein S6* (RPS6; S236), der AGC-S6-Kinase RSK2 (S369) und der AGC-Kinase PDK1 (S241) reguliert vor. Als letztes findet man Phosphorylierungsstellen mit regulatorischen Funktionen auf den Proteinen *Retinoblastoma Protein 1* (RB1; T826), *Retinoblastoma-related Protein 2* (Rb-like 2; S413, S417), *Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor 1B* (CDKN1B; S10) und *nucleolar Phosphoprotein B23* (T234) und beeinflussen darüber den Zellzyklus.

5. Diskussion

Unbehandelt hat ein Patient mit Leukämie eine Überlebenswahrscheinlichkeit von wenigen Jahren. Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) lassen sich drei Phasen unterscheiden. Die erste Phase ist weitestgehend symptomfrei und kann einige Jahre andauern. Hier häufen sich allmählich die myeloischen Vorläuferzellen und die ausgereiften Krebszellen im Knochenmark, im peripheren Blut und an anderen Stellen außerhalb des Knochenmarks an. Der Übergang zur Akzelerationsphase, in der es zu einer Anhäufung der Krankheitssymptome und undifferenzierter Zellen kommt, ist fließend. Diese Phase dauert meist vier bis sechs Monate bevor die letzte Phase der Blastenkrise beginnt. Hier kommen die myeloischen oder lymphatischen undifferenzierten Zellen in einer sehr großen Anzahl vor und infiltrieren Gewebe und Organe, in denen sich dann die undifferenzierten Zellen zu Zellaggregaten formieren. Dies führt unweigerlich zum Tod des Patienten (137). Meist geht die CML mit dem Philadelphia-Chromosom einher, dass durch die reziproke Translokation der Chromosomen 22 und 9 entsteht. Durch diese Mutation entsteht das Fusionsprotein BCR-ABL, das ein konstitutiv aktives Onkoprotein ist. Dieses Onkoprotein war aufgrund seines Auftretens in CML ein ideales Ziel zur Entwicklung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib. Durch die Einnahme von Imatinib bei CML-Patienten kann die letzte Phase der Blastenkrise bei den meisten Patienten um mehrere Jahre verzögert werden. Imatinib ist meist nicht in der Lage alle Leukämiezellen abzutöten, so dass immer Krebszellen nachweisbar bleiben und sich insbesondere in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien leicht Resistenzen gegen den Inhibitor ausbilden können. Um diese Probleme zu lösen wurden bereits verschiedene Strategien angewendet, wie Konzentrationssteigerung des Inhibitors, was aber mit starken Nebenwirkungen beim Patienten einhergehen kann, Kombinieren von mehreren Wirkstoffen, Verwendung neuer BCR-ABL Inhibitoren oder Hemmung von neuen wichtigen Zielproteinen (137).

Resistenzen gegenüber Imatinib entstehen häufig dadurch, dass Punktmutationen in der Kinasedomäne von BCR-ABL auftreten. Generell ist jede Mutation kritisch, die die aktive Konformation des Fusionsproteins stabilisiert oder die inaktive destabilisiert. Viele dieser Mutationen befinden sich in der Aktivierungsschleife und führen oft zu einer verringerten Sensitivität gegen Imatinib. Eine andere Möglichkeit der Resistenzbildung besteht in Mutationen, die die Struktur der Kinasedomäne dahingehend beeinflussen, dass die optimale Adaption an die Imatinibbindung verhindert wird. Meistens liegt diese Art von Mutationen in der P-Schleife der Kinase. Ein dritter möglicher Mechanismus des Resistenzmechanismus entsteht durch Punktmutationen an Stellen, die kritisch bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sind bzw. Aminosäuren mit einer raumgreifenden Seitenkette an

der Imatinib-Bindungsstelle kodieren, wodurch die Bindung des Inhibitors sterisch nicht mehr möglich ist. Zu den bekannten Punktmutationen, die solche Resistenzen auslösen können, zählen G250E, Q252H, Q252R, Y253F, Y253H, E255K, E255V, T315I, F317L, M351T und E355G. Außerdem wurde in Experimenten festgestellt, dass die BCR-ABL Kinaseaktivität im direkten Zusammenhang mit der Punktmutationsrate steht. Als Nebenprodukt der onkogenen Kinase entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen die selbst Punktmutation auslösen können. Daher ist es wichtig, so früh wie möglich mit der Therapie zu beginnen bevor sich die Mutationen im Onkogen anhäufen können, um so eine möglichst hohe Überlebensrate der Patienten zu sichern. Je später jedoch die Therapie angefangen wird, desto schwerer wird eine erfolgreiche Therapie und desto wahrscheinlicher ist es, dass sich bereits Resistenzen gegen Imatinib etabliert haben (138). Daher wurden bereits Nachfolgesubstanzen entwickelt, die gegen Imatinib-resistente BCR-ABL Mutanten wirksam sind (z.B. Dasatinib, Nilotinib). Aber auch diese Substanzen sind nicht gegen jede Resistenz wirksam. Für diese Fälle braucht man andere Medikamente, die nicht nur an BCR-ABL binden, sondern auch andere wichtige Enzyme hemmen können, die z.B. in den Leukämiezellen Signale von BCR-ABL übertragen. Daher war das Ziel dieser Arbeit weitere Proteine mit Mediatorfunktionen systematisch zu identifizieren, die an von BCR-ABL ausgelösten Signalübertragungsvorgängen beteiligt sind.

Eine wichtige Voraussetzung bei der Analyse der Auswirkung von Imatinib auf Leukämiezellen ist die Wahl der richtigen Konzentration des Inhibitors. Der IC_{50} -Wert für BCR-ABL variiert von 0,25 - 0,5 μ M in den Zelllinien. Für andere Bindungsproteine z.B. für PDGFR α liegen die IC_{50} -Werte bei 0,01 μ M für die Inhibierung der zellulären Tyrosinphosphorylierung. Daher wurde für die Imatinibkonzentrationen in den K562-Zellen 10 μ M für die vollständige Hemmung der Kinaseaktivität des BCR-ABL-Fusionsproteins und 100 nM für die vollständige Hemmung der Kinaseaktivität des FIP1L1-PDGFR α -Fusionsproteins gewählt (44).

5.1. Kinaseanreicherung

Es ist sehr wichtig, alle direkten zellulären Bindungspartner eines Inhibitors zu kennen, um im Krankheitsfall den richtigen Inhibitor einsetzen zu können und um durch die Dosierung schädigende Nebeneffekte zu minimieren. Um direkte Bindungsproteine von niedermolekularen Inhibitoren mit der MS identifizieren zu können, wurden immobilisierte Inhibitoren für die affinitätschromatographische Aufreinigung zellulärer Zielproteine (=Targets) verwendet (139). Dabei konnte das komplette Zelllysate eingesetzt werden und insbesondere auch Proteine analysiert werden, die nur in geringer Menge in der Zelle vorkommen. Zur Immobilisierung war es nötig, dass die Liganden über eine funktionelle Gruppe

in bioaktiver Form an z.B. Agarose-Beads gekuppelt werden konnten (140). In der hier vorliegenden Studie wurde eine Reihe von Inhibitoren, die vorrangig mit Proteinkinasen interagieren, zur möglichst breiten Vorfraktionierung von Proteinkinasen verwendet.

In unserem Ansatz hatten wir drei verschiedene Zellpopulationen mit unterschiedlichen Imatinibkonzentrationen behandelt und dann das Kinase-Subproteom einzeln im Batch-Verfahren über die immobilisierten Kinaseinhibitoren angereichert.

Durch die Verwendung von SILAC als Methode zur metabolischen Proteinmarkierung war es möglich, bereits nach der Affinitätsaufreinigung aus den Lysaten unterschiedlich Imatinib-behandelter Zellpopulationen und vor der eigentlichen MS Probenvorbereitung zu poolen. Dadurch verringerten sich die Fehler, die sich durch parallele Prozessierung einschleichen und die Ergebnisse der quantitativen Experimente aus der hoch sensitiven MS beeinflussen könnten.

5.1.1. Direkte Inhibierung auf Proteinebene

Mit der Affinitätsaufreinigung im Batch-Verfahren waren wir in der Lage, bekannte direkte Bindungsproteine von Imatinib wie BCR-ABL, NQO2 und DDR1 nachzuweisen. Hierbei standen über 180 Proteinkinasen für die quantitative Analyse zur Verfügung und in beiden Experimenten zusammen wurden mehr als 1800 Phosphorylierungsstellen quantifiziert. Daher konnte mehr als die Hälfte des exprimierten Kinoms analysiert werden, das auf ca. 300 Proteinkinasen pro Säugerzelle geschätzt wird (82). Des Weiteren war eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den affinitätschromatographischen Experimenten in K562 Zellen zu beobachten und sowohl direkte Bindungsproteine von Imatinib wie z.B. BCR-ABL, als auch deren Interaktionsproteine, wie z.B. Grb2 und SHIP2, konnten identifiziert werden. Doch obwohl dieser Ansatz zu einer guten Ausbeute an direkten Bindungsproteinen und deren Interaktionspartnern führte, konnten nicht alle bereits beschriebenen Imatinib Targets aus K562 Zellextrakten identifiziert werden (109). Insbesondere die RTKs c-Kit und PDGF Rezeptor wurden nicht gefunden, was vermutlich an ihrer nicht nachweisbaren Expression in K562 Zellen lag. Neben der erwarteten, starken Kompetition des Proteins BCR-ABL (1 μ M Imatinib) wurden noch weitere bekannte Proteine mit ähnlich hochaffinen Bindungseigenschaften, wie DDR1, identifiziert, was ebenfalls mit den Daten von Bantscheff *et al.* (80) übereinstimmte. Zusätzlich fanden wir ebenfalls NQO2, welches zuvor als erstes Nicht-Proteinkinase-Target von Imatinib identifiziert wurde (80). Beide Proteine hatten eine hohe Affinität zu Imatinib und lagen in stark reduzierter Menge verglichen mit dem unbehandelten Zellpool vor. Daneben wurden auch weitere Proteine identifiziert, die eine geringe Affinität für Imatinib vergleichbar mit SYK aufwiesen. Für SYK ist ebenfalls bekannt, dass es an Imatinib bindet, jedoch ist die Affinität deutlich geringer (111-112). Erst nach zellulärer Behandlung mit 10 μ M Imatinib

wurde SYK auf etwa 35% der Kontrollmenge reduziert. Daneben konnten weitere potentielle Zielproteine mit geringer Affinität identifiziert werden, wie die *Phosphatidylinositol-4-Kinase Type-2 Isoformen α und γ* (PIP4K2A, PIP4K2C). Als weiteres potentiell neues Zielprotein wurde die *Flavin Adenin Dinucleotid (FAD) Synthetase* (FLAD1-Gen) identifiziert. Diese Synthetase ist in dem metabolischen Prozess beteiligt, bei dem aus *Flavin mononucleotide* über die Adenylierung das FAD synthetisiert wird (113). Da FAD ein Redox-Co-Faktor vieler Flavoproteine ist, ist es für viele biologische Prozesse essentiell. Daher ist es höchst wahrscheinlich, dass ein therapeutisches Ausschalten dieses Protein schädigenden Einfluss auf die Zelle hätte. Erwähnenswert ist außerdem das FAD als prosthetische Gruppe in dem Protein NQO2 beschrieben ist und in diesem Protein die Katalyse des Elektronentransfers übernimmt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Imatinib bestimmte Enzyme binden kann, die FAD enthalten oder binden können. Da die Proteinlevel von FAD Synthetase um 45% bzw. 79% bei 1 μ M bzw. 10 μ M reduziert wurde, interagierte Imatinib schwächer mit dieser Synthetase als mit BCR-ABL und NQO2, aber stärker als mit SYK und den PIP4-Kinasen.

Bei den EOL-1-Zellen wurde ebenfalls NQO2 als affines Bindungsprotein identifiziert. Da jedoch die Messungen für diese Zelllinie keine hohe Reproduzierbarkeit aufwiesen, wurden nur wenige Proteine mit einer möglichen Affinität für Imatinib identifiziert. Zu diesen Proteinen gehörten die Komponenten der *cleavage and polyadenylation specificity factors 1, 2 und 3* (CPSF). Diese Faktoren spielen in der prä-mRNA 3'-Endformation eine Rolle, erkennen die AAUAAA Signalsequenz, interagieren mit der Poly(A)-Polymerase und anderen Faktoren die für die Spaltung und das Anhängen der Poly(A)-Sequenz gebraucht werden. Diese Daten sind jedoch als vorläufig anzusehen, und weitere Experimente wären erforderlich, um die molekulare Grundlage des Imatinib-abhängigen Bindungsverhaltens dieser Proteine weiter zu charakterisieren.

5.1.2. Imatinib-sensitive Phosphorylierungsstellen

Durch die Identifikation von wichtigen Vermittlern in Signalkaskaden kann man prinzipiell Proteine identifizieren, die als potentielle, alternative Targets Verwendung finden könnten. Es wurde die SILAC-Markierung mit der SCX- und TiO₂-Chromatographie, um Phosphopeptide anzureichern, zusammen mit der hohen Genauigkeit der Massenspektrometrie auf der LTQ-Orbitrap kombiniert. Dadurch kann man oftmals auch Phosphorylierungsstellen von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen, die nur in einer geringen Anzahl in der Zelle vorkommen, identifizieren und analysieren. Diese Verfahren können mit jeder Zelllinie durchgeführt werden, die mit SILAC markierbar ist (76). Es ist außerdem möglich, aus der Vielzahl an zellulären Phosphorylierungen kleinen Teil an

Phosphorylierungsereignissen herauszufiltern, die spezifisch von einem bestimmten Stimulus reguliert sind.

Für die Experimente mit spezifischer Kinaseanreicherung wurden Kinaseinhibitoren immobilisiert, wie es bereits früher beschrieben wurde (115). Die verwendete Inhibitorkombination war hierfür sehr gut geeignet. Allein der Inhibitor VI16832 ist in der Lage, mehr als 130 verschiedene Proteinkinasen aus Zellextrakten herauszufiltern. Mit dieser Kinase-selektiven proteomischen Analyse legt man sein Augenmerk auf den Teil des Proteoms, der eine sehr bedeutende Rolle für die gezielte Suche nach therapeutischen Angriffspunkten im Kampf gegen Krebs spielt (115) bei gleichzeitiger Verwendung verschiedener Konzentrationen eines freien Inhibitors, der mit Kinasebindung an die Inhibitor-Beads kompetitiert, ist man so in der Lage, direkte und indirekte zelluläre Targets im Zusammenhang mit dem Einwirken des Inhibitors zu identifizieren. Die Kombination der Kinaseanreicherung mit der Phosphopeptidaufreinigung ermöglichte es zudem, das gebundene Kinom sowohl auf Proteinebene als auch auf dem Level der posttranslationalen Modifikation zu vergleichen, wodurch auch die Kinaseregulierung analysiert werden konnte. Mit dem parallelen Ansatz der Messung von phosphorylierten Proteinen aus dem kompletten Zelllysate bekommt man einen Überblick darüber, wie sich zelluläre Kinasehemmung auf Ebene der Kinasesubstrate auswirkt, wobei letztere in der Regel nicht nach Affinitätsaufreinigung mit Kinaseinhibitoren detektiert werden können. Insgesamt können diese komplementären Ansätze zu einem erweiterten Verständnis über Proteinkinasen und ihren regulatorischen Funktionen in den Zellsignalwegen beitragen, und somit Hinweise für potentielle neue Strategien für die therapeutische Inhibitoranwendung oder die Überwindung von Resistenzmechanismen geben.

Natürlich ist hier zu berücksichtigen, dass nicht alle auf einen Stimulus hin regulierte Phosphorylierungsstellen identifiziert werden können und so auf Ebene zellulärer Signalnetzwerke nur ein Ausschnitt einer regulierten Antwort auf einen Inhibitor nachweisbar ist (141).

Anhand des K562-Datensatzes aus der Kinaseaufreinigung wurden fast 2000 Phosphorylierungsereignisse mit einer Lokalisierungswahrscheinlichkeit von über 0,75 quantifiziert. Davon waren 900 durch beide biologischen Experimente mit einer guten Übereinstimmung in den quantifizierten Werten für die Phosphopeptide belegt. Vergleicht man die Zahlen mit schon publizierten Daten (80), so konnte die Zahl der Phosphorylierungsstellen in K562-Zellen nach der Behandlung mit Imatinib sogar um das Fünffache gesteigert werden. Bei direkten Bindungspartnern von Imatinib konnte man auch aufgrund der Phosphorylierungsanalysen zwischen Proteinen mit hoher und Proteinen mit geringer Affinität unterscheiden. Die Proteine mit hoher Affinität zeichneten sich durch einen sehr geringen Wert nach der Behandlung mit Imatinib aus, der sich zum einen aus ihrer starken

Dephosphorylierung in der Zelle und zum anderen aus der Hemmung der Proteinbindung nach der Imatinibbehandlung zusammensetzte. Das konnte an dem Protein ABL verdeutlicht werden, das bereits bei 1 μM Imatinib nur noch einen durchschnittlichen Wert von 0,07 und bei 10 μM Imatinib ein Wert von 0,036 auf Proteinebene aufwies. Ähnlich verhielten sich die dazu gehörenden signifikanten 20 Phosphorylierungsstellen die für beide Konzentrationen im Durchschnitt Werte erreichten die unter 0,1 liegen. Aufgrund des begrenzten dynamischen Bereichs der MS Analyse war hier eine Normalisierung von Phosphorylierungsänderungen entsprechend der reduzierten Proteinabundanz nicht möglich. Weniger affine Bindungspartner von Imatinib zeigten eine weniger stark ausgeprägte konzentrationsabhängige Hemmung sowohl auf Ebene des Proteins als auch auf den quantifizierten Phosphorylierungsstellen. Ein solches Protein war die SYK-Kinase, die bei 1 μM Imatinib ein Proteinlevel von 0,7 und bei 10 μM noch ein Proteinlevel von 0,36 erreichte und somit nur bei 10 μM als signifikant reguliert galt. Auf Ebene der quantifizierten Phosphopeptide waren die SYK Phosphorylierungsstellen Y323, Y348 und Y352 stärker durch Imatinib beeinflusst und auch nach Normalisierung entsprechend der reduzierten SYK Bindung zeigte sich hier noch eine deutliche Abnahme. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Imatinib auch zellulär die Aktivität von SYK beeinflusste, dafür die Phosphorylierung dieser Stellen eine Steigerung der Kinaseaktivität beschrieben war (142). Weitere regulierte Phosphorylierungsstellen wurden z.B. in den Proteinen BTK (Y551) und FER (Y714) identifiziert. Diese Kinasen konnte man als direkte Bindungsproteine von Imatinib ausschließen, da keine Regulierung auf Proteinebene nachzuweisen war während eine konzentrationsabhängige Regulierung ihrer Phosphorylierung durch Imatinib auftrat. Zusätzlich befinden sich diese Phosphorylierungsstellen bei beiden Kinasen im *activation loop* und beeinflussen somit die Aktivität der Kinasen. Beide Kinasen haben bis jetzt keine nachgewiesene Bindung zu BCR-ABL. Die Kinase FER ist in der Zellantwort auf Stress beteiligt und vermittelt z. B. als Antwort auf reaktive Sauerstoffverbindungen die Migration von Fibroblasten (143). Außerdem besteht der Verdacht, dass FER die Entwicklung und das Wachstum von malignen Tumoren unterstützt. Aktiviert wird FER durch Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF und assoziiert mit *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI3K), dem *Signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3) und dem zytoskeletalem Linkerprotein *Plectin* (144). Zudem wurde berichtet, dass bei Einführen der Mutation Y714F die Fähigkeit zur Autophosphorylierung verlor geht und STAT3 nicht mehr phosphoryliert werden kann (145). Bei der Inkubation mit 10 μM Imatinib reduzierte sich die Phosphorylierung um mehr als 70%, was möglicherweise zur Hemmung wichtiger Signalwege wie der STAT- und PI3K-vermittelten beitragen könnte.

BTK ist in den B-Zellen an der Antikörperbildung, B-Zellselektierung, der Reifung und für den Fortbestand der Zelle beteiligt (146). Die Phosphorylierungsstelle Y551 auf BTK befindet sich

ebenfalls innerhalb der Aktivierungsschleife der Proteinkinase und bei Phosphorylierung dieser Position wird die Aktivität der Kinase um das 5-10fache gesteigert. Nach der B-Zellrezeptor-Aktivierung assoziieren zunächst Vertreter der Src-Kinasefamilie, anschließend wird die PI3K phosphoryliert und aktiviert. Dadurch kommt es zu erhöhten Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat-Bildung sowie zur Rekrutierung der BTK-Kinase an die Plasmamembran. Dadurch wird die Autophosphorylierung der BTK-Kinase aktiviert und phosphoryliert ihrerseits Phospholipase $\text{C}\gamma 2$. Daraufhin wird Ca^{2+} als *second messenger* ausgeschüttet und verändert darüber die Expression von Genen (147). Daneben ist BTK neben BCR-ABL und den Src-Kinasen eines der Hauptbindungsproteine für den Inhibitor Dasatinib und in der prä-B lymphoblastischen Leukämie könnte die Inhibierung von BTK eine essentielle Rolle in der klinischen Behandlung spielen (148). In der Imatinibanalyse dieser Arbeit war eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung an der Stelle Y551 nachgewiesen worden und bei der zellulären Behandlung mit 10 μM Imatinib war nur noch 37% Restphosphorylierung nachweisbar. Daher könnte BTK ein interessanter Kandidat für potentielle neue Therapeutika sein. In der Mauszelllinie BaF3, die mit dem BCR-ABL-Gen transformiert wurden, zeigte BTK keinen Effekt auf Zellwachstum und -entwicklung (116). Jedoch hatten wir in einem Kooperationsprojekt mit dem „Klinikum rechts der Isar“ mit den gleichen transformierten Zellen TEC und nicht BTK als entsprechenden Kandidaten identifizieren können, deren Tyrosinphosphorylierung in resistenten Klonen um ein Fünffaches erhöht vorlag. Die betroffene TEC Phosphorylierungsstelle Y518 liegt in der Aktivierungsschleife in der gleichen, konservierten Position wie Y551 bei der nahe verwandten BTK (149). Leider ergaben die Knock-Down-Versuche in den K562-Zellen, die auf diesen Ergebnissen aufbauten, keine aussagekräftigen Ergebnisse. Weder mit der SYK-, FER- oder BTK-siRNA war eine physiologische Veränderung der K562-Zellen zu erkennen. Jedoch müsste man durch weitere Experimente ausschließen, dass die zellulären Restaktivitäten (aufgrund des nicht quantitativen Knockdowns) nicht für ihre Funktionen in den Zellen ausreichen.

Die Übereinstimmungen der beiden Zelllinien K562 und EOL-1 in den Phosphorylierungsstellen fiel sehr gering aus. Der hauptsächliche Grund dafür lag in der geringen Ausbeute der reproduzierbaren Daten in den EOL-1 Zellen. Nur 386 Phosphorylierungsstellen wurden in beiden Experimenten als Klasse I identifiziert, reproduzierbar dephosphoryliert waren nur 18 Stellen. Neben den direkten Bindungsproteinen wie ABL, FIP1L1, PDGFR α waren nur MAP3K3 mit S492 und die RPS6KA1 an S28, S372 und S389 in der Proteinkinasedomäne dephosphoryliert. Dabei stimmten die Phosphorylierungsstellen der RPS6KA1 nicht mit den sensitiven Phosphorylierungsstellen der K562-Zellen überein. Interessant war jedoch, dass nach Imatinibbehandlung die Phosphorylierungsstelle S280 auf der Checkpoint-Kinase *CHEK1* zu 70% dephosphoryliert vorlag. Dieses Protein wird durch ATM oder ATR nach einem DNA-

Schaden aktiviert und phosphoryliert. CHEK1 ist in den Prozessen zur Erhaltung der genomischen Stabilität beteiligt und kann den Zellzyklus arrestieren (150). Um einen besseren Vergleich der beiden Zelllinien zu haben, müsste der Versuchsansatz in EOL-1-Zellen wiederholt werden. Dann könnte man eventuell Aussagen über gemeinsame Regulierungsmechanismen trotz der unterschiedlichen Imatinib-Haupttargets BCR-ABL und FIP1L1- PDGFR α treffen.

5.2. Analyse des kompletten Datensatzes

Reinigt man die Kinasen aus dem Zellysate auf, so erhält man ein Subproteom welches anschließend mit hoher analytischer Sensitivität untersucht werden kann. Um diese Daten besser in den gesamten zellulären Kontext einzuordnen, z. B. im Hinblick darauf, wie sich Kinaseregulation generell auf zelluläre Substratproteinphosphorylierung auswirkt, wurden in Rahmen dieser Arbeit auch Totallysatanalysen der Zelllinien K562 und EOL-1 nach Imatinibbehandlung durchgeführt. Hierfür wurde auf ein Protokoll zurückgegriffen, dass die Auftrennung von komplexen Phosphopeptiden aus dem Totallysate mit der SCX-Chromatographie (65) und die Phosphopeptidanreicherung mit der *immobilisierten metal affinity chromatography* (IMAC) verbindet (93). Vergleicht man diesen Ansatz mit dem Ansatz, der für die Kinaseanreicherung verwendet wurde, so bekommt man einen globalen Eindruck des Proteoms, allerdings verbunden mit einer niedrigeren Abdeckung der Proteinkinasen.

Zusammen mit den Kinase-angereicherten Daten kann man so einen besseren Einblick in den gesamten Signaltransduktion der Zelle inklusive der Kinasen und der Kinasesubstrate bekommen.

5.2.1. Hemmung zellulärer Proteinexpression

Generell kann gesagt werden, dass durch die verwendete Methode, bestehend aus SILAC in Kombination mit SCX und IMAC-Chromatographie, deutlich mehr Proteine identifiziert und quantifiziert werden können im Vergleich zu Kinase-aufgereinigten Proben. Vergleicht man den Kinase-angereicherten Datensatz der K562-Zelllinie mit 683 Proteingruppen, die in beiden Experimenten quantifiziert wurden, mit den 1588 Proteingruppen die in allen drei Totallysate-Experimenten quantifiziert wurden, war eine Steigerung um mehr als das Doppelte festzustellen. Ein noch größerer Unterschied war auf Ebene der Phosphoproteine festzustellen. Hier wurden im Totallysate dreimal mehr Phosphorylierungsstellen in allen Experimenten wiederholt quantifiziert als in dem Datensatz basierend auf Kinaseanreicherung (109).

Ein Ansatz ohne Fokussierung auf ein bestimmtes Subproteom ist besser geeignet, um das interagierende Netzwerk von BCR-ABL über direkte Interaktionspartner hinaus zu untersuchen.

Um auch die Proteinveränderungen bei Mediatoren in der Signaltransduktion analysieren zu können, die weniger schnell als die Regulation der Signaltransduktion erfolgen, wurde die Inkubationsdauer von Imatinib in den Zellen auf 24 h erhöht. Im Gegensatz zu der Studie von Brehme *et al.* (109), in der 708 Proteine analysiert werden konnten, waren die Zahlen sowohl in den K562-Zellen mit 1588 als auch in den EOL-1-Zellen mit 1024 Proteingruppen deutlich größer. Interessanterweise konnte auf Proteinebene in den K562-Zellen nahezu keine Regulierung nach 2 h als auch 24 h Inkubation mit Imatinib beobachtet werden. Auffällig waren die häufig auftretenden widersprüchlichen Werte für die Proteine in den einzelnen Experimenten. Oftmals war ein Protein in einem Experiment hoch reguliert in einem anderen jedoch runter reguliert. Interessanterweise lag PIP4K2A reguliert vor, wurde aber allerdings nur in einem Experiment quantifiziert. Beobachtet man den Verlauf der Regulierung, war die Hemmung mit einem Wert von 0,3 deutlicher bei 2 h als bei 24 h mit einem Wert von 0,47. Man könnte vermuten, dass die Expression von PIP4K2A in der frühen Antwort auf Imatinib gehemmt wird, über den längeren Zeitverlauf die Hemmung jedoch wieder schwächer wird. Es wurde gezeigt, dass PIP-Kinasen in der Zellantwort auf oxydativen Stress aktiviert werden (29). Da als Folge der BCR-ABL Hemmung ROS ebenfalls reduziert werden, könnte dies ursächlich für die beobachteten Effekte auf PIP4K2A sein. Da die Behandlung mit Imatinib Apoptose auslöst (151), passte es ins Bild, dass das einzige Protein, das in den K562-Zellen bei beiden Zeitwerten stärker exprimiert vorlag, an dem Mechanismus der Apoptose beteiligt ist. Dieses Protein, Hsp1, bindet an Bcl-2 und den Apoptoseregulator Bcl-X und löst darüber Apoptose aus, indem autophagische Vakuolen aktiviert werden und vermutlich ein Weg hin zum Zelltod aktiviert wird unabhängig von der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C (124, 127). Dieser Weg der Apoptose erscheint als sinnvoller Angriffspunkt, um die Leukämie-Zellen in den Zelltod zu treiben, wenn Resistenzen gegenüber Imatinib auftreten und sollte daher weiter untersucht werden.

In den EOL-1 Zellen war auf Proteinebene nach 2 h Imatinibinkubation nur wenig Regulation nachweisbar und nur drei Proteine wiesen ein gehemmtes Level auf. Dazu gehörte die Helikase SRCAP, die in der Aktivierung von Transkription beteiligt ist, indem es als Cofaktor vieler Transkriptionsfaktoren wie CREB, Glukocorticoid Rezeptor und Androgen Rezeptor dient (152). Das gibt für unseren Datensatz den Hinweis; dass die Transkription bestimmter Gene rasch nach Imatinibgabe gehemmt werden könnte.

Zudem war *Coronin-1C* nach 2h Imatinib weniger vorhanden. Dieses Protein wird in den meisten Geweben exprimiert und ist am Aktinzytoskelett lokalisiert. Vermutlich ist es an der Regulierung des epithelialen Gewebes beteiligt (153), zu seiner mögliche Funktion in EOL-1 Zellen ist jedoch nichts bekannt. ADAM17 ist als *Tumornecrosis Faktor-alpha converting* Enzym bekannt und ist an der aktivierenden Spaltung von RTK Liganden, die bei Krebserkrankungen

von pathophysiologischer Relevanz sind, beteiligt. Dazu gehört z.B. der Ligand für EGFR, HB-EGF, der durch Spaltung aktiviert wird (154). Allerdings ist unklar, inwieweit bzw. mittels welcher Substrate ADAM17 in EOL-1 Zellen eine Rolle spielen könnte. Im Unterschied zu den K562 Zellen war die Regulation nach 24 h Imatinibbehandlung in den EOL-1 Zellen deutlich zu erkennen. Insgesamt gab es über 360 Proteine, die reproduzierbar in ihrer Expression gehemmt wurden. Hoch reguliert wurden dagegen 105 Proteine. Die regulierten Proteine konnte man noch genauer spezifizieren, indem man sie in Cluster einteilte. Dabei gab es acht Proteine die nur in der frühen Inhibitorantwort gehemmt wurden und nach 24 h im normalen Proteinlevel wieder vorkommen. In zwei größeren Clustern wurden alle Proteine erfasst, die durch Imatinib in ihrer Expression gehemmt wurden und diese Hemmung entweder beibehalten wurde oder über die Zeit hinweg weiter zunahm. Diese Proteine waren laut Genontologieanalyse an folgenden biologischen Prozessen beteiligt: „Regulierung der biologischen Qualität“, „Entstehung von Vorläufermetaboliten und Energie“, „zelluläre katabolische Prozesse“, „Translation“ und „Zellzyklus“. Wie schon in anderen Studien gezeigt wurde, wird durch die längere Inkubation mit Imatinib der Laktoseexport und die Glukoseaufnahme, die Glycolyse und NAD⁺ gehemmt (151). Daraus lässt sich schließen, dass der Energiehaushalt durch die Imatinibbehandlung heruntergefahren wird und dadurch viele Sekundäreffekte auftreten. Dazu gehören die Genexpression und weitere Energie benötigende Prozesse wie Katabolismus und der Zellzyklus. Bei den runter regulierten Prozessen werden früh die katabolischen Prozesse reduziert, wie „Proteinkatabolismus“ und „Zucker- und Alkoholabbau“. Genauso sind die „Translation“, die „Immunsystementwicklung“ und der „mitotische Zellzyklus“ reduziert. Später folgen diesen Prozessen die Hemmung der gesamten Genexpression und der biosynthetischen Prozesse, genauso wie die positive Kontrolle über den Transport und die Meiose. Bei den Proteinen, die nach der Behandlung von Imatinib hoch reguliert wurden, konnte man drei Gruppen unterscheiden. In einem Cluster fand man alle Proteine, die bei einer kurzfristigen Imatinibbehandlung keine Regulierung aufwiesen, aber nach 24 h deutlich hoch reguliert wurden. Die Proteine gehören zu den biologischen Prozessen wie „Membran Organisation“, „Vesikel-vermittelter Transport“, sowie „negative Regulation von Apoptose“. Ein weiteres Cluster umfasste alle Proteine die bereits früh ein erhöhtes Level aufwiesen und diesen konstant bis 24 h aufrecht erhielten. Hier sind die Proteine besonders in den Prozessen der „makromolekularen Lokalisation“, der „Antwort auf chemische Stimuli“, „metabolische Prozesse der Kohlenhydrate“ und „Proteinfaltung“ involviert. Im letzten Cluster waren alle Proteine zusammengefasst die auf eine Imatinibbehandlung mit einem kurzzeitig erhöhten Level der Proteinmenge reagierten, aber nach 24 h bereits wieder ein normales Level erlangten. Dazu gehörten die Prozesse des „Metabolismus mit Makromolekülen wie Nitrogenverbindungen und Proteine“, „Translation“, „RNA Prozessierung“ und „Regulierung des Zellzyklus“. Das könnte

darauf hindeuten, dass kurzzeitig auf Imatinib reagiert wird, indem Vorgänge wie Zellzyklusregulation, Genexpression sowie Translation und die RNA Prozessierung erhöht werden. Gleichzeitig beginnen Vorgänge, die u.a. im Zusammenhang mit Apoptose gesehen werden können.

5.2.2. Auswirkung von Imatinib auf gesamtzelluläre Phosphorylierung

In den K562-Zellen konnte man zur Auswertung der Daten auf 5897 Phosphorylierungsstellen der Klasse I zurückgreifen. Wenn man die dephosphorylierten Phosphorylierungsstellen nach 2 h Imatinib betrachtet, so sind sehr viele Stellen quantifiziert worden, die auch im Kinaseangereicherten Datensatz vorzufinden waren und ein Netzwerk aus BCR-ABL und dessen direkten Interaktoren wie STAT5A, SHC1, GAB2, SHIP2 und DOK2 und sowie anderen Proteinen mit sensitiven Phosphorylierungsstellen wie RPS6 und RPS6KA3 bildeten. Von den in den Totallysatanalysen zusätzlich gefundenen, sensitiven Phosphorylierungsstellen sind vor allem zwei an den Proteinen LCP1 und NCBP1 interessant. Vom *Lymphocyte cytosolic protein 1* (LCP1) ist für die sensitive Stelle S5 bekannt, dass sie unter anderem für die molekulare Assoziation an F-Aktin zuständig ist, wodurch die zytoskeletale Reorganisation aktiviert wird (155). Die zweite Stelle befindet sich auf dem *Nuclear cap-binding protein* (NCBP1) an T21. Dieses Protein kann durch die S6 Kinase phosphoryliert werden und beeinflusst dadurch das Splicing (156). Nach 24 h waren mehr Veränderungen auf der Phosphorylierungsebene quantifiziert worden. Insgesamt lagen 111 gehemmte Stellen auf 82 Proteinen reproduzierbar vor, davon bildeten 38 Proteine ein Netzwerk gemäß STRING-Analyse. Wichtige Phosphorylierungsstellen fand man auf CDC2 an T14, was bei Phosphorylierung zu der Inhibierung dieser zentralen mitotischen Kinase führt (156). Auch nach 24 h war die bereits erwähnte Phosphorylierungsstelle T21 an NCBP1 dephosphoryliert. Zudem waren Weitere, bereits funktionell charakterisierte Phosphorylierungsstellen nach 24h Imatinibbehandlung gehemmt, z.B. S660 auf dem Protein PRKCB1, welches die intrazelluläre Lokalisation reguliert (157), oder auf dem Protein *Paxillin* (PXN) die Stelle Y88, welche an der Regulation des Zellwachstums und der Migration beteiligt ist (158). *Ribosomal S6 kinase* (RSK) wird durch Phosphorylierung des Serins S369 aktiviert und kann dann die Transkription regulieren, indem es mit dem *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) ein DNA-Transkriptions-Komplex ausbildet (159).

Proteine mit einer gesteigerten Phosphorylierung kamen ebenfalls als Antwort auf Imatinib vor, betrafen aber nur 24 Phosphorylierungsstellen auf 24 Proteinen die zusammen kein Netzwerk ausbildeten. Auf der Serin/Threonin-Proteinkinase WNK1 wurde interessanterweise die aktivierende Phosphorylierungsstelle S382 als stärker phosphoryliert identifiziert. In der aktiven Form ist die Kinase in der Lage, die Proteine *STE20/SPS1-related proline/alanine-rich*

Kinase (SPAK, STK39) und *oxidative-stress-responsive Kinase-1* (OSR1, OXSR1) zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren, wenn die Zelle Stress ausgesetzt ist, wie z.B. durch ein hyperosmotisches Umfeld (160). Bei den restlichen Phosphorylierungsstellen waren keine Funktionen bekannt. Es ist auffällig, dass die Proteine meist in den metabolischen Prozessen von Nukleinsäuren beteiligt waren (PGM3, FIP1L1, ZNF592, RBM15B, NFRKB, CIC, PWP1, SF3A3). Zusammengefasst wurde in dem Datensatz beobachtet, dass die bekannten Mediatoren der BCR-ABL Signalkaskade erwartungsgemäß gehemmt wurden, genauso wie Proteine, die für den Energiehaushalt der Zelle wichtig sind bzw. bei der Genexpression und Proteinbiosynthese beteiligt sind. Hoch reguliert wurden einzig Proteine, die im Zuge der Apoptose bzw. im Rahmen der zellulären Stressantwort reguliert werden.

In der EOL-1-Zelllinie fand man nach 2 h Inkubation mit Imatinib nur eine geringe Anzahl an Proteinen, an welchen es zu Dephosphorylierung kam. Insgesamt fand man 63 gehemmte Phosphorylierungsstellen auf 50 Proteinen, die zusammen jedoch kein Netzwerk ausbildeten und dem zur Folge untereinander keine bekannten Interaktionen haben. Eine wichtige gehemmte Phosphorylierungsstelle war S65 des *eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1* (EIF4EBP1) an, das bei Phosphorylierung die molekulare Assoziation mit eIF4E und somit die Translation reguliert. Auf dem Protein *L-Plastin* (LCP1) fand man ebenso wie in K562 die regulatorisch wichtige Phosphorylierungsstelle S5 runter reguliert. Dieses Protein gehört zu der Familie der Aktin-Crosslinker und wurde schon häufiger als Marker für Krebs identifiziert. Wird es an S5 phosphoryliert, dann bindet es an F-Aktin und aktiviert dadurch die Zellinvasion. Außerdem beeinflusst es die Aktindynamik durch die Ausbildung eines Proteinkomplexes mit *Cortactin*. Daneben besteht die Vermutung, dass LCP1 Teil des PKC δ -Signalweges ist, der mit Aktinpolymerisierung und Invasion in Verbindung steht (161). Das Protein *programmed cell death 4* (PDCD4) gilt als Tumorsuppressor und interagiert mit eIF-4E-4A. Die dephosphorylierte Stelle S457 wird von Akt phosphoryliert und löst dadurch die nukleare Translokation von PDCD4 aus. Dies verhindert des Weiteren die Transaktivierung von c-Jun an *AP-1* Promotorelementen (134). *Leukemia-associated phosphoprotein p18* (STMN1) gilt als Onkoprotein, das mit *Tubulin* interagiert und die Dynamik der Mikrotubuli durch Phosphorylierung reguliert. Interessanterweise wird es durch Phosphorylierung an S25 inaktiviert, welche nach Imatinibbehandlung reduziert vorlag (162). Daneben war die wichtige regulatorische Stelle Y742 auf PDGFR α gehemmt, genauso wie S236 auf RPS6 und T444 auf RPS6KB1. Der Signalweg, dem drei der in EOL-1 regulierten Phosphoproteine angehören (EIF4EBP1, RPS6KB1, RPS6), ist wie bei den K562-Zellen der mTOR-Signalweg. Genau wie bei den K562-Zellen waren der nach Imatinibbehandlung regulierten Phosphoproteine an der Regulierung der Genexpression, am Aufbau oder Abbau von Organellen, bei der Ausdifferenzierung unreifer Zellen, sowie am alternativen Splicing beteiligt. Zudem wurde nach

Imatinib-Behandlung die Phosphorylierung von S78 des Hitzeschockproteins HSPB1 gehemmt, welche für die Regulation der Oligomerisierung wichtig ist. Diese aktivierende Phosphorylierung erhält das HSPB1 von den MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAP) 2 und 3, die Teil des p38 MAPK-Signalwegs sind. Durch die Phosphorylierung bildet sich ein Dimer aus und verhindert so die Chaperonfunktion des Proteins. Des Weiteren findet man in der Literatur, dass dephosphoryliertes HSPB1 den TNF α -induzierten Apoptoseweg unterdrücken und den *NF-kappaB*-Signalweg aktivieren kann (163). Die Phosphorylierung von *Myosin phosphatase target subunit 1* (MYPT1) an der Phosphorylierungsstelle T696 verringert die Affinität zum Myosin und löst dadurch eine Kontraktion aus (164).

In den Daten aus der EOL-1-Zelllinie waren 26 Phosphorylierungsstellen nach 2 h Imatinibinkubation übereinstimmend in den Experimenten hoch reguliert. Jedoch bildete sich kein zusammenhängendes Netzwerk aus. Wie auch schon bei dem Datensatz der Kinaseextraktion, waren auch bei EOL-1 hoch regulierte Phosphorylierungsstellen ausschließlich an Serin oder Threonin nicht jedoch mit Tyrosin zu beobachten. Das Protein PDGFR α gehört zu den direkten Bindungspartnern von Imatinib. Dennoch war es in der Liste der Proteine mit Phosphorylierungsstellen, die nach der Behandlung mit Imatinib hoch reguliert wurden. Sowohl die Phosphorylierungsstellen Y742 die gehemmt vorlag, als auch das verstärkt phosphorylierte S767 befinden sich in der Kinasedomäne, jedoch ist nur die Stelle Y742 auch mit einer regulatorischen Funktion beschrieben und reguliert die molekulare Assoziation von Substratproteinen.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den K562 und den EOL-1 Zellen lag vor allem in der Anzahl der Phosphorylierungsstellen vor, die nach 24 h reguliert vorlagen. Allein 1312 Phosphorylierungsstellen auf 800 verschiedenen Proteingruppen lagen in EOL-1 Zellen dephosphoryliert vor. Davon bildeten 264 Proteine ein Netzwerk aus. Es gab 34 Phosphorylierungsstellen, die sowohl nach 2 h als auch nach 24 h dephosphoryliert waren. Darunter waren auch die bereits diskutierten Phosphorylierungsstellen denen regulatorische Funktionen zugewiesen wurden (EIF4EBP1 mit S65, LCP1 mit S5, PDCD4 mit S457, RPS6 mit S236, STMN1 mit S25). Diese Proteine erfuhren eine Hemmung die mit zunehmender Imatinibinkubation stärker ausgeprägt war, nach 24 h kaum eine Phosphorylierung mehr quantifiziert werden konnte (Wert<0,1) und somit als komplett gehemmt angesehen werden konnten. Die zusätzlichen Phosphorylierungsstellen denen eine regulatorische Funktion zugeschrieben wurde, kann man zu Signalwegen zusammenfassen.

Zum Einen war der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK-Signalweg) durch die Imatinibbehandlung betroffen. Dieser Weg beeinflusst Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellmigration. Dazu gehört z.B. *Activating transcription factor 2* (ATF2, *Jun-family members*). Hier wurde eine verminderte Phosphorylierung an T69 vermittelt durch die *GTPase RalA*

beschrieben, dadurch wird die CRE-abhängige Transkription nicht aktiviert (165). Auch auf der *extracellular signal-regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) fand eine Hemmung der Phosphorylierungsstellen T202, Y204 und T187 statt. Diese Stellen sind wichtig für die enzymatische Aktivierung dieser Kinasen. Des Weiteren wurde das *Leukemia-associated Phosphoprotein p18* (STMN1) durch Imatinib beeinflusst. Es gilt als Onkoprotein, interagiert mit Tubulin und reguliert die Dynamik der Mikrotubuli abhängig vom Phosphorylierungszustand. Während der Mitose wird das Protein u.a. an S16 und S25 durch Cyclin-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert und inaktiviert so das Protein (162). Die *MAP-Kinase p38 alpha* (MAPK14) wurde an der Stelle Y182 gehemmt. Durch die Phosphorylierung der anti-apoptotischen (Bcl-2, Bcl-x_L) und pro-apoptotischen (Bad, Bim_{EL}) Proteine, werden deren Funktionen reguliert (166). Die Proteinkinase PAK1, welche die Zellmigration und -morphologie reguliert, wurde an S174 dephosphoryliert. Sie reguliert die Zellmigration und -morphologie. Liegt sie phosphoryliert an S174 vor, fördert dies den Mitoseverlauf (167).

Das *heat shock 27kD protein 1* (HSP27) wird von den *MAPK-activated Proteinkinase* (MAPKAP) 2 und 3 phosphoryliert. Dadurch bildet sich ein HSP27 Dimer und das Protein kann seine Chaperonfunktion nicht mehr ausführen. In unserem Datensatz wurde HSP27 an S82 dephosphoryliert quantifiziert, wodurch das Protein nicht mehr in der Lage ist zu oligomerisieren (163). Zudem war die Ser/Thr Kinase Raf1, welche die erste Kinase im ERK MAP Kinaseweg ist, an S296 dephosphoryliert.

Ein weiterer Signalweg der stark durch Imatinib beeinflusst wurde, ist die mTOR-Signalkaskade. Darüber wird insbesondere die Proteinbiosynthese reguliert. Häufig sind Proteine aus diesem Signalweg in verschiedenen Krebsarten abnorm aktiviert (168). Zu diesem Signalweg gehört das Tuberin Suppressorprotein (TSC2). Es war nach Imatinib nicht mehr an S1799 phosphoryliert, was laut Literatur, zu einer geringeren mTOR Aktivität führen sollte (136). Das ebenfalls durch Imatinib gehemmte phospho-S422 auf dem eukaryotischen Translation-Initiationsfaktor 4B (eIF4B) liegt in der RNA-Bindungsregion, die die eIF4A Helikase-Aktivität unterstützt. Es wurde festgestellt, dass S422 Phosphorylierung sensitiv auf Inhibitoren für *Phosphoinositide-3-Kinase* reagiert (169). IFN γ induzierte in dieser Studie dann nicht mehr die Phosphorylierung von eIF4E-Bindungsprotein 1 (ein Repressor der mRNA Translation. Die in dieser Arbeit beobachtete Dephosphorylierung an S65 aktiviert

kann dadurch nicht von dem eukaryotische Initiationsfaktor-4E (eIF4E) Komplex dissoziieren (170).

Am ribosomalen S6 Protein war nach Imatinib kaum noch eine Phosphorylierung an S236, welche durch die ribosomale S6 Kinase ausgeführt wird, detektierbar. Diese ist wichtig für die Anlagerung an das 7-Methylguanosin-Cap bei der Initiation der Translation (136). Die AGC-

Kinase RSK2 wird von ERK1/2 phosphoryliert. Da aber die Phosphorylierung an S369 ebenfalls gehemmt vorlag, war die Kinase inaktiv, was konsistent mit dem Imatinib Effekt auf das ribosomale S6 Protein war (171). Zudem lag eine weitere AGC-Kinase, PDK1, die aufgrund der fehlende Autophosphorylierung an der Stelle S241 in Imatinib-behandelten Zellen inaktiv vor (172).

Zum Zellzyklus gehören Ereignisse wie DNA-Replikation, Mitose und Zellzykluskontrollen die u.a. von Cyclin-abhängigen Kinasen reguliert werden. Das Retinoblastoma Protein 1 (RB1) hat als Tumorsuppressor die Funktion, unkontrolliertes Zellwachstum zu unterdrücken und reguliert die Zellproliferation über seinen Einfluss auf den G1-Kontrollpunkt. Durch die gehemmte Phosphorylierung nach Imatinib an T826, welche durch Cyclin-abhängige Proteinkinasen erfolgt, die Bindung der C-terminalen Domäne mit der Pocket-Domäne unterbunden (135). Dadurch werden Interaktionen mit Proteinen stabilisiert (173).

Das *Retinoblastoma-related Protein 2* (Rb-like 2) reguliert den Eintritt in die Zellteilung und die Dephosphorylierung an S413 und S417, die nach Imatinibbehandlung beobachtet wurde, würde dem entgegenwirken (174). Für den *Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor 1B* (CDKN1B), dessen Phosphorylierung sich nach Imatinib an S10 reduzierte, wurde im Kontext der *Oncostatin M*-Signaltransduktion gezeigt, dass diese MAP Kinase-abhängig erfolgt und sowohl die Zell-Zell Adhäsion als auch den Zellzyklus reguliert (175).

Zudem wurden eine Reihe weiterer funktioneller Phosphorylierungsstellen nach Imatinibbehandlung gehemmt, u.a. an den Proteinen NF- κ B, Filamin sowie dem *Mini-chromosome maintenance Protein* (MCM2) (176-177).

Hoch reguliert nach 24 h Imatinibbehandlung waren 285 Phosphorylierungsstellen auf 122 Proteinen, davon bildeten 55 Proteine ein Netzwerk aus. Hierbei war insbesondere *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (HNRNPK) interessant, dessen Phosphorylierung an S216 zunahm, eine Modifikation, welche dieses Protein aktiviert und seine Bindung an prä-mRNA fördert (178). Zudem wurde ribosomales Protein S3 (RPS3) nach Imatinibbehandlung an T221 phosphoryliert, einer Stelle, für die PKC δ -abhängige Phosphorylierung als Antwort auf DNA-Schädigungen gezeigt wurde und welche die Ribosomlokalisierung und die Funktion des RPS3 kontrolliert (179).

5.2.3. Vergleich der Ergebnisse aus EOL-1 mit K562 Zellen

In der vorliegenden Arbeit sollten insbesondere Proteine identifiziert werden, die Mediatoren in den von BCR-ABL bzw. FIP1L1-PDGFR α ausgehenden Signalkaskaden sind, aber als direkte Bindungsproteine von Imatinib ausgeschlossen werden können. Charakterisiert wird diese Bedingung dadurch, dass auf Proteinebene keine Konkurrenz der Bindung an immobilisierten

Kinaseinhibitoren nachweisbar ist, wohl aber Phosphorylierungsstellen gehemmt werden. Für neue Inhibitoren zur Therapie von Leukämien wäre es wünschenswert, dass ihre Zielproteine übergreifend in unterschiedlichen Leukämie-Zelllinien pathophysiologische Relevanz besitzen.

Die Phosphorylierungsstellen, die in beiden Zelllinien nach 2 h Imatinibbehandlung übereinstimmend gehemmt worden waren, waren zum einen S5 auf dem Protein *lymphocyte cytosolic protein 1* (LCP1). Das Protein bindet Aktin und ist in der Aktivierung von T-Zellen als Antwort auf die Costimulierung durch TCR/CD3 und CD2 oder CD28 involviert. Die Phosphorylierungsstelle S5 ist unter anderem für die Regulierung der Zelladhäsion, der zytoskeletalen Reorganisation, molekularen Assoziation und der intrazellulären Lokalisation zuständig. Die zweite Phosphorylierungsstelle, die übereinstimmend reguliert wurde, betraf das ribosomale Protein S6. Für dieses Protein wird vermutet, dass seine Phosphorylierung in der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation eine Rolle spielt, indem dadurch die Translation selektiver mRNA-Klassen kontrolliert wird. Außerdem ist es Teil des mTOR-Signalweges.

Nach 24 h Imatinibbehandlung war die Übereinstimmung bei den gleich regulierten Phosphorylierungsstellen deutlich größer. Insgesamt 20 Phosphorylierungsstellen wurden sowohl in den K562 als auch in den EOL-1-Zellen dephosphoryliert (AHNAK S135, AKT1S1 T266, AMPD2 S168, CD3EAP S130, DEF6 S590, EIF4G1 S1232, EVI2B S268, FUNDC2 S180, JUNB S259, KIF21B S1167, LARP7 S307, LCP1 S5, LSM14A S178, MYB S653, MYC S359, PCM1 S93, PPP1R12A S507, RPS6 S236, RPS6KA3 S369, RPS6KA3 T365). Auch nach 24 h lag die Phosphorylierungsstelle S236 auf dem Protein RPS6 in beiden Zelllinien dephosphoryliert vor. Obwohl dieses Protein selbst kein geeignetes Target für die Entwicklung niedermolekularer Therapeutika darstellt, so könnte dies auf die RPS6 Kinase zutreffen. In Folgeexperimenten müsste nun getestet werden, ob die spezifische Inhibierung der verantwortlichen Proteinkinase auf die Überlebensfähigkeit der Leukämiezellen Einfluss hat. Interessanterweise wurde auch die potentielle RPS6 Kinase RPS6KA3 mit einer sensitiven Phosphorylierungsstelle S369 nach 24 h Imatinibbehandlung, gefunden (S369). Auffällig ist, dass beide Proteine Teil des mTOR-Signalweges sind, der in vielen Krebsarten unphysiologisch aktiv ist. Dieser Signalweg erscheint daher für therapeutisches Eingreifen geeignet, weil bereits erfolgreich Medikamente entwickelt wurden, die ihn hemmen. Zu diesen Inhibitoren gehört z.B. Temsirolimus (Torisel), das als Inhibitor von mTOR Verwendung findet und bei der Behandlung von Nierenzellkarzinomen eingesetzt wird (180).

Somit erscheint der mTor Signalübertragungsweg als interessanter Kandidat für das therapeutische Eingreifen mit niedermolekularen Inhibitoren. In nachfolgenden Versuchen müsste nun geklärt werden, ob durch das Ausschalten von Proteinen wie mTor oder RPS6KA3 ein letaler Effekt in Leukämiezellen nachweisbar ist, insbesondere auch wenn die primären

5. Diskussion

Onkoproteine infolge von Mutationen Inhibitor-resistent geworden sind. Auf dieser Basis könnte die Entwicklung neuer, zielgerichteter Inhibitoren in Angriff genommen werden.

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zielproteine für den niedermolekularen Proteinkinaseinhibitor Imatinib in Leukämiezellen identifiziert. Dafür wurden immobilisierte Kinaseinhibitoren verwendet, um über Affinitätsresins Kinasen anzureichern und ihre Bindungseigenschaften sowie ihre zelluläre Phosphorylierungszustände nach Imatinibbehandlung analysieren zu können. In Kombination mit hochauflösender, quantitativer Massenspektrometrie wurde so der Effekt von Imatinib in den Leukämiezelllinien EOL-1 und K562 untersucht. Dabei wurden bereits bekannte wie auch neue zelluläre Bindungsproteine von Imatinib identifiziert, sowie beschrieben wie auch neue mögliche Mediatoren in den Signalkaskaden, welche von den onkogenen Fusionsproteinen BCR-ABL und von FIP1L1-PDGFR α ausgehen. Dabei wurden etwa 20 Imatinib-sensitive Phosphorylierungsstellen in den EOL-1-Zellen und 80 Imatinib-sensitive Phosphorylierungsstellen in den K562-Zellen identifiziert. Aus den Analysen und durch den Abgleich mit Resistenzanalysen in murinen Zellen wurden Kinasen identifiziert, die als mögliche alternative Zielproteine für therapeutische Ansätze in Frage kommen könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde auf eine Kinaseanreicherung verzichtet, um auch mögliche Kinasesubstrate nach Imatinibbehandlung untersuchen zu können. Diese ebenfalls quantitativen phosphoproteomische Analysen wurden ebenfalls in den Leukämiezelllinien EOL-1 und K562 durchgeführt, um gesamtzelluläre Veränderungen nach einer Kurzzeit- und Langzeitinkubation des Inhibitors beobachten zu können. Dabei wurden in den K562-Zellen 111 Imatinib-sensitive Phosphorylierungsstellen und in den EOL-1 über 1300 Imatinib-sensitive Phosphorylierungsstellen quantifiziert. Bei der Suche nach den Gemeinsamkeiten in den regulierten Proteinen konnte man in beiden Zelllinien 20 übereinstimmende dephosphorylierte Stellen identifizieren. Besonders vielversprechend für einen Ansatz zur therapeutischen Forschung erschienen hier regulierte Proteine aus dem mTor-Signalweg.

7. Literaturverzeichnis

1. Yang X-J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 2004; **24**(10): 1653-1662.
2. Ubersax JA, Ferrell JE. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(8).
3. Anthis NJ, Haling JR, Oxley CL, Memo M, Wegener KL, Lim CJ, *et al.* β Integrin Tyrosine Phosphorylation Is a Conserved Mechanism for Regulating Talin-induced Integrin Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2009 December 25, 2009; **284**(52): 36700-36710.
4. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 2002 December 6, 2002; **298**(5600): 1912-1934.
5. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences* 2002; **27**(10): 514-520.
6. Seet BT, Dikic I, Zhou M-M, Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**(7): 473-483.
7. Nolen B, Taylor S, Ghosh G. Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Molecular Cell* 2004; **15**(5): 661-675.
8. Pike ACW, Rellos P, Niesen FH, Turnbull A, Oliver AW, Parker SA, *et al.* Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *EMBO J* 2008; **27**(4): 704-714.
9. Eckhart W, Hutchinson MA, Hunter T. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 1979; **18**(4): 925-933.
10. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 Mar; **77**(3): 1311-1315.
11. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**(5): 361-370.
12. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; **411**(6835): 355-365.
13. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med* 2005 July 14, 2005; **353**(2): 172-187.
14. Pawson T. Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 2007; **19**(2): 112-116.
15. Hubbard SR, Till JH. PROTEIN TYROSINE KINASE STRUCTURE AND FUNCTION. *Annual Review of Biochemistry* 2000; **69**(1): 373-398.

16. Lochhead PA. Protein Kinase Activation Loop Autophosphorylation in Cis: Overcoming a Catch-22 Situation. *Sci Signal* 2009 January 20, 2009; **2**(54): pe4-.
17. Rich TC, Karpen JW. Review article: cyclic AMP sensors in living cells: what signals can they actually measure? *Ann Biomed Eng* 2002 Sep; **30**(8): 1088-1099.
18. Röder IV, Lissandron V, Martin J, Petersen Y, Di Benedetto G, Zaccolo M, *et al.* PKA microdomain organisation and cAMP handling in healthy and dystrophic muscle in vivo. *Cellular Signalling* 2009; **21**(5): 819-826.
19. Domek-Lopacinska K, Strosznajder JB. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J Physiol Pharmacol* 2005 Mar; **56 Suppl 2**: 15-34.
20. Kockskamper J, Zima AV, Roderick HL, Pieske B, Blatter LA, Bootman MD. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2008 Aug; **45**(2): 128-147.
21. Yang C, Kazanietz MG. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem J* 2007 April 1, 2007; **403**(1): 1-12.
22. Weber G. Down-regulation of increased signal transduction capacity in human cancer cells. *Advances in Enzyme Regulation* 2005; **45**(1): 37-51.
23. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signalling to transcription: Store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 2007; **42**(2): 145-156.
24. Levine MA. Clinical Implications of Genetic Defects in G Proteins: Oncogenic Mutations in G[alpha]s as the Molecular Basis for the McCune-Albright Syndrome. *Archives of Medical Research*; **30**(6): 522-531.
25. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 2005 Mar; **62**(5): 551-577.
26. Dhillon AS, Kolch W. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002; **404**(1): 3-9.
27. Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, *et al.* Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 2005 Jan 21; **17**(2): 215-224.
28. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000 Oct 15, 2000; **351**(2): 289-305.
29. Halstead JR, Roefs M, Ellson CD, D'Andrea S, Chen C, D'Santos CS, *et al.* A novel pathway of cellular phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis is regulated by oxidative stress. *Curr Biol* 2001 Mar 20; **11**(6): 386-395.
30. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* 2001; **37**(Supplement 4): 3-8.
31. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004 March 15, 2004; **117**(8): 1281-1283.

32. Knight ZA, Lin H, Shokat KM. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**(2): 130-137.
33. Porter AC, Vaillancourt RR. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 1998 Sep 17; **17**(11 Reviews): 1343-1352.
34. Levi-Montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1952 Aug 8; **55**(2): 330-344.
35. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental Biology* 1965; **12**(3): 394-407.
36. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; **307**(5951): 521-527.
37. Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther* 2003 Dec; **100**(3): 257-290.
38. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Wierda W, Faderl S, Garcia-Manero G, *et al.* Therapeutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years. *Cancer* 2008; **113**(S7): 1933-1952.
39. Robak T, Wierzbowska A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clinical Therapeutics* 2009; **31**(Part 2): 2349-2370.
40. Elliott MA, Letendre L, Hanson CA, Tefferi A, Dewald GW. The prognostic significance of trisomy 8 in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002 Mar; **43**(3): 583-586.
41. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, *et al.* Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 2010 Mar 1; **116**(5): 1165-1176.
42. Kaufman M, Rubin J, Rai K. Diagnosing and treating chronic lymphocytic leukemia in 2009. *Oncology (Williston Park)* 2009 Nov 15; **23**(12): 1030-1037.
43. Cilloni D, Saglio G. CML: a model for targeted therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2009; **22**(3): 285-294.
44. Deininger MWN, Druker BJ. Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib. *Pharmacological Reviews* 2003 September 2003; **55**(3): 401-423.
45. el-Shami K, Smith BD. Immunotherapy for myeloid leukemias: current status and future directions. *Leukemia* 2008; **22**(9): 1658-1664.
46. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; **105**(1): 3-7.

47. Sallmyr A, Fan J, Rassool FV. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett* 2008 Oct 18; **270**(1): 1-9.
48. Saito H, Bourinbaier A, Ginsburg M, Minato K, Ceresi E, Yamada K, *et al.* Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* 1985 Dec; **66**(6): 1233-1240.
49. Gotlib J, Cools J. Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFR α : what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias. *Leukemia* 2008 Nov; **22**(11): 1999-2010.
50. Cools J, Quentmeier H, Huntly BJP, Marynen P, Griffin JD, Drexler HG, *et al.* The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 2004 Apr 1; **103**(7): 2802-2805.
51. Vigna E, Lucia E, Gentile M, Mazzone C, Bisconte MG, Gentile C, *et al.* PDGFR α /FIP1L1-positive chronic eosinophilic leukemia presenting with retro-orbital localization: Efficacy of imatinib treatment. *Cancer Chemoth Pharm* 2008 Apr; **61**(4): 713-716.
52. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, *et al.* A Tyrosine Kinase Created by Fusion of the PDGFR α and FIP1L1 Genes as a Therapeutic Target of Imatinib in Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. *N Engl J Med* 2003 March 27, 2003; **348**(13): 1201-1214.
53. Griffin JH, Leung J, Bruner RJ, Caligiuri MA, Briesewitz R. Discovery of a fusion kinase in EOL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 June 24, 2003; **100**(13): 7830-7835.
54. Gotlib J, Cools J, Malone JM, III, Schrier SL, Gilliland DG, Coutre SE. The FIP1L1-PDGFR α fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood* 2004 April 15, 2004; **103**(8): 2879-2891.
55. Lierman E, Michaux L, Beullens E, Pierre P, Marynen P, Cools J, *et al.* FIP1L1-PDGFR α D842V, a novel panresistant mutant, emerging after treatment of FIP1L1-PDGFR α T674I eosinophilic leukemia with single agent sorafenib. *Leukemia* 2009; **23**(5): 845-851.
56. Metzgeroth G, Walz C, Score J, Siebert R, Schnittger S, Haferlach C, *et al.* Recurrent finding of the FIP1L1-PDGFR α fusion gene in eosinophilia-associated acute myeloid leukemia and lymphoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; **21**(6): 1183-1188.
57. Breccia M, Cilloni D, Cannella L, Stefanizzi C, Tafuri A, Fama A, *et al.* Isolated molecular relapse in FIP1L1-PDGFR α hypereosinophilic syndrome after discontinuation and single weekly dose of imatinib: need of quantitative molecular procedures to modulate imatinib dose. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009 May; **63**(6): 1161-1163.
58. Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res* 2004 Oct 1; **10**(19): 6661-6668.

7. Literaturverzeichnis

59. Martinelli G, Iacobucci I, Papayannidis C, Soverini S. New targets for Ph+ leukaemia therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009 Sep; **22**(3): 445-454.
60. Han X, Aslanian A, Yates Iii JR. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008; **12**(5): 483-490.
61. Olsen JV, Ong S-E, Mann M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004 June 2004; **3**(6): 608-614.
62. Stone KL, Williams KR. Enzymatic digestion of proteins in gels for mass spectrometric identification and structural analysis. *Curr Protoc Protein Sci* 2004 Nov; **Chapter 11**: Unit 11 13.
63. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; **422**(6928): 198-207.
64. Mann M. Can Proteomics Retire the Western Blot? *Journal of Proteome Research* 2008; **7**(8): 3065-3065.
65. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, *et al.* Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Aug 17; **101**(33): 12130-12135.
66. Olsen JV, Mann M. Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 September 14, 2004; **101**(37): 13417-13422.
67. Scigelova M, Makarov A. Orbitrap Mass Analyzer - Overview and Applications in Proteomics. *PROTEOMICS* 2006; **6**(S2): 16-21.
68. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods* 2007 Sep; **4**(9): 709-712.
69. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, *et al.* Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002 May 2002; **1**(5): 376-386.
70. Ong S-E, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005; **1**(5): 252-262.
71. Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 2006; **57**(7): 1501-1508.
72. Zhang G, Neubert TA. Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for phosphotyrosine protein identification and quantitation. *Methods Mol Biol* 2009; **527**: 79-92, xi.
73. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**(12): 952-958.

74. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008 Dec; **26**(12): 1367-1372.
75. Hunter T, Cooper JA. Protein-Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* 1985; **54**(1): 897-930.
76. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006 Nov 3; **127**(3): 635-648.
77. Schreiber TB, Mäusbacher N, Breitkopf SB, Grundner-Culemann K, Daub H. Quantitative phosphoproteomics - an emerging key technology in signal-transduction research. *PROTEOMICS* 2008; **8**(21): 4416-4432.
78. Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 1986; **154**(1): 250-254.
79. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJD. Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005 July 2005; **4**(7): 873-886.
80. Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, *et al.* Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 2007 Sep; **25**(9): 1035-1044.
81. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. *Sci Signal* 2010 January 12, 2010; **3**(104): ra3-.
82. Daub H, Olsen JV, Bairlein M, Gnäd F, Oppermann FS, Körner R, *et al.* Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle. *Molecular Cell* 2008; **31**(3): 438-448.
83. Sharma K, Weber C, Bairlein M, Greff Z, Keri G, Cox J, *et al.* Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts. *Nature Methods* 2009 Oct; **6**(10): 741-U713.
84. Senis YA, Craig AW, Greer PA. Fps/Fes and Fer protein-tyrosinekinases play redundant roles in regulating hematopoiesis. *Exp Hematol* 2003 Aug; **31**(8): 673-681.
85. Sambrook J, Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York 1990.
86. Mertins P, Eberl HC, Renkawitz J, Olsen JV, Tremblay ML, Mann M, *et al.* Investigation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B Function by Quantitative Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008 September 2008; **7**(9): 1763-1777.
87. Daub H, Olsen JV, Bairlein M, Gnäd F, Oppermann FS, Korner R, *et al.* Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Molecular cell* 2008 Aug 8; **31**(3): 438-448.

88. Godl K, Gruss OJ, Eickhoff J, Wissing J, Blencke S, Weber M, *et al.* Proteomic characterization of the angiogenesis inhibitor SU6668 reveals multiple impacts on cellular kinase signaling. *Cancer Res* 2005 Aug 1; **65**(15): 6919-6926.
89. Wissing J, Jansch L, Nimtz M, Dieterich G, Hornberger R, Keri G, *et al.* Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2007 Mar; **6**(3): 537-547.
90. Wessel D, Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 1984 Apr; **138**(1): 141-143.
91. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; **1**(6): 2856-2860.
92. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2007; **2**(8): 1896-1906.
93. Villen J, Gygi SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2008; **3**(10): 1630-1638.
94. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jorgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 2005 Jul; **4**(7): 873-886.
95. Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJ. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem* 2004 Jul 15; **76**(14): 3935-3943.
96. Gruhler A, Olsen JV, Mohammed S, Mortensen P, Faergeman NJ, Mann M, *et al.* Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* 2005 Mar; **4**(3): 310-327.
97. Schroeder MJ, Shabanowitz J, Schwartz JC, Hunt DF, Coon JJ. A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Analytical chemistry* 2004 Jul 1; **76**(13): 3590-3598.
98. Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, *et al.* Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 2005 Dec; **4**(12): 2010-2021.
99. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 2009; **4**(1): 44-57.
100. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995 Jul 17; **184**(1): 39-51.
101. Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002 Apr; **1**(4): 309-315.

102. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990 Mar 2; **247**(4946): 1079-1082.
103. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001 Apr 5; **344**(14): 1031-1037.
104. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002 Feb 28; **346**(9): 645-652.
105. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001 Aug 3; **293**(5531): 876-880.
106. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002 Aug; **2**(2): 117-125.
107. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008 Dec; **26**(12): 1367-1372.
108. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, *et al.* STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 2009 Jan; **37**(Database issue): D412-416.
109. Brehme M, Hantschel O, Colinge J, Kaupe I, Planyavsky M, Kocher T, *et al.* Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 May 5; **106**(18): 7414-7419.
110. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2007 May; **7**(5): 345-356.
111. Atwell S, Adams JM, Badger J, Buchanan MD, Feil IK, Froning KJ, *et al.* A novel mode of Gleevec binding is revealed by the structure of spleen tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2004 Dec 31; **279**(53): 55827-55832.
112. Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, *et al.* Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 2007 Dec 1; **110**(12): 4055-4063.
113. Huerta C, Borek D, Machius M, Grishin NV, Zhang H. Structure and mechanism of a eukaryotic FMN adenylyltransferase. *J Mol Biol* 2009 Jun 5; **389**(2): 388-400.
114. Chu DH, Morita CT, Weiss A. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunological Reviews* 1998; **165**(1): 167-180.
115. Oppermann FS, Gnad F, Olsen JV, Hornberger R, Greff Z, Keri G, *et al.* Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol Cell Proteomics* 2009 Jul; **8**(7): 1751-1764.

116. MacPartlin M, Smith AM, Druker BJ, Honigberg LA, Deininger MW. Bruton's tyrosine kinase is not essential for Bcr-Abl-mediated transformation of lymphoid or myeloid cells. *Leukemia* 2008 Jul; **22**(7): 1354-1360.
117. Lim Y, Han I, Jeon J, Park H, Bahk YY, Oh ES. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 2004 Jul 9; **279**(28): 29060-29065.
118. Balasubramanian S, Zhu L, Eckert RL. Apigenin inhibition of involucrin gene expression is associated with a specific reduction in phosphorylation of protein kinase Cdelta Tyr311. *J Biol Chem* 2006 Nov 24; **281**(47): 36162-36172.
119. Murugappan S, Shankar H, Bhamidipati S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKCdelta in platelets. *Blood* 2005 Jul 15; **106**(2): 550-557.
120. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Takezaki Y, Tasaka T, Togitani K, *et al.* A novel treatment strategy targeting polo-like kinase 1 in hematological malignancies. *Leukemia* 2009 Sep; **23**(9): 1564-1576.
121. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006; **1**(3): 1458-1461.
122. Pasder O, Shpungin S, Salem Y, Makovsky A, Vilchick S, Michaeli S, *et al.* Downregulation of Fer induces PP1 activation and cell-cycle arrest in malignant cells. *Oncogene* 2006; **25**(30): 4194-4206.
123. Murthy KG, Manley JL. The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev* 1995 Nov 1; **9**(21): 2672-2683.
124. Nakano Y, Fujitani K, Kurihara J, Ragan J, Usui-Aoki K, Shimoda L, *et al.* Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 2001 Jun; **21**(11): 3775-3788.
125. Monroy MA, Schott NM, Cox L, Chen JD, Ruh M, Chrvia JC. SNF2-Related CBP Activator Protein (SRCAP) Functions as a Coactivator of Steroid Receptor-Mediated Transcription through Synergistic Interactions with CARM-1 and GRIP-1. *Mol Endocrinol* 2003 December 1, 2003; **17**(12): 2519-2528.
126. Goddard DR, Bunning RAD, Woodrooffe MN. Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. *Glia* 2001; **34**(4): 267-271.
127. Yanagisawa H, Miyashita T, Nakano Y, Yamamoto D. HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ* 2003; **10**(7): 798-807.
128. Wabnitz Guido H, Köcher T, Lohneis P, Stober C, Konstandin Mathias H, Funk B, *et al.* Costimulation induced phosphorylation of L-plastin facilitates surface transport of the T cell activation molecules CD69 and CD25. *European Journal of Immunology* 2007; **37**(3): 649-662.

129. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, *et al.* RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 2007 May 11; **282**(19): 14056-14064.
130. Foster KG, Fingar DC. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony. *Journal of Biological Chemistry* 2010 May 7, 2010; **285**(19): 14071-14077.
131. Chang YC, Tien SC, Tien HF, Zhang H, Bokoch GM, Chang ZF. p210(Bcr-Abl) desensitizes Cdc42 GTPase signaling for SDF-1alpha-directed migration in chronic myeloid leukemia cells. *Oncogene* 2009 Nov 19; **28**(46): 4105-4115.
132. Patrucci L, Savino MT, Pellegrini M, Paccani SR, Migliaccio E, Plyte S, *et al.* Cooperation and selectivity of the two Grb2 binding sites of p52Shc in T-cell antigen receptor signaling to Ras family GTPases and Myc-dependent survival. *Oncogene* 2005 Mar 24; **24**(13): 2218-2228.
133. Cha H, Hancock C, Dangi S, Maignel D, Carrier F, Shapiro P. Phosphorylation regulates nucleophosmin targeting to the centrosome during mitosis as detected by cross-reactive phosphorylation-specific MKK1/MKK2 antibodies. *Biochem J* 2004 Mar 15; **378**(Pt 3): 857-865.
134. Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y. Akt phosphorylates and regulates Pcd4 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 2005 Dec 15; **65**(24): 11282-11286.
135. Knudsen ES, Wang JY. Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1997 Oct; **17**(10): 5771-5783.
136. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Sep 14; **101**(37): 13489-13494.
137. Henkes M, van der Kuip H, Aulitzky WE. Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Gleevec, Gleevec trade mark). *Ther Clin Risk Manag* 2008 Feb; **4**(1): 163-187.
138. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations and the unsettled problem of Bcr-AblT315I: looking into the future of controlling drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007 Mar; **7 Suppl 3**: S120-130.
139. Godl K, Wissing J, Kurtenbach A, Habenberger P, Blencke S, Gutbrod H, *et al.* An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 23; **100**(26): 15434-15439.
140. Scholten A, Poh MK, van Veen TA, van Breukelen B, Vos MA, Heck AJ. Analysis of the cGMP/cAMP interactome using a chemical proteomics approach in mammalian heart tissue validates sphingosine kinase type 1-interacting protein as a genuine and highly abundant AKAP. *J Proteome Res* 2006 Jun; **5**(6): 1435-1447.
141. Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MATM, Jørgensen C, Miron IM, *et al.* Systematic Discovery of In Vivo Phosphorylation Networks. *Cell* 2007; **129**(7): 1415-1426.

142. Geahlen RL. Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta* 2009 Jul; **1793**(7): 1115-1127.
143. Sangrar W, Gao Y, Scott M, Truesdell P, Greer PA. Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion. *Mol Cell Biol* 2007 Sep; **27**(17): 6140-6152.
144. Craig AW, Zirngibl R, Williams K, Cole LA, Greer PA. Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2001 Jan; **21**(2): 603-613.
145. Hikri E, Shpungin S, Nir U. Hsp90 and a tyrosine embedded in the Hsp90 recognition loop are required for the Fer tyrosine kinase activity. *Cellular Signalling* 2009; **21**(4): 588-596.
146. Shinnars NP, Carlesso G, Castro I, Hoek KL, Corn RA, Woodland RL, *et al.* Bruton's Tyrosine Kinase Mediates NF- κ B Activation and B Cell Survival by B Cell-Activating Factor Receptor of the TNF-R Family. *J Immunol* 2007 September 15, 2007; **179**(6): 3872-3880.
147. Dinh M, Grunberger D, Ho H, Tsing SY, Shaw D, Lee S, *et al.* Activation Mechanism and Steady State Kinetics of Bruton's Tyrosine Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2007 March 23, 2007; **282**(12): 8768-8776.
148. Hantschel O, Rix U, Schmidt U, Burckstummer T, Kneidinger M, Schutze G, *et al.* The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Aug 14; **104**(33): 13283-13288.
149. Yamashita Y, Watanabe S, Miyazato A, Ohya K, Ikeda U, Shimada K, *et al.* Tec and Jak2 kinases cooperate to mediate cytokine-driven activation of c-fos transcription. *Blood* 1998 Mar 1; **91**(5): 1496-1507.
150. Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, *et al.* Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 2005 Feb; **7**(2): 193-204.
151. Klawitter J, Anderson N, Christians U, Leibfritz D, Eckhardt SG, Serkova NJ. Time-dependent effects of imatinib in human leukaemia cells: a kinetic NMR-profiling study. *Br J Cancer* 2009 Mar 24; **100**(6): 923-931.
152. Wong MM, Cox LK, Chrivia JC. The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J Biol Chem* 2007 Sep 7; **282**(36): 26132-26139.
153. Samarin SN, Koch S, Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. Coronin 1C negatively regulates cell-matrix adhesion and motility of intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Jan 1; **391**(1): 394-400.
154. Nuti E, Casalini F, Avramova SI, Santamaria S, Fabbi M, Ferrini S, *et al.* Potent arylsulfonamide inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme able to reduce activated leukocyte cell adhesion molecule shedding in cancer cell models. *J Med Chem* 2010 Mar 25; **53**(6): 2622-2635.

155. Janji B, Giganti A, De Corte V, Catillon M, Bruyneel E, Lentz D, *et al.* Phosphorylation on Ser5 increases the F-actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells. *J Cell Sci* 2006 May 1; **119**(Pt 9): 1947-1960.
156. Wilson KF, Wu WJ, Cerione RA. Cdc42 stimulates RNA splicing via the S6 kinase and a novel S6 kinase target, the nuclear cap-binding complex. *J Biol Chem* 2000 Dec 1; **275**(48): 37307-37310.
157. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. Mechanism of inhibition of sequestration of protein kinase C alpha/betaII by ceramide. Roles of ceramide-activated protein phosphatases and phosphorylation/dephosphorylation of protein kinase C alpha/betaII on threonine 638/641. *J Biol Chem* 2007 Jul 13; **282**(28): 20647-20656.
158. Zhao Y, Zhang X, Guda K, Lawrence E, Sun Q, Watanabe T, *et al.* Identification and functional characterization of paxillin as a target of protein tyrosine phosphatase receptor T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Feb 9; **107**(6): 2592-2597.
159. Yang TT, Xiong Q, Graef IA, Crabtree GR, Chow CW. Recruitment of the extracellular signal-regulated kinase/ribosomal S6 kinase signaling pathway to the NFATc4 transcription activation complex. *Mol Cell Biol* 2005 Feb; **25**(3): 907-920.
160. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG, *et al.* Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 2008 Mar 1; **121**(Pt 5): 675-684.
161. Al Tanoury Z, Schaffner-Reckinger E, Halavatyi A, Hoffmann C, Moes M, Hadzic E, *et al.* Quantitative kinetic study of the actin-bundling protein L-plastin and of its impact on actin turn-over. *PLoS One* 2010; **5**(2): e9210.
162. Larsson N, Marklund U, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol* 1997 Sep; **17**(9): 5530-5539.
163. Matsushima-Nishiwaki R, Takai S, Adachi S, Minamitani C, Yasuda E, Noda T, *et al.* Phosphorylated heat shock protein 27 represses growth of hepatocellular carcinoma via inhibition of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 2008 Jul 4; **283**(27): 18852-18860.
164. Lontay B, Kiss A, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F. Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* 2005 Oct; **17**(10): 1265-1275.
165. Okan E, Drewett V, Shaw PE, Jones P. The small-GTPase RalA activates transcription of the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) gene via an AP1-dependent mechanism. *Oncogene* 2001 Apr 5; **20**(15): 1816-1824.
166. Prickett TD, Brautigan DL. Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Mol Cell Biol* 2007 Jun; **27**(12): 4217-4227.
167. Kong X, Gan H, Hao Y, Cheng C, Jiang J, Hong Y, *et al.* CDK11p58 phosphorylation of PAK1 Ser174 promotes DLC2 binding and roles on cell cycle progression. *J Biochem* 2009 Sep; **146**(3): 417-427.

168. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006 Feb 10; **124**(3): 471-484.
169. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, *et al.* Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* 2004 Apr 21; **23**(8): 1761-1769.
170. Lekmine F, Sassano A, Uddin S, Smith J, Majchrzak B, Brachmann SM, *et al.* Interferon-gamma engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein. *Exp Cell Res* 2004 Apr 15; **295**(1): 173-182.
171. Hauge C, Antal TL, Hirschberg D, Doehn U, Thorup K, Idrissova L, *et al.* Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J* 2007 May 2; **26**(9): 2251-2261.
172. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. *J Biol Chem* 2002 Oct 18; **277**(42): 39360-39367.
173. Rubin SM, Gall AL, Zheng N, Pavletich NP. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* 2005 Dec 16; **123**(6): 1093-1106.
174. Hansen K, Farkas T, Lukas J, Holm K, Ronnstrand L, Bartek J. Phosphorylation-dependent and -independent functions of p130 cooperate to evoke a sustained G1 block. *EMBO J* 2001 Feb 1; **20**(3): 422-432.
175. Theard D, Raspe MA, Kalicharan D, Hoekstra D, van ISC. Formation of E-cadherin/beta-catenin-based adherens junctions in hepatocytes requires serine-10 in p27(Kip1). *Mol Biol Cell* 2008 Apr; **19**(4): 1605-1613.
176. Garcia E, Stracher A, Jay D. Calcineurin dephosphorylates the C-terminal region of filamin in an important regulatory site: a possible mechanism for filamin mobilization and cell signaling. *Arch Biochem Biophys* 2006 Feb 15; **446**(2): 140-150.
177. Tsuji T, Ficarro SB, Jiang W. Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2006 Oct; **17**(10): 4459-4472.
178. Habelhah H, Shah K, Huang L, Burlingame AL, Shokat KM, Ronai Z. Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem* 2001 May 25; **276**(21): 18090-18095.
179. Kim TS, Kim HD, Kim J. PKCdelta-dependent functional switch of rpS3 between translation and DNA repair. *Biochim Biophys Acta* 2009 Feb; **1793**(2): 395-405.
180. Baldo P, Cecco S, Giacomini E, Lazzarini R, Ros B, Marastoni S. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008 Dec; **8**(8): 647-665.

8. Anhang

Abkürzungen

Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet. Englische Ausdrücke sind kursiv gedruckt. Für Gennamen wurden die Symbole nach dem HUGO Gene Nomenclature Committee verwendet

AK	Antikörper
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (amerikanische Artenkultursammlung) Manassas, USA
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum Albumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
CML	chronische myeloische Leukämie
CST	Cell Signaling Technology
DMSO	Dimethylformamide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Braunschweig, Deutschland
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetatsäure
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum
FDR	False discovery rate
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethansulfonische Säure
IAA	Iodoacetamid
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IP	Immunopräzipitation
IPI	International Protein Index
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
μ	Micro
l	Liter
LC	Flüssigchromatographie
m	Milli
M	Molar
min	Minute
MS	MassENSpektrometrie
MS/MS	tandem MS
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PK	Proteinkinase
PKC δ	Proteinkinase C δ
pS	Phosphoserin
pT	Phosphothreonin
PTM	Posttranslationale Modifikation
pY	Phosphotyrosin
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SC	Santa Cruz Biotechnology, Inc
SCX	Strong cation exchange (SCX) chromatography
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src homology domain 2
siRNA	Short interfering RNA
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung durch Aminosäuren in der
Zellkultur	
Src	Homolog zu v-src (sarcoma viral Onkogen)
StageTips	Stop and go Extraktion Tips
TiO ₂	Titanium dioxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZL	Totalzellysat
UBI	United Biomedical, Inc
V	Volt
vol/vol	Volumen/Volumen
Vol	Volumen
wt/wt	weight/weight (Gewicht/Gewicht)

Curriculu Vitae – Dipl. Biol. Susanne Breitkopf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	20.11.1981 in Dachau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Krokusweg 11 82140 Neu-Esting sbreitkopf@gmx.de

Ausbildung

Seit März 2007	Promotion am Max-Planck Institut für Biochemie, Abteilung für Molekulare Biologie (Direktor Prof. Dr. Axel Ullrich), Arbeitsgruppe <i>Cell Signalling</i> (Leitung PD. Dr. Henrik Daub), Martinsried, mit dem Thema „Proteomische Analyse der Imatinib-vermittelten Proteinregulation in Leukämiezellen“
Januar 2007	Studiumabschluss: Diplom Biologie (Abschlußnote: 1,4)
April 2006 – Januar 2007	Diplomarbeit in der Abteilung für Strahlenbiologie der Ludwig-Maximilians Universität, München (Leitung PD. Dr. Anna A. Friedl) mit dem Thema „Zellantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche durch Bestrahlung“
Oktober 2003 – Januar 2007	Hauptstudium an der Ludwig-Maximilians Universität, München mit dem Hauptfach Anthropologie und Humangenetik und den Nebenfächern Immunologie, Genetik und physiologische Botanik
Oktober 2003	Vordiplom
Oktober 2001	Studiumsbeginn der Biologie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians Universität, München
Juni 2001	Schulabschluss: Abitur (Abschlußnote: 2,1)
September 1988 – Juni 2001	Schulausbildung am Gymnasium Olching und Grundschule Esting

Arbeitserfahrung

Juli 2005 – Oktober 2005	Praktikum an der Universidad Nacional de Colombia (Kolumbien), Sede San Andrés
Januar 2005 – Juli 2005	Werkstudent in der Abteilung für Strahlenbiologie der Ludwig-Maximilians Universität, München (Leitung PD. Dr. Anna A. Friedl)
Oktober / 2001 – June / 2005	Nachhilfelehrer für Mathematik und Chemie bei den Firmen Abacus Fürstenfeldbruck, Lernhilfezentrum Gröbenzell

9. Danksagung

Die Versuche wurden in der Cell Signaling-Gruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Henrik Daub durchgeführt. Diese Gruppe ist in der Abteilung für Molekulare Biologie (Direktor Prof. Dr. Axel Ullrich) am Max-Planck Institut für Biochemie (Martinsried, Deutschland) eingegliedert. Diese Arbeit war nur möglich, durch die Unterstützung vieler Leuten die mir dadurch die letzten drei Jahre zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben. Ich danke euch dafür!

Im speziellen möchte ich folgenden Leuten danken:

Meinem Betreuer PD Dr. Henrik Daub, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesen tollen Projekten, in einem erstklassigem wissenschaftlichem Umfeld zu arbeiten, für seine geduldige und hervorragende Betreuung und dafür dass er immer Zeit für seine Doktoranden hatte.

Prof. Dr. Axel Ullrich für seine großzügige Unterstützung der ganzen Cell Signaling-Gruppe und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung.

Besonderen Dank geht auch an meinen Zweitprüfer Prof. Dr. Stephan Sieber für die Begutachtung meiner Arbeit und an Prof. Dr. Michael Groll für seine Arbeit als Vorsitzender der Prüfungskommission.

Unserem Kooperationspartnern Prof. Dr. Matthias Mann, Prof. Dr. Jesper Olsen, Dr. Jürgen Cox und Dr. Chancel Kumar möchte ich für ihre Hilfen und Einführungen in die Techniken der MS, sowie für den frühen Zugang zur Software MaxQuant danken.

Prof. Dr. György Keri danke ich für die Bereitstellung der nicht-kommerziell erhältlichen Protein-Kinase Inhibitoren.

Prof. Dr. Justus Duyster, PD Dr. Nikolas von Bubnoff und Jana Sänger vom Klinikum „Rechts der Isar“ der Technischen Universität München für ihre Kooperation in den murinen Resistenzanalysen.

Meinen Kollegen Caroline, Christoph, Felix, Jacqueline, Kathrin, Kirti, Matthias, Markus, Martin, Michaela, Nina, Pavlos, Philipp, Thorsten, Ute,... für ihre Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und mit Diskussionen genauso wie für ihre Freundschaft.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich unterstützt hat und mir immer zur Seite stand.