

**Analyse der tonischen Antigenrezeptor-Signalleitung
in B-Zell-Neoplasien**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Roland Walter
aus Nürnberg

Frankfurt (2018)

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14)
der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe
PD Dr. Thomas Oellerich

Datum der Disputation: 16.04.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	10
1.1 Hämatopoese: Reifung und Aktivierung der B-Zelle	10
1.2 BZR-Signaltransduktion	12
1.2.1 Initiierung des BZR-Signals durch ITAM-Phosphorylierung	14
1.2.2 Cluster von BZR-Komplexen und deren Internalisierung	14
1.2.3 Aktivierung der Kinase SYK und die Rolle des Adapterproteins BLNK.....	15
1.2.4 Aktivierung der Bruton-Tyrosinkinase	17
1.2.5 Aktivierung der Phospholipase C gamma 2 und der Familie der Proteinkinasen C	17
1.2.6 Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase.....	18
1.2.7 Aktivierung der Proteinkinasen B.....	18
1.2.8 Aktivierung des MAPK-Signalweges.....	19
1.2.9 Negative Regulation des BZR-Signals	19
1.3 Tonscher BZR-Signalweg	20
1.4 Hämatologische Neoplasien	20
1.4.1 Akute lymphatische B-Zell-Leukämie (B-ALL)	20
1.4.2 Das Burkitt Lymphom	22
1.5 Das Hitzeschock-Protein 90	24
1.5.1 Familie und Funktion	24
1.5.2 Aufbau und Struktur von HSP90	25
1.5.3 Interaktion von HSP90 mit Klientproteinen	26
1.5.4 Rolle von Hitzeschock-Proteinen in Tumorzellen.....	27
2 Zielsetzung	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Geräte	29
3.1.2 Software	30
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	30
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien	31
3.1.5 Enzyme	33
3.1.6 Antikörper	33
3.1.7 Plasmide	34
3.1.8 Kit-Systeme.....	34
3.1.9 Oligonukleotide.....	35

3.1.10 Eukaryotische Zelllinien	36
3.1.11 Medien	37
3.1.12 Puffer und Lösungen	38
3.2 Methoden	41
3.2.1 Kultivierung von Zellen und Bakterien	41
3.2.3 Inhibitionsexperimente in Zelllinien und primären Zellen	42
3.2.4 Stimulation des BZRs durch Anti-IgM	43
3.2.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung	43
3.2.6 Apoptose-Assay	45
3.2.7 Kompetitiver Proliferations-Assay	46
3.2.8 Bestimmung der Viabilität mittels XTT-Assay	47
3.2.9 Zellzyklusanalyse mit dem BrdU-Assay	47
3.2.10 Bestimmung des Calciumfluxes nach Aktivierung des BZR-Signalweges	48
3.2.11 Bestimmung der Zellzahl	48
3.2.12 Proteinisolierung aus Zellen	48
3.2.13 Massenspektrometrische Analysen	49
3.2.14 Arbeiten mit DNA	51
3.2.15 Klonierung von shRNA in Expressionsvektoren	52
3.2.14 Transfektion von HEK293T mit Plasmiden	57
3.2.15 Überexpression von TEL-SYK in DG75- und Daudi-Zellen	57
3.2.16 Proteinchemische Methoden	57
3.2.17 Lentivirus	59
3.2.18 Immunhistochemische Färbung von Primärmaterial	61
3.2.19 Densitometrische Quantifizierung von Immunoblots mit ImageJ	62
4 Ergebnisse	63
4.1 Untersuchung des tonischen BZR-Signalweges im Burkitt Lymphom	63
4.1.1 Reduktion der Oberflächenexpression des BZRs	63
4.1.2 Inhibition der Kinase SYK durch den SYK-Inhibitor PRT062607	68
4.2 Burkitt-Lymphom-Zellen zeigen eine hohe HSP90-Abhängigkeit	76
4.2.1 Der HSP90-Inhibitor AT13387 besitzt ein hohes apoptotisches Potenzial im Inhibitorscreen	76
4.2.1 Erhöhte Expression der HSP90-Isoformen im Burkitt Lymphom	77
4.2.3 Inhibition von HSP90 in Burkitt-Lymphom-Zellen führt zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose	79
4.3 HSP90-Inhibitoren zeigen eine erhöhte Effektivität in Tumorzellen	81

4.4 HSP90-Inhibition führt zu einem Verlust des BZR-Signals	82
4.4.1 HSP90-Inhibition führt zum Verlust von phosphorylierten Proteinen	82
4.4.2 Inhibition von HSP90 hemmt den tonischen BZR-Signalweg und dessen Aktivierung	87
4.4.3 Die inhibitorischen Effekte nach HSP90-Inhibition auf den tonischen BZR- Signalweg werden vorwiegend durch SYK vermittelt	90
4.5 SYK ist ein Klientprotein von HSP90 im Burkitt Lymphom, dessen Interaktion über HSP90 α -pY197 bzw. HSP90 β -pY192 erfolgt.....	99
4.6 Überexpression einer konstitutiv aktivierten Form von SYK führt zur Resistenz von Lymphomzellen gegenüber HSP90-Inhibition	102
4.6.1 Überexpression von TEL-SYK versetzt DG75 in einen Zustand vergleichbar nach SYK-Aktivierung durch Stimulation des BZR.....	102
4.6.2 TEL-SYK-Protein zeigt im Vergleich zu SYK eine stabile Expression nach HSP90- Inhibition.....	106
4.6.3 TEL-SYK überexprimierende Zellen sind resistent gegenüber HSP90-Inhibition durch AT13387	107
4.7 SYK wird nach HSP90-Inhibition aktiv über das Lysosom abgebaut	109
4.7.1 Proteinstabilität von SYK	109
4.7.2 Hemmung des Lysosoms, nicht aber des Proteasoms verhindert eine SYK- Degradierung nach HSP90-Inhibition.....	110
4.8 Untersuchung des tonischen Antigenrezeptorsignalweges in B-ALL-Zelllinien.....	114
4.8.1 Reduktion des prä-BZR auf der Membranoberfläche nach Knockdown der Rezeptorteilkomponente CD79a in RCH-ACV-Zellen	114
4.8.2 Effekte auf die Zellproliferation nach Verlust des prä-BZR.....	116
4.8.3 Deregulation des PI3K/AKT-Signalweges nach CD79a-Knockdown	117
4.8.4 Inhibition der Kinase SYK in der B-ALL.....	119
5. Diskussion	124
5.1 Inhibition des tonischen BZR-Signalwegs mit therapeutischem Potenzial.....	124
5.1.2 Inhibition der SRC-Kinasen.....	124
5.1.3 Inhibition der Kinase SYK.....	125
5.1.4 Inhibition von BTK.....	126
5.1.5 Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges	127
5.2 Das tonische BZR-Signal im Burkitt Lymphom ist abhängig von funktionellen HSP90s	127
5.3 HSP90-Inhibition beeinflusst den tonischen BZR-Signalweg über SYK	128
5.4 Inhibition von Hitzeschock-Proteinen als Therapieform.....	128

5.5 SYK ist ein Klientprotein von HSP90	130
5.6 TEL-SYK-Überexpression entkoppelt Burkitt-Lymphom-Zellen von ihrer HSP90- Abhängigkeit	130
5.7 Lysosomaler Abbau von SYK nach HSP90-Inhibition.....	131
5.8 Analysen des prä-BZR-Signalweges in B-ALL-Zelllinien	133
6. Zusammenfassung	134
7. Literaturverzeichnis.....	135
8. Abbildungsverzeichnis	154
9. Tabellenverzeichnis.....	157

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
α	anti
ABC	aktivierte B-Zelle
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	akute lymphatische B-Zell-Leukämie
BL	Burkitt Lymphom
BLK	B-Lymphozyt-Kinase
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BZR	B-Zellrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTD	C-terminale Domäne
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
F	Phenylalanin
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FOXO	<i>forkhead box protein</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GCB	<i>germinal centre B cell</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES-gepufferte Saline
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSF1	Hitzeschockfaktor 1
HSP	Hitzeschock-Protein
IC50	Inhibitorkonzentration bei halbmaximalem Inhibitionseffekt
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation

ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LYN	<i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	mittlere Domäne
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
m/v	Masse/Volumen
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl der Versuche
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (-Phosphat)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natronlauge
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i>
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP-40	4-Nonylphenyl-Polyethylenglycol
NTD	N-terminale Domäne
OD	optische Dichte
pAb	polyklonaler Antikörper
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC γ 2	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-Phosphodiesterase-gamma-2
prä-BZR	prä-B-Zellrezeptor
PS	Phosphatidylserin
pY	phosphoryliertes Tyrosin
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
S.O.C.-Medium	<i>super optimal broth medium supplemented with glucose</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>single hairpin RNA</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SRC	<i>sarcoma</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UniProt	<i>universal protein database</i>

V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid
Y	Tyrosin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese: Reifung und Aktivierung der B-Zelle

Die Blutbildung wird als Hämatopoese bezeichnet und findet beim Erwachsenen im Knochenmark und im lymphatischen System statt. Die verschiedenen Zellen des Blutes entwickeln sich hierbei in der Ontogenese aus gemeinsamen hämatopoetischen Stammzellen, aus denen Vorläuferzellen entstehen, die aus dem Knochenmark auswandern und in anderen Organen weiter heranreifen können. So entwickeln sich Vorläuferzellen beispielsweise im Thymus zu T-Zellen und in der Milz zu B-Zellen. Die Differenzierung der Vorläuferzellen hängt daher stark von der Umgebung und Lokalisation der jeweiligen Zelle ab.^{1,2}

Hämatopoetische Stammzellen sind pluripotent und können in myeloische als auch in lymphatische Zellen ausreifen.³⁻⁵ Im Vergleich hierzu sind weiter differenzierte Vorläuferzellen dazu nicht mehr in der Lage. Sie verlieren die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und weisen damit nicht mehr das gleiche Differenzierungspotenzial wie ihre Parentalgeneration auf. Ein Verlust dieser Fähigkeit ist bereits bei Stammzellen zu beobachten, die folglich in hämatopoetische Langzeit- und Kurzzeit-Stammzellen unterschieden werden können.⁶⁻⁹ Letztere weisen ein Selbsterneuerungspotenzial über eine Dauer von nur ca. 6 Wochen auf, bei dem eine vollständige Rekonstitution des hämatopoetischen Systems erfolgen kann.¹⁰ Sie differenzieren zu multipotenten Vorläuferzellen und diese wiederum zu allen ausgereiften Blutzellen.

Neben T-Zellen und natürlichen Killerzellen gehören die B-Zellen zur Gruppe der Lymphozyten. B-Zellen entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen (siehe Abbildung 1) und durchlaufen mehrere Entwicklungsschritte über Vorstufen der pro- und prä-B-Zelle, die schließlich zu einer reifen und funktionsfähigen B-Zelle führen, die klonal unterschiedliche Immunglobuline (Igs) auf der Zelloberfläche exprimieren.

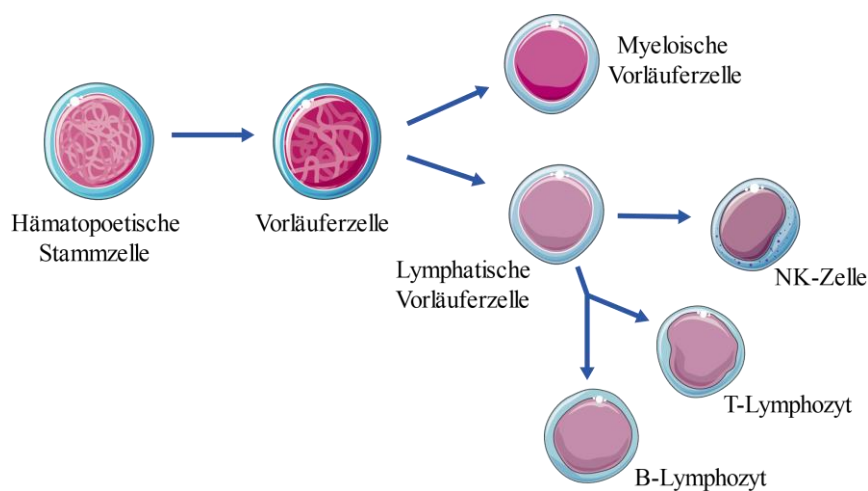


Abbildung 1: Entwicklung von B-Lymphozyten aus hämatologischen Stammzellen

Schematische Darstellung der möglichen Entwicklungsstufen einer hämatologischen Stammzelle in myeloische oder lymphatische Vorläuferzellen. Aus letzteren können sich natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), T-Lymphozyten und B-Lymphozyten entwickeln. Die Einzelbilder sind entnommen aus „Servier Medical ART“ (<https://smart.servier.com>) und wurden modifiziert.

Die klonalen Unterschiede der Igs kommen hierbei durch die RAG-1 (*recombination activating gene 1*) und RAG-2 (*recombination activating gene 2*) vermittelte Rekombinationen von drei Gensegmenten im Lokus der schweren Kette (V-, D-, J-Gen) und zwei Gensegmenten im Lokus der leichten Kette (V- und J-Gen) zustande.^{11,12}

Die frühe Phase der B-Zell-Entwicklung ist geprägt durch eine Reihe der oben beschriebenen Rekombinationen, die erstmals in prä-B-Zellen zu der Expression eines Vorläuferrezeptors, dem sog. prä-B-Zellrezeptor (prä-BZR) auf der Zelloberfläche führt. Der prä-BZR ist ein Ig, dessen invariante leichte Kette (Ersatz-leichte-Kette), bestehend aus $\lambda 5$ (CD179b) und VpreB (CD179a) sich mit der schweren Kette μ paart (siehe Abbildung 2).

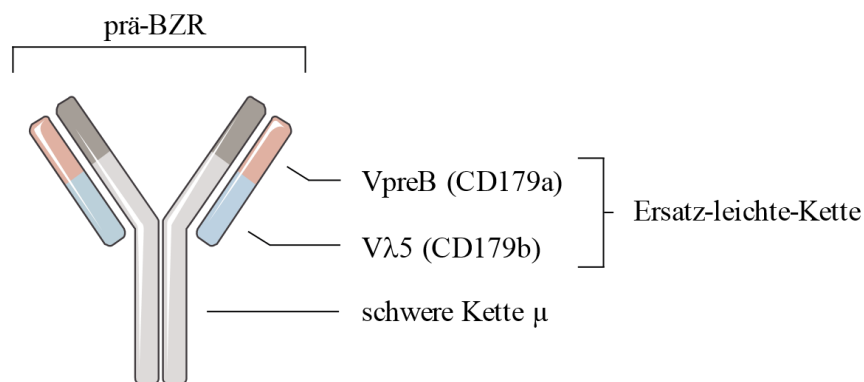


Abbildung 2: Aufbau des prä-B-Zellrezeptors

Schematische Darstellung des Aufbaus eines prä-BZRs, bestehend aus jeweils zwei Immunglobulinen der schweren Kette μ und zwei Ersatz-leichte-Ketten, die sich jeweils aus miteinander assoziierten VpreB- (CD179a-) und V λ 5- (CD179b-) Protein zusammensetzen. Die Abbildung des Antikörpers ist entnommen aus „Servier Medical ART“ (<https://smart.servier.com>) und wurde modifiziert.

Erst die Expression eines funktionalen prä-BZRs, der ein tonisches Überlebenssignal vermittelt, ermöglicht es der prä-B-Zelle zu überleben.¹³ Mäuse, die aufgrund von Mutationen hierzu nicht in Lage sind, zeigen einen Verlust von ausgereiften B-Zellen.^{14,15}

Wie ein solches Überlebenssignal initiiert wird, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Ein Modell beschreibt das auf der Oberfläche von Stromazellen des Knochenmarks exprimierte Galactin-1 als möglichen Liganden.¹⁶ Ein zweites Modell geht von einer autonomen Initiation des Signals aus, bei dem der prä-BZR durch Interaktion seiner leichten Immunglobulinkette mit der schweren Kette aktiviert wird.¹⁷ Die Aktivierung des prä-BZRs führt sowohl zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, bei dem im Gegensatz zu ausgereiften B-Zellen die Isoform PI3K p110 δ die entscheidende Rolle spielt,¹⁸ als auch zu einer starken Induktion der *B-cell lymphoma 6 protein* (BCL6)-Expression, die die Zelle vor Apoptose schützt.¹⁹

Mit der Expression des prä-BZRs unterbleiben auch die Rekombinationen für die Bildung der μ -Kette, so dass pro Zelle nur ein Klon einer schweren Kette exprimiert wird. Dieser Prozess wird als allele Exklusion bezeichnet.²⁰ Des Weiteren wird die Rekombination der Gene der leichten Kette initiiert, die letztlich auf den noch als unreif bezeichneten B-Zellen zu der Expression eines funktionsfähigen BZRs auf der Zelloberfläche führen (siehe Abbildung 3).

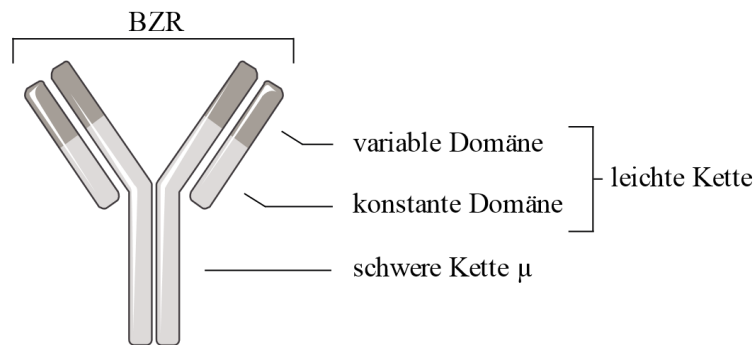


Abbildung 3: Aufbau des B-Zellrezeptors

Schematische Darstellung des Aufbaus eines BZRs bestehend aus jeweils zwei Immunglobulinen der schweren Kette μ und zwei leichten Ketten, die jeweils aus einer variablen und konstanten Domäne bestehen. Die Abbildung des Antikörpers ist entnommen aus „Servier Medical ART“ (<https://smart.servier.com>) und wurde modifiziert.

Im Gegensatz zu reifen B-Zellen zeigen unreife B-Zellen ein atypisches Verhalten und gehen nach Induktion des BZRs in Apoptose.²¹ Da die Induktion des BZRs zu diesem Zeitpunkt, fern jeglichen Antigens, nur durch sich selbst geschehen kann, ist dies eine Art der negativen Selektion, die zum Ausschluss von sich selbst stimulierenden (autoreaktiven) B-Zellen führt. Es wurde gezeigt, dass über die Hälfte aller neu gebildeten BZRs autoreaktiv sind.²² Nicht alle davon gehen in Apoptose. So können die BZRs der betreffenden Zellen nochmal verändert werden. Ein Prozess der als Rezeptor-Editierung bezeichnet wird.²³ Nichtsdestotrotz findet man im Menschen immer noch periphere B-Zellen, die einen autoreaktiven Charakter aufweisen, aber sich in einem inaktiven Zustand befinden, der als Anergie bezeichnet wird.²⁴

1.2 BZR-Signaltransduktion

B-Zellen tragen auf der Zelloberfläche bis zu 120 000 sog. BZR-Komplexe, die in ausgereiften B-Zellen normalerweise aus den beiden Immunglobulinen der Klasse M (IgM) und D (IgD) bestehen.^{25,26} Die spezifischen Funktion der einzelnen Isoformen ist jedoch bislang noch nicht hinreichend geklärt. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass jede Isoform die jeweilige andere bei Verlust kompensieren kann.²⁷⁻²⁹ In der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) konnten zwar funktionelle Unterschiede zwischen IgM- und IgD-vermittelten Signalwegen identifiziert werden, doch wird derzeit, auch im Hinblick einer im Vergleich zur IgM-Expression verminderte Expression von IgD in B-Zellen, die Rolle von IgD eher als ein Modulator des BZR-Signalweges interpretiert.³⁰ Aus diesem Grund wird im Folgenden die B-Zellsignaltransduktion über den BZR des IgM-Isotyps näher beschrieben (siehe Abbildung 4, nächste Seite).

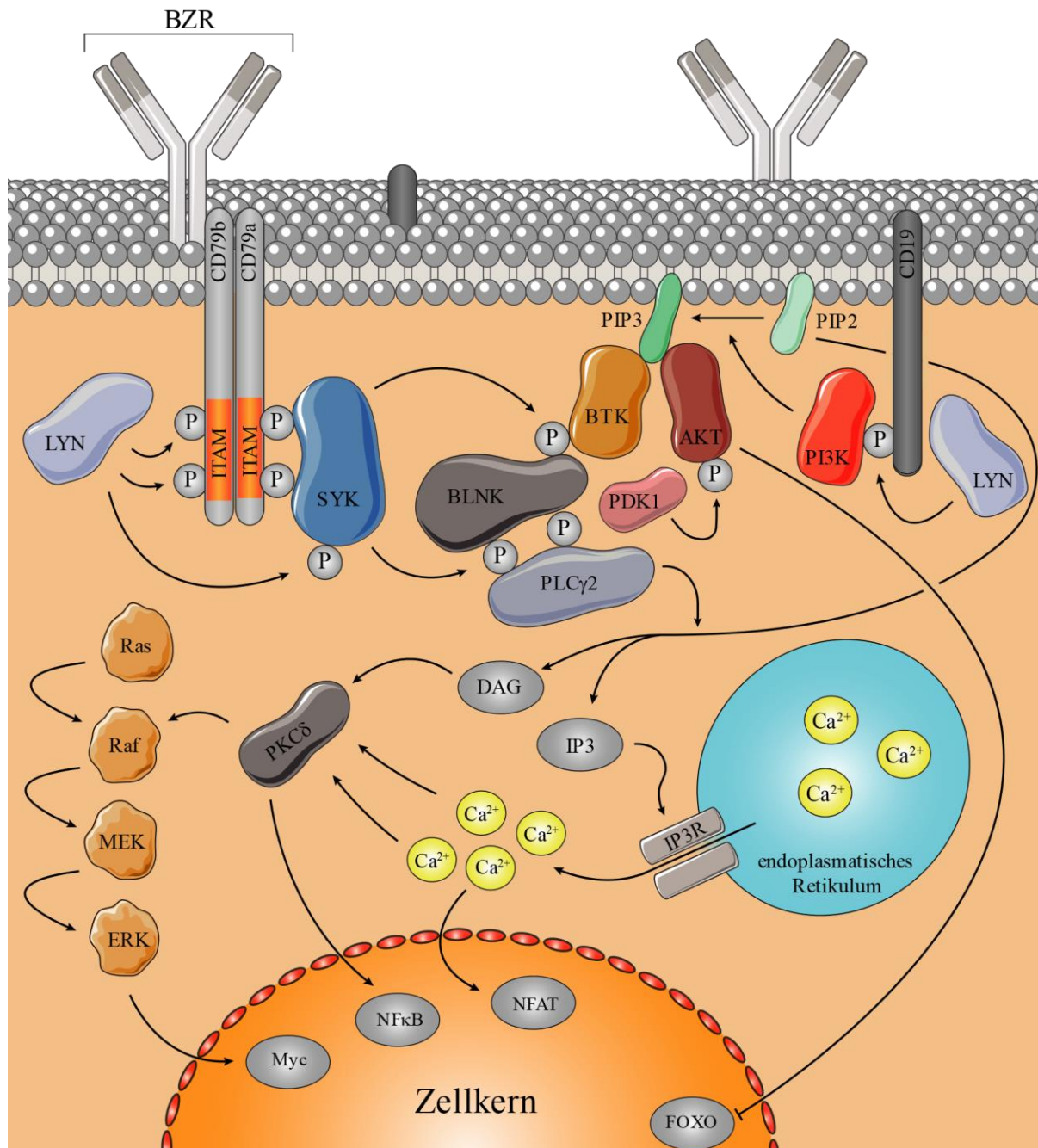


Abbildung 4: BZR-Signalweg über den IgM-Rezeptor

Schematische Darstellung einer B-Zelle mit ausgewählten BZR-Signalwegskomponenten: Transmembranproteine CD79a und CD79b mit gekennzeichneten ITAM-Regionen und CD19, spleen tyrosine kinase (SYK), *Lck/Yes novel tyrosine kinase* (LYN), *B-cell linker protein* (BLNK), *Bruton's tyrosine kinase* (BTK), Proteinkinase B (AKT), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2), Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase (PI3K), 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Phosphodiesterase-gamma-2 (PLC γ 2), Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1), Diacylglycerol (DAG), Inositoltriphosphat (IP3), Inositoltriphosphat-Rezeptor (IP3R), Isoform delta der Proteinkinase C (PKC δ), die GTPasen Ras, *rapidly accelerated fibrosarcoma kinase* (Raf), *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und die Transkriptionsfaktoren Myc, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell* (NF- κ B), *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), *forkhead box protein* (FOXO). Im Zuge der Aktivierung des BZR-Signalweges auftretende Phosphorylierungen einzelner Proteine sind mit „P“ gekennzeichnet. Die Abbildung ist modifiziert nach Hendriks und Kollegen³¹. Einzelne Bildelemente sind entnommen aus „Servier Medical ART“ (<https://smart.servier.com>) und wurden modifiziert.

1.2.1 Initiierung des BZR-Signals durch ITAM-Phosphorylierung

Die BZR-Signaltransduktion beginnt mit der Bindung von Antigenen an die variable Region der schweren und leichten Immunglobulinketten (IgH und IgL), die zu einer Aktivierung der B-Zelle bzw. des BZR-Signals führt. Der BZR auf der Zelloberfläche ist über die Immunglobuline α (CD79a) und β (CD79b) funktional mit dem Cytosol verbunden, so dass eine extrinsische Signaltransduktion in die Zelle erfolgen kann. CD79a und CD79b bilden hierbei über Disulfidbrückenbindung ein Heterodimer, das nicht kovalent an den BZR gebunden ist, aber als BZR-Komplex bezeichnet wird.³² Dieser Komplex spielt nicht nur bei der Signaltransduktion eine Rolle, sondern auch bei der Stabilisierung des IgMs auf der Oberfläche der B-Zelle. Bei einem Verlust von Ig α wird der BZR nicht auf der Zelle präsentiert, sondern verbleibt im endoplasmatischen Retikulum und wird intrazellulär degradiert.³³

CD79a und CD79b weisen zueinander eine starke Homologie auf und besitzen jeweils für die Signaltransduktion essentielle Motive, die sog. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs). Diese enthalten zwei Tyrosine (Y182 und Y193 in CD79a, Y196 und Y207 in CD79b), die durch die aktivierte Kinase SYK und durch Kinasen der SRC-Familie (SRC-Kinasen), wie zum Beispiel LYN, FYN und BLK, phosphoryliert werden können.^{34,35} Man geht davon aus, dass SRC-Kinasen in der Nähe der Rezeptoren lokalisiert sind, da diese einerseits über Alkylierung mit der Plasmamembran und andererseits über deren N-terminalen Bereich mit den nicht-phosphorylierten ITAMs nicht-aktivierter BZRs assoziiert sind.³⁶ Interessant dabei ist, dass SRC-Kinasen eine höhere Affinität zu CD79a als zu CD79b aufweisen. So favorisieren zum Beispiel BLK und LYN Substrate mit der Konsensussequenz I/L-Y-D/E-X-L (I : Isoleucin, L : Leucin, Y : Tyrosin, D : Asparaginsäure, E : Glutaminsäure, X : Platzhalter für eine variable Aminosäure), wie sie in der Proteinsequenz von CD79a, aber nicht in der von CD79b zu finden ist.³⁷ Es wurde gezeigt, dass CD79b die Phosphorylierung von CD79a verstärkt und nur die Phosphorylierungen der ITAMs von CD79a den vollständigen Effekt in der BZR-Signaltransduktion hervorrufen.³⁸ Dies wird auch in Immunpräzipitationen ersichtlich, bei denen die Kinase SYK mit einer erhöhten Affinität an biphosphorylierten ITAMs in CD79a im Vergleich zu ITAMs in CD79b bindet.³⁵

1.2.2 Cluster von BZR-Komplexen und deren Internalisierung

Die in der Literatur beschriebene Clusterbildung von BZR-Komplexen soll mit der Bindung eines Antigens mit einem BZR initiiert werden (Crosslinking-Modell). Dieses Modell ist auf den EGF-Rezeptor und Insulin-Rezeptor anwendbar.³⁹ Für den BZR vom IgM-Isotyp hat dieses Modell jedoch Schwächen. Es gibt Hinweise, dass BZR-Komplexe bereits im nicht-stimulierten Zustand in Clustern bzw. Oligomeren zusammengelagert sind und die Effekte nach Stimulation über ein sog. Dissoziations-Aktivierungs-Modell (DAM) erklärt werden können.^{40,41} Dieses Modell geht davon aus, dass aufgrund der räumlichen Nähe der Komplexe die für die Aktivierung der Signaltransduktion essentiellen Phosphorylierungsstellen in den ITAMs der Transmembranproteine CD79a und CD79b für Kinasen nicht zugänglich sind. Hierbei spielt das Cytoskelett eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass der BZR-Signalweg

nicht nur durch Antigene, sondern auch durch den F-Aktin Inhibitor Latrunculin A aktiviert werden kann.^{42,43} Erst nach Antigenbindung an den Rezeptor kommt es zur Dissoziation des Oligomers und Offenlegung der ITAMs für die Signaltransduktion bei der die Kinase SYK involviert ist. Zellen, die mit dem SYK-Inhibitor R406 behandelt wurden, zeigten erst bei höheren Antigenkonzentrationen eine vergleichbare Öffnung der ITAM-Phosphorylierungsstellen wie sie in unbehandelten Zellen auftritt.⁴³ So ist zum Beispiel auch zu erklären wie SRC-Kinasen, insbesondere LYN, nur ITAM-Regionen von BZR-Komplexen erkennen bzw. phosphorylieren, deren BZR ein Antigen gebunden hat. Eine mögliche Konformationsänderung von Antikörpern und damit auch des Rezeptors nach Antigenbindung ist bisher nicht beschrieben.⁴⁴ Durch einen quantitativen Bifluoreszenz-Komplementations-Assay konnte ferner das DAM bekräftigt werden.²⁵ Nicht-aktivierte BZR-Komplexe liegen demnach auf der Oberfläche als stabile Dimere vor. Eine mutierte Form des BZR, die hierzu nicht in der Lage war, war hyperaktiv und zeigte keine stabile Oberflächenexpression.

FRET-Analysen zeigen eine Vereinbarkeit beider Modelle bei der es nach BZR-Stimulation zunächst zu einer Clusterbildung und anschließend zu einer von der Aktivität von LYN abhängigen Aufweitung (Dissoziation) des zytosolischen Teils des BZR-Komplexes, nicht aber der Ektodomäne des Komplexes kommt.⁴⁵ Dementsprechend weiten sich die ITAMs und geben der Kinase SYK Raum zu interagieren. So ist auch zu erklären, warum SYK vorwiegend an aktivierte BZR-Komplexe bindet.⁴⁶ Nach Antigenbindung an den BZR kommt es zu einem lokalen Einstülpen der Membran und anschließender Kontraktion der Zelle, die zu einer Konzentration von BZR-Komplexen an einem Pol der B-Zelle führt (Capping).^{47,48}

Die Internalisierung des BZR-Komplexes erfolgt schließlich über einen Clathrin- und Dynamin-abhängigen Signalweg, bei dem es zu einer BTK-abhängigen Reorganisation von Aktin kommt.^{49,50} Clathrin assoziiert nach Antigenbindung mit dem BZR und wird durch die SRC-Kinase LYN phosphoryliert.⁵¹

Die Internalisierung des Rezeptors ist maßgeblich für die Terminierung des BZR-Signals und die Antigenprozessierung, aber interessanterweise gleichzeitig auch für eine effektive Transduktion des BZR-Signals. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von AKT nach Blockade des Internalisierungsprozesses durch den Dynamin-Inhibitor Dynasor nach Aktivierung des BZR-Signalwegs erniedrigt war.⁵² Es ist vorstellbar, dass AKT durch Ausbleiben der Internalisierung des Rezeptors länger in der Nähe der Zellmembran verbleibt und dort in Kontakt mit der Phosphatase PHLPP (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase*) tritt, die zur Dephosphorylierung und damit zur Inaktivierung von AKT führt.^{53,54}

1.2.3 Aktivierung der Kinase SYK und die Rolle des Adapterproteins BLNK

Die Tyrosinkinase SYK, die maßgeblich an der Initiierung der BZR-Signalleitung beteiligt ist, bindet an zweifach phosphorylierte ITAMs über ihre *tandem SRC homology 2 domains* (SH2-Domänen) und wird lokal durch SRC-Kinasen durch Phosphorylierung und durch

Autophosphorylierung aktiviert.^{34,55} Die Bindung von SYK an ITAMs ist Grundvoraussetzung für die Aktivierung von SYK. Im ungebundenen Zustand wird die Kinase-Domäne von SYK allosterisch durch seine eigene SH2-Domäne und der Linker-Region autoinhibiert (siehe Abbildung 5).⁵⁶

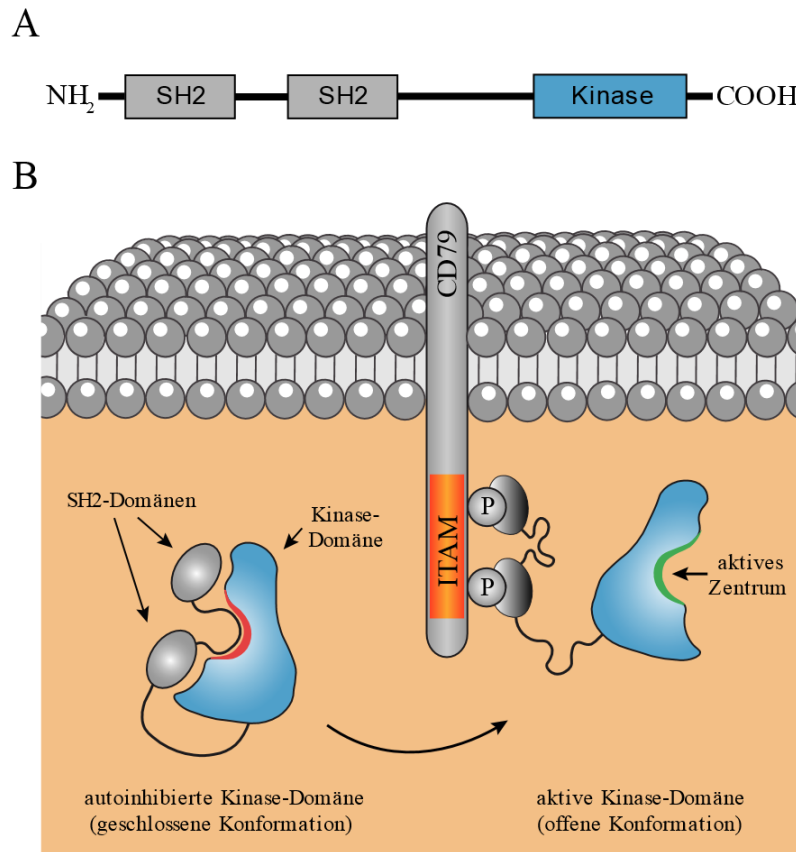


Abbildung 5: Modell für die Aktivierung der autoinhibierten Kinase SYK

(A) Aufbau der Kinase SYK mit Kennzeichnung der SH2- und Kinase-Domänen und der Amino- (NH₂-) bzw. Carboxylgruppe (-COOH). (B) Das Auflösen der geschlossenen Konformation nach Binden der SH2-Domänen der autoinhibierten Kinase SYK an phosphorylierte ITAM-Regionen von CD79a und CD79b (hier vereinfacht als CD79 dargestellt) führt zur Freilegung des aktiven Zentrums der Kinase-Domäne. Das aktive Zentrum der Kinasedomäne ist je nach Zustand in rot (inhibiert) oder grün (nicht-inhibiert) dargestellt. Phosphorylierte Stellen an CD79 sind mit „P“ gekennzeichnet. Die Abbildung ist modifiziert nach Mocsai und Kollegen⁵⁷.

Aktiviertes SYK ist essentiell für die Weiterleitung des BZR-Signalweges. Dies erfolgt durch Bindung und Phosphorylierung des *B-cell linker proteins* (BLNK, auch bekannt als SLP-65 oder BASH).⁵⁸ Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich SYK, nicht aber zum Beispiel die SRC-Kinasen für die Phosphorylierung von BLNK verantwortlich ist. BLNK ist ein Adapterprotein, das nach Aktivierung des BZR über seine SH2-Domäne an Tyrosine von CD79a bindet, die nicht in der ITAM-Region liegen und SYK so mit weiter *downstream* liegenden Effektoren funktional verknüpft.^{59,60} So wurde gezeigt, dass BLNK nach B-Zellaktivierung eine verstärkte Interaktion mit PLC γ 2, BTK, Vav, Grb2 und Nck aufweist und somit für die Aktivierung des Calcium- und NF- κ B-Signalwegs verantwortlich ist.⁶¹

1.2.4 Aktivierung der Bruton-Tyrosinkinase

Nicht nur ITAMs und SYK werden durch SRC-Kinasen phosphoryliert, auch die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) ist ein Substrat dieser Familie.⁶² Nach Aktivierung des BZRs wird BTK zur Plasmamembran rekrutiert.⁶³ Dies erfolgt über die PH-Domäne-Bindung mit Phosphatidylinositol-3,4-5-Triphosphat (PIP3) und führt zur Aktivierung von BTK über Phosphorylierung durch SRC-Kinasen, die über ihre SH3-Domäne direkt an eine Prolin-reiche Region von BTK binden können.⁶⁴⁻⁶⁷ Die Aktivierung von BTK ist essentiell für die BZR-Signaltransduktion und wird maßgeblich durch LYN und SYK beeinflusst und durch die Interaktion von BTK mit PIP3 reguliert.^{68,69} Mutationen in der PH-Domäne von BTK führen in Mäusen zu einer fehlerhaften BZR-Signaltransduktion und verschlechterter B-Zell-Reifung.⁷⁰ Beim Menschen führen BTK-Mutationen zur sog. Agammaglobulinämie, bei der B-Lymphozyten nicht vollständig ausgebildet werden können.^{71,72}

1.2.5 Aktivierung der Phospholipase C gamma 2 und der Familie der Proteinkinasen C

Nachdem die Kinasen LYN, SYK, BLNK und BTK durch Stimulation des BZRs aktiviert sind, folgt die nächste Ebene der Signaltransduktion mit der Aktivierung der Phospholipase C gamma 2 (PLC γ 2) durch BTK.⁷³ Für die optimale Aktivierung von PLC γ 2 sind phosphoryliertes BTK und BLNK essentiell.^{74,75} In BLNK-defizienten B-Zellen kann PLC γ 2 so zum Beispiel nicht an die Plasmamembran rekrutiert werden.⁷⁶

Durch BTK aktivierte PLC γ 2 konvertiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphate (IP $_3$). Letzteres bindet an IP $_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ERs) und steuert zunächst die Freisetzung von Calcium aus dem ER.⁷⁷ Ist der intrazelluläre Calciumspeicher entleert, erfolgt ein Influx extrazellulären Calciums.^{78,79} Es wurde gezeigt, dass mit den beiden unterschiedlichen Phasen bzw. Stufen der intrazellulären Calciumerhöhung auch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden.⁸⁰ So werden zum Beispiel *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) und cJun-N-terminale Kinase (JNK) in der initialen Phase, bei der Leerung des intrazellulären Calciumspeichers aktiviert, *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) hingegen eher bei einer länger anhaltenden Plateauphase des Calciumspiegels, wie er beim Influx über die Plasmamembran zu beobachten ist.^{81,82}

Das aus PIP2 entstandene DAG hingegen kann die Familie der Proteinkinasen C (PKC) aktivieren.^{83,84} PKC ist einerseits eng verknüpft mit der Aktivität der *mitogen-activated protein* (MAP-) Kinasen (MAPK). So ist beschrieben, dass PKC δ den MAPK-Signalweg aktiviert.⁸⁵ Andererseits ist auch eine Regulation des NF- κ B-Signalweges durch PKC beschrieben, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird. Eine Zusammenfassung dieser funktionellen Verknüpfung ist in einem Review von Moscat und Kollegen⁸⁶ zu finden.

1.2.6 Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase

Gold und Kollegen⁸⁷ konnten zeigen, dass auch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) im Zuge der Aktivierung des BZR-Signalweges aktiviert wird. Diese wird wiederum durch Erhöhung der Aktivität der katalytischen Untereinheit p110 der PI3K erreicht, die durch Bindung von Ras-GTP vollzogen wird.⁸⁸ In Folge der Aktivierung des BZR-Signalwegs phosphoryliert LYN Tyrosine des cytoplasmatischen Teils von CD19, an die die PI3K über SH2-Domänen in ihrer regulatorischen Untereinheit p85 binden kann.⁸⁹⁻⁹¹ Da CD19-defiziente B-Zellen aber weiterhin eine moderate Produktion von PIP3 aufweisen und weitaus mildere Effekte im Vergleich zu PI3K-defizienten Zellen zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass auch andere Proteine die Funktion von CD19 übernehmen PI3K über eine vorhandene SH2-Domäne an die Plasmamembran zu rekrutieren.^{89,92,93} Diese kann zum Beispiel durch das Adaptermolekül BCAP, die Ubiquitinligase Cbl und die Adaptermoleküle Gab1 und Gab2 erfolgen.⁹⁴⁻⁹⁶ So ist beschrieben, dass der Verlust von CD19 in Kombination mit BCAP, nicht aber alleine, zu einer nicht aktivierbaren PI3K-Aktivität nach Stimulation des BZRs führt.⁹⁷ Aber auch LYN vermag über seine SH3-Domäne und der prolinreichen Region mit der PI3K-Untereinheit p85 zu interagieren und so einen potenziellen Verlust von CD19 zu kompensieren.⁹⁸ Darüber hinaus ist beschrieben, dass die Aktivität von PI3K auch über die kleine GTPase TC21 reguliert wird, die PI3K mit CD79a funktionell verbindet.⁹⁹ Im nicht-phosphorylierten Zustand bindet PI3K auch an CD79a.¹⁰⁰

1.2.7 Aktivierung der Proteinkinasen B

Auch die Proteinkinasen B (PKB, auch als AKT bezeichnet), zu denen die in der Literatur beschriebenen AKT1, AKT2 und AKT3 gehören, weisen N-terminal eine PH-Domäne auf, die mit PIP3 interagieren kann. So wird nach Aktivierung des BZR-Signalweges durch PI3K gebildetes PIP3 auch AKT an die Plasmamembran rekrutiert.^{101,102} Für die Aktivierung der PKBs, die durch die *rapamycin-insensitive-mTOR-complex-2*- (mTORC2-) abhängige Phosphorylierung an Serin 473 und PDK1-abhängige Phosphorylierung von Threonin 308 stattfindet, ist nicht allein die Rekrutierung zur Plasmamembran entscheidend.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Vielmehr wird durch Bindung von PIP3 die Möglichkeit der Aktivierung von PKB durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 eröffnet (PDK1), die ebenfalls bei Aktivierung des BZRs an die Plasmamembran translokalisiert.^{107,108}

Aktiviertes bzw. phosphoryliertes AKT (pAKT) löst sich von der Plasmamembran und wandert in den Zellkern um dort mit mehreren Substraten (Transkriptionsfaktoren) zu interagieren, um so indirekt die Expression von Zielgenen zu aktivieren.¹⁰⁹ Hierzu gehören u. a. Transkriptionsfaktoren wie CREB, E2F und NF- κ B.¹¹⁰⁻¹¹² Aber auch eine Hemmung der Translation von Zielgenen ist beschrieben. So führt die Interaktion von AKT mit der Familie der Transkriptionsfaktoren FOXO zu dessen Phosphorylierung und daraus resultierend zu einer Gleichgewichtsverschiebung des Fluxes von FOXO aus dem Zellkern in Richtung des Cytosols.¹¹³ Die Expression der durch FOXO-regulierten Gene, die Zellzyklusarrest und Apoptose vermitteln, wird so inhibiert.¹¹⁴

1.2.8 Aktivierung des MAPK-Signalweges

Zur Familie der MAPK gehören die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK), c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) und die p38 MAPK, die sich gegenseitig durch Phosphorylierungen regulieren können.¹¹⁵ Jede aktivierten Kinase wiederum phosphoryliert distinkte Transkriptionsfaktoren. So werden Elk-1 und c-Myc von ERK, c-Jun und ATF-2 von JNK und ATF-2 und MAX von p38 MAPK phosphoryliert.¹¹⁶

Die Mechanistik der Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach BZR-Stimulation ist noch nicht hinreichend geklärt. Wie oben beschrieben, kann PKC δ unabhängig von dem kleinen G-Protein Ras den Signalweg über die Serin/Threonin-Proteinkinase Raf aktivieren.⁸⁵ Jedoch ist auch eine Ras vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalweges beschrieben.¹¹⁷

1.2.9 Negative Regulation des BZR-Signals

Nicht nur die Aktivierung des BZR-Signalwegs ist von entscheidender Bedeutung. In der Zelle gibt es eine Reihe von Regulationsmechanismen, über die die Aktivierung des Signalwegs kontrolliert bzw. dessen Aktivierung entgegengewirkt werden kann. Die Aktivierung des BZR-Signalweges läuft, wie oben beschrieben, über eine Reihe von Tyrosinkinassen ab. Als Gegenspieler hierzu sind die Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPasen) zu nennen, die die durch Tyrosinkinassen angehängten Phosphatreste wieder abspalten können.¹¹⁸ So resultiert die Behandlung von B-Zellen mit einem PTPasen-Inhibitor in einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung.¹¹⁹

Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 und 2 (SHP-1 und SHP-2) sind zwei wichtige cytoplasmatische PTPasen in B-Zellen, die die BZR-Signaltransduktion regulieren.¹²⁰ SHP-1 ist hierbei mit dem nicht aktivierten BZR über CD79a assoziiert und dissoziiert nach Aktivierung des Rezeptors.¹²¹ Des Weiteren ist gezeigt, dass SHP-1 das durch SYK phosphorylierte BLNK dephosphoryliert und so Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen kann.¹²² Damit ein Signalweg über eine Kinase aktiviert werden kann, muss dieses immer mit einer Deaktivierung oder Translokation der PTP einhergehen. Die Aktivität von PTPs wird reversibel durch H₂O₂ und das Redoxpotenzial in der Zelle reguliert.^{123,124}

Auf ausgereiften B-Zellen wird auch das transmembrane Glykoprotein CD22 exprimiert, das nach BZR-Aktivierung phosphoryliert wird.^{125,126} In diesem Zustand kann CD22 einen Komplex mit SHP-1 eingehen, die der Aktivierung des BZR-Signalwegs durch Dephosphorylierung von ITAM-Regionen in CD79a und CD79b entgegenwirkt.^{127,128}

Eine weitere beschriebene PTPase, die weiter *downstream* Einfluss auf die BZR-Signaltransduktion nimmt, ist *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN). Sie dephosphoryliert PIP₃, das Produkt der aktivierten PI3K.¹²⁹ Der Verlust der PTEN bzw. dessen Aktivität geht einher mit einer Akkumulation von PIP₃ in der Plasmamembran, die zu einer erhöhten Aktivität von AKT führt.¹³⁰

1.3 Tonischer BZR-Signalweg

Man geht davon aus, dass B-Zellen auch im nicht-aktivierten Zustand ein basales Level eines BZR-Signals aufweisen, das sie am Leben hält. So führt der Verlust des Oberflächenimmunglobulins oder der Transmembraneinheit CD79a zur Apoptose der B-Zellen.^{131,132}

Ein weiterer Signalweg, von dem die Zellen abhängig sind, ist der BAFF/APRIL-Signalweg, der über den BAFF-Rezeptor vermittelt wird.¹³³ Dieser spielt eine Rolle bei der interzellulären Kontrolle der Zellzahl und der Aufrechterhaltung der peripheren B-Zell-Population.¹³⁴ Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte nach Aktivierung des BAFF/APRIL-Signalweges über den kanonischen NF- κ B-Signalweg ablaufen.¹³⁵ Letzterer wird auch bei Aktivierung des BZR-Signalweges aktiviert.¹³⁶ So wurde zunächst davon ausgegangen, dass der tonische Signalweg sowohl über den BZR, als auch über den BAFF-Rezeptor abläuft und im NF- κ B-Signalweg mündet.¹³⁷ Experimente, bei denen ein konditionaler Knockout des BZRs bei gleichzeitiger konditionaler Aktivierung einzelner Signalwege durchgeführt wurde, zeigten jedoch, dass nicht der NF- κ B-Signalweg, sondern der PI3K/AKT-Signalweg die Zellen vor Apoptose nach BZR-Verlust schützen kann.¹³⁸ So phosphoryliert und inaktiviert AKT in der Apoptose relevante Proteine wie BAD, Caspase-9 und *forkhead-family*-Proteine.¹³⁹ Aus diesem Grund wird zum jetzigen Zeitpunkt der PI3K/AKT-Signalweg als wesentliche Komponente der tonischen BZR-Signalleitung wahrgenommen.

1.4 Hämatologische Neoplasien

Hämatologische Neoplasien ist ein Sammelbegriff für Erkrankungen, die von den Zellen des Blutes, des Knochenmarks und des Lymphsystems ausgehen. Hierbei handelt es sich um benigne und maligne Neubildungen. Darunter fallen auch die akute lymphatische Leukämie (ALL) und das Burkitt Lymphom, auf die in dieser Arbeit im Folgenden näher eingegangen wird.

1.4.1 Akute lymphatische B-Zell-Leukämie (B-ALL)

Charakteristisch für akute Leukämien ist die Proliferation und damit einhergehende Akkumulation von unreifen Zellen der Hämatopoese.¹⁴⁰ Diese werden als Blasten bezeichnet und sind zunächst im Knochenmark und schließlich auch im peripheren Blut nachweisbar. Aber auch weitere Organe nicht-lymphatischer Natur wie zum Beispiel die Leber, das Zentralnervensystem oder die Haut können betroffen sein. Das blutbildende Knochenmark wird sukzessiv durch die Blasten verdrängt. Zytopenien aller drei Zellreihen (Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie) sind die Folge.

Chromosomale Translokationen sind Kennzeichen einer B-ALL, sind aber allein nicht die einzige Ursache für die Krankheitsentstehung.¹⁴¹ Vielmehr zeigte eine genomweite Analyse von 242 pädiatrischen ALL-Patienten eine Vielzahl an kooperierenden Mutationen.¹⁴² So waren

40 % der Mutationen in Genen zu finden, die die Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen steuern. Das für den Transkriptionsfaktor PAX5 codierende Gen war in fast einem Drittel aller Patienten mutiert und führt zu einer reduzierten Expression. Interessanterweise entwickeln Mäuse, in denen Pax5 nicht exprimiert wird, häufig Lymphome.¹⁴³

Unter allen neu auftretenden Krebsfällen macht die ALL prozentual nur etwa 0,4 % aus (siehe SEER18 2007-2013, US-amerikanisches Register „Surveillance, Epidemiology, and End Results“), ist jedoch unter Kindern gesehen die häufigste Krebserkrankung.^{144,145} Die Prognosen unterscheiden sich hinsichtlich des Alters der Erstdiagnose. So besitzen Kinder eine Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 90 %. Bei Erwachsenen liegt sie zwischen 40 % und 50 %.¹⁴⁶ Obwohl die derzeitigen Therapieformen (Standardtherapien) zu einer vollständigen Remission bei 78 - 92 % der an ALL erkrankten Erwachsenen führen, bleiben nur 40 % der Patienten von einem erneuten Ausbruch der Krankheit verschont. Diejenigen, die einen Rückfall erleiden, zeigen eine 5-jährige Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 7 %, wohingegen sie bei der Erstdiagnose noch bei 38 % liegt.¹⁴⁷

Aus diesem Grund ist die Erstlinientherapie entscheidend für die Prognose des Patienten. Diese ist derzeit spezifisch auf die einzelnen Subtypen der heterogenen B-ALLs abgestimmt, deren WHO-Klassifizierung der Tabelle 1 aus dem Jahr 2016 zu entnehmen ist.

B-lymphoblastische Leukämien
B-lymphoblastische Leukämie (nicht näher spezifiziert)
B-lymphoblastische Leukämie eines BCR-ABL-ähnlichen Typs
B-lymphoblastische Leukämie mit iAMP21
mit Translokation t(9;22)(q34.1;11.2); BCR-ABL
mit Translokation t(v;q2.3), KMT2A
mit Translokation t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX
mit Translokation t(5;14)(q31.1;q2.3); IL3-IGH
mit Translokation t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
mit hyperploiden Chromosomensatz
mit hypoploiden Chromosomensatz
mit wiederkehrenden genetischen Abnormitäten

Tabelle 1: Subtypen der B-ALL nach der WHO-Klassifizierung aus dem Jahr 2016

Aufstellung der Subtypen der B-ALL mit Angabe der Translokationen (falls vorhanden) inklusive der dabei exprimierten Fusionsproteine. Tabelle modifiziert nach Arber und Kollegen¹⁴⁸.

Wie wichtig diese Erstlinientherapie ist, wird an dem Beispiel der Behandlung der Philadelphia-Chromosom-positiven ALL (Ph⁺ALL) deutlich.

Etwa 20 - 30 % aller adulten Patienten und weniger als 5 % aller Kinder mit B-ALL weisen eine Translokation zwischen dem Chromosom 9 und 22 auf, die zu einem verkürztem Chromosom 22 führt, das nach dem Ort der Entdeckung als Philadelphia-Chromosom bezeichnet wird.¹⁴⁹ Aufgrund der Translokation wird ein Fusionsprotein namens BCR-ABL exprimiert, das N-terminal aus dem BCR-Protein (*breakpoint cluster region*) und C-terminal aus der Tyrosinkinase *Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1* (ABL) besteht.

Aufgrund der Translokation wird die Expression von ABL über den BCR-Promotor reguliert und führt zu einer Überexpression der Kinase.

Werden B-ALL-Patienten mit Philadelphia-Chromosom (Ph⁺ALL) ausschließlich durch Chemotherapie behandelt, sprechen diese zwar an, zeigen jedoch gegenüber Patienten ohne der beschriebenen Translokation eine verminderte Remissionswahrscheinlichkeit.¹⁵⁰ So liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Ph⁺ALL nach 5 Jahren bei 10 - 20 %, wurden sie durch eine Monotherapie mit Chemotherapeutika behandelt.¹⁵¹⁻¹⁵⁶ Werden diese Patienten gleichzeitig mit Imatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor behandelt, so erhöht sich ihre Remissionsrate.¹⁵⁷ Dies zeigt deutlich, dass die Anpassungen der Behandlungsstrategie auf den jeweiligen Subtyp der B-ALL essentiell für die Prognose der Patienten ist und eine Klassifizierung nach oben gezeigtem Schema unerlässlich ist.

Im Allgemeinen wird die Therapie der ALL in drei Phasen (Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie) eingeteilt, bei der die Induktionstherapie das Ziel der schnellen Verringerung der Zahl an ALL-Zellen durch den Einsatz der Chemotherapie verfolgt. In der Konsolidierungsphase geht es schließlich darum die Heilung zu unterstützen und ein erneutes Ausbrechen der Krankheit zu verhindern.

1.4.2 Das Burkitt Lymphom

Das Burkitt Lymphom (BL) gehört zur Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome, die sich vom Hodgkin-Lymphom durch ein Fehlen der sog. Sternberg-Reed-Zellen abgrenzen.¹⁵⁸ Unter den Non-Hodgkin-Lymphomen zählt das Burkitt Lymphom zu den aggressiven Varianten mit einer hohen Zellteilungsrate. Gemessen anhand der Existenz von Ki-67, einem Marker für proliferierende Zellen, befinden sich nahezu 100 % aller Zellen in einer aktiven Phase des Zellzyklus.¹⁵⁹ Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet drei Formen des BLs: endemisch, sporadisch und HIV-assoziiert. Das endemische Burkitt Lymphom (eBL) findet man vor allem in Afrika, das erstmals 1958 von Dennis Burkitt zunächst als Sarkom beschrieben wurde und 30 - 50 % der auftretenden Krebsfälle in Kindern in Äquatorial-Afrika ausmacht.¹⁶⁰ Aber auch in Europa und USA tritt das eBL auf, das aus Gründen der Abgrenzung zum eBL in Afrika als sporadisch bezeichnet wird (sBL). Interessanterweise ist das eBL in fast allen Fällen mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert, wohingegen nur in etwa 10 - 20 % der Fälle des sBLs der Virus nachgewiesen werden kann.¹⁶¹ Die dritte Form des BLs ist die HIV-assoziierte. Menschen mit HIV-Infektion erkranken mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit am BL.¹⁶²

Kennzeichen des BLs sind Translokationen in den Chromosomen 8 und 14, die erstmals 1976 beschrieben wurden.¹⁶³ Dabei handelt es sich um Translokationen des MYC-Gens (auch bekannt als cMYC), das durch die Translokation neben dem Locus des Immunglobulins der schweren Kette integriert und unter dessen Promotor eine konstitutive Expression erfährt.^{164,165} In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse, die eine konstitutive

Expression von Myc aufweisen Lymphome entwickeln.¹⁶⁶ Da eine erhöhte Expression von MYC zur Apoptose führen würde, die auch über einen p53-vermittelten Mechanismus ablaufen kann, ist es wenig verwunderlich, dass man in über einem Drittel der BL-Patienten und in rund zwei Dritteln der Burkitt-Lymphom-Zelllinien zudem eine inaktivierende Mutation in p53 findet.¹⁶⁷⁻¹⁷⁵

Weitere Mutationen, die das BL auszeichnen sind zum Beispiel Mutationen im Zellzyklus-relevanten CCND3-Gen über die die hohe Proliferationsrate des BLs erklärt werden kann. Des Weiteren weisen 70 % des sBLs eine Mutation in den für BL essentiellen Transkriptionsfaktor TCF3 und/oder seinem inhibierendem Interaktionspartner ID3 auf.¹⁶¹ Es ist beschrieben, dass TCF3 an die Promotorregion von PTPN6 bindet und die Expression des Genprodukts, die Phosphatase SHP-1, negativ reguliert. Die Rolle von SHP-1 im tonischen Signalweg des BLs wird an anderer Stelle diskutiert.

Da das BL und ein wesentlicher Teil der diffus großzelligen B-Zelllymphome (DLBCLs) aus entarteten B-Zellen des Keimzentrums (GCBs, *germinal centre B cells*) hervorgehen, muss, bevor eine spezifische Behandlung des BLs erfolgen kann, eine klare Abgrenzung zum DLBCL erfolgen.¹⁷⁶ Die Erstbehandlung des BLs erfolgt durch den Einsatz intensiver Chemotherapie aus einer Kombination aus mehreren Inhibitoren. Da das BL hochproliferierende Zellen beinhaltet, ist es sehr chemosensitiv und therapeutische Programme führen prinzipiell zu einer guten Remissionsrate.^{177,178} Im Gegensatz hierzu liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit einer chemoresistenten Form des BLs bei 7 % innerhalb von drei Jahren.¹⁷⁹

In den USA sind über die Hälfte aller BL-erkrankten Patienten über 40 Jahre alt. In Studien, die zur Optimierung der Therapieansätze durchgeführt wurden, ist diese Gruppe jedoch unterrepräsentiert.¹⁸⁰ So konnte gezeigt werden, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit immer noch vom Alter des Patienten abhängt, in dem die Krankheit auftritt bzw. behandelt wird.¹⁷⁷ Patienten, die älter als 55 Jahre waren zeigten nach 5 Jahren eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 62 %, während sie bei jüngeren Patienten noch bei 86 % lag.

Aus diesem Grund muss es das Ziel sein, die Therapie des BL zu optimieren und alternative oder kombinatorische Behandlungsstrategien zu entwickeln. Bei Patienten mit BL wäre es prinzipiell möglich MYC als Ansatzpunkt einer Therapie zu sehen. Präklinische Daten konnten bereits antitumorigene Effekte auf MYC nach Verwendung von sog. Bromodomäne-Inhibitoren zeigen.¹⁸¹⁻¹⁸³

Aber auch die an anderer Stelle dieser Arbeit beschriebene tonische Antigenrezeptorsignalleitung in B-Zellen kann als potenzieller Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien im BL gesehen werden. Aus diesem Grund wurde auch im Rahmen dieser Arbeit versucht, Einblicke in die Regulation des tonischen BZR-Signalweges zu gewinnen und potenzielle neue Ansatzpunkte für eine optimierte oder neuartige Therapie zu identifizieren.

1.5 Das Hitzeschock-Protein 90

In *Drosophila melanogaster* wurden 1962 eine Reihe von Proteine identifiziert, deren Expression nach einem Temperaturschock ansteigen.¹⁸⁴ Diese wurden als sog. Hitzeschock-Proteine (HSPs) bezeichnet. Heute ist bekannt, dass HSPs neben ihrer Chaperonfunktion auch wichtige Funktion in der Regulation von Signalwegen und der Aufrechterhaltung von zellulären Prozessen wie der Differenzierung oder Proliferation übernehmen.^{185–189}

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass insbesondere Hitzeschock-Protein 90 (HSP90) eine wesentliche Rolle bei der Antigenrezeptor-Signalleitung im Burkitt Lymphom spielt. Aus diesem Grund wird im Folgenden näher auf HSP90 eingegangen.

1.5.1 Familie und Funktion

Das Hitzeschock-Protein 90 (HSP90) gehört zur Familie der HSPs, die aus insgesamt sechs Mitgliedern bestehen. Diese werden hinsichtlich ihrer molekularen Größe in kleine HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und große HSPs eingeteilt.¹⁹⁰ Dabei entspricht die Nummer der ungefähren atomaren Masse der einzelnen Mitglieder der Kategorien in kDa. HSPs sind evolutionär konserviert und werden in allen Organismen exprimiert. Sie dienen in ihrer Hauptfunktion als Chaperone, die die Faltung von neu produzierten Proteinen unterstützen und diese stabilisieren.¹⁹¹ Obwohl die dreidimensionale Struktur (Konformation) eines Proteins durch seine Aminosäuresequenz determiniert ist und sich nach Gesetzen der Thermodynamik faltet, kann die Umgebung des Proteins negativen Einfluss auf dessen Konformation nehmen. In einer typischen Säugetierzelle befinden sich pro Milliliter Cytosol ca. 300 mg an Proteinen.¹⁹² Neu synthetisierte und sich im Faltungsprozess befindliche Polypeptide laufen Gefahr unter diesen Konditionen zu aggregieren oder eine falsche Konformation einzunehmen, bei der Proteine entstehen, die biologisch inaktiv sind, der Zelle schaden und zu Krankheiten führen können.^{193,194} Zudem sind Chaperone in der Lage, Proteine falscher Konformation zu erkennen und sie zielgerichtet dem Ubiquitin-Proteasom-System zum Ziel der Proteindegradierung zuzuführen.¹⁹⁵

Aber auch in Stressreaktionen, die die Homöostase der Zellen negativ beeinflussen, ist die Rolle der HSPs essentiell für die Zelle. So erfolgt zum Beispiel bei einer Hyperthermie eine Hochregulation der Expression von HSPs, die als sog. Hitzeschockreaktion bezeichnet wird.¹⁹⁶ Ziel der Zelle ist es hierbei, die funktionelle Struktur der Proteine und somit deren Funktion trotz störender Umwelteinflüsse weiterhin aufrechtzuerhalten. Die Hitzeschockreaktion selbst wird hierbei über Hitzeschockfaktoren (HSFs) reguliert, die konstitutiv exprimiert werden und unter Normalbedingungen als latente Monomere vorliegen. Nach auftretenden Stressreaktionen lagern sich HSFs zu Homotrimere zusammen, die dadurch eine höhere Affinität zu DNA erlangen. Durch Bindung der Trimere an Promotorsequenzen wird in Folge dessen die Expression von HSPs induziert.¹⁹⁷ Im Gegensatz hierzu gibt es auch mehrere konstitutiv exprimierte Varianten von HSPs, die nicht die oben beschriebene Regulation aufweisen. Hierzu gehören u. a. Mitglieder von HSP70 und HSP90.^{198–200}

Die Familie der HSP90, auf die sich in dieser Arbeit konzentriert wurde, ist hochkonserviert. Die Mitglieder dieser Familie machen etwa 1 - 2 % aller Proteine der Zelle unter homöostatischen Bedingungen aus.²⁰¹ Codiert werden sie von insgesamt 17 Genen (6 funktionale und 11 Pseudogene), die in vier Klassen unterteilt werden. Hierzu gehören die cytosolisch exprimierte Isoform HSP90AA (HSP90 α) und HSP90AB (HSP90 β), das im endoplasmatischen Retikulum vorkommende HSP90B und das TNF-Rezeptor assoziierte Protein 1 (TRAP), das in den Mitochondrien lokalisiert ist.²⁰²

1.5.2 Aufbau und Struktur von HSP90

Ein Vergleich der Proteinsequenz (Alignment) der HSP90-Klassen lässt eine Einteilung in einzelnen Domänen zu, die voneinander abgrenzbar sind und unterschiedliche Funktionen besitzen.²⁰²

HSP90 besitzt eine hoch konservierte amino-/N-terminale Domäne (NTD), die über eine mittlere Domäne (MD) mit einer C-terminalen Domäne (CTD) verknüpft ist.²⁰³ Obwohl HSP90 selbst keine Kernlokalisationssequenz beinhaltet, kann HSP90 aufgrund der jeweilig gebundenen Proteinen (Klientproteine) passiv in den Zellkern transportiert und dort nachgewiesen werden.^{204,205}

In der Zelle kommt HSP90 funktionell als Dimer vor. Die Interaktion beider Monomere findet über die CTD statt, die aus einem Mix aus α - und β -Helixen bestehen, wobei sich jeweils zwei α -Helixen pro Monomer zu einem Verbund formen.^{203,206} Die CTD ist es auch, die mit Co-Faktoren bzw. Co-Chaperonen interagiert.²⁰⁷

Die MD hingegen dient nicht nur als Verbindungsstück (Linker) zwischen NTD und CTD, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Funktionalität des Proteins an sich. Mutationen in diesem Bereich können dazu führen, dass Interaktionspartner, sowie regulatorische Co-Chaperone nicht mehr binden können.²⁰⁸

Über den Linker mit der CTD ist die NTD verbunden, in der die katalytische Einheit lokalisiert ist. Hier bindet HSP90 Adenosintriphosphat (ATP) und hydrolysiert es nach Assoziation mit dem Klientprotein zu Adenosindiphosphat (ADP). Viele HSP90-Inhibitoren, wie zum Beispiel Geldanamycin und die in dieser Arbeit verwendeten HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 binden in der ATP-Bindetasche und blockieren diese für die Bindung von ATP.²⁰⁹ Die Bindung von ATP trägt zur Funktion von HSP90 bei. So assoziiert das Co-Chaperon p23 nach Bindung von ATP an HSP90 und dissoziiert nach Hydrolyse von ATP zu ADP.²¹⁰ Die Bindung von ATP geht auch mit einer Konformationsänderung des HSP90-Dimers einher.²¹¹ So wechselt das Dimer zyklisch zwischen einer offenen, ADP-gebundenen und einer geschlossenen, ATP-gebundenen Form (siehe Abbildung 6, nächste Seite).

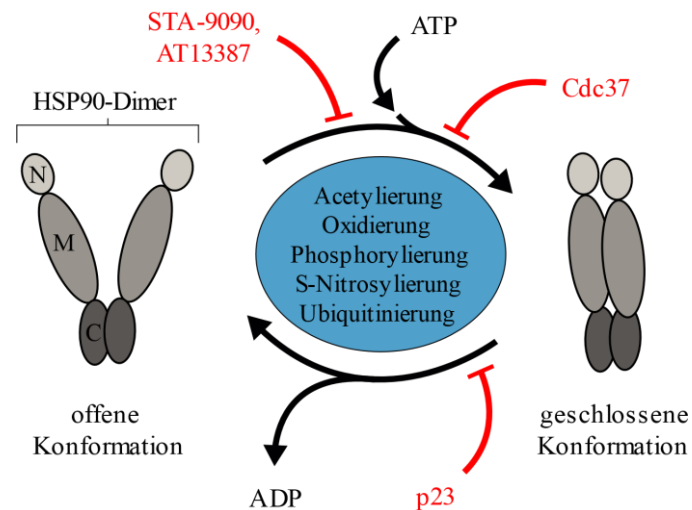


Abbildung 6: Regulation des Chaperonzyklus von HSP90

Schematische Darstellung des HSP90-Dimers mit seinen Einzeldomänen (N, N-terminale Domäne, M, mittlere Domäne, C, C-terminale Domäne) in seiner offenen (links) und geschlossener Konformation (rechts) und ausgewählte inhibitorische Regulatoren (rot markiert) des Chaperonzyklus. Posttranslationale Modifikationen von HSP90 mit Einfluss auf den Chaperonzyklus sind angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Mollapour und Neckers²¹⁶.

Dieser Zyklus ist essentiell für die Reifung der Klientproteine und kann durch den pH-Wert und durch Co-Chaperone, wie das oben erwähnte p23 reguliert werden.^{212,213} Des Weiteren ist beschrieben, dass posttranslationale Modifikationen an HSP90 ebenfalls Einfluss auf die Funktion des Chaperons nehmen können.^{214,215}

1.5.3 Interaktion von HSP90 mit Klientproteinen

Die Vielzahl an verschiedenen bis dato beschriebenen Klientproteine von HSP90 machen es schwer eine Erklärung für die Interaktion zu liefern. Im Gegensatz zu HSP70, das kurze hydrophobe Motive an Polypeptidketten erkennt,²¹⁷ ist es schwer vorstellbar, dass eine solche gemeinsame Erkennungsstruktur (Sequenzen oder Motive) für HSP90 existiert. Zwar wurde für einige Kinasen eine Sequenz identifiziert, die maßgeblich für die Interaktion ist, eine direkte Interaktion ist bisher aber noch nicht gezeigt.²¹⁸ Eine Einteilung von Klient- und Nicht-Klientproteinen von HSP90 anhand dieser Sequenz ist nicht gegeben.

Nicht immer dient die Interaktion mit HSPs zur Stabilität und Reifung von Proteinen. So kann auch deren Abbau forciert werden. Etwa 30 % aller humanen E3-Ubiquitin-Ligasen binden an HSP90 und stellen hierbei eine Verknüpfung zur zielgerichteten Degradierung von Proteinen her.^{195,219} So führt der Knockdown der E3-Ubiquitin-Ligase CHIP (*C terminus of HSP70-interacting protein*), die an HSP90 und HSP70 bindet, zu einer erhöhten Stabilität von einigen Klientproteinen.²²⁰ Ähnliche Effekte sind auch für Cullin-5 beschrieben.²²¹

1.5.4 Rolle von Hitzeschock-Proteinen in Tumorzellen

Die Tumorigenese bzw. Tumorzellen zeichnen sich durch bestimmte Kriterien aus. Diese sind laut Hanahan und Kollegen²²² eine unregulierte Proliferation zum Beispiel durch Unabhängigkeit gegenüber hemmenden Wachstumssignalen, Strategien den programmierten Zelltod zu entgehen und/oder die Fähigkeit Seneszenz zu vermeiden. Weitere Merkmale sind die Fähigkeit Angiogenese zu initiieren, zu metastasieren und zu invadieren. All diese Kennzeichen sind durch die Manipulation in Form einer erhöhten Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSPs) erreichbar. So ist es nicht verwunderlich, dass Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Zellen eine bis zu vierfach erhöhte Expression von HSPs aufweisen.²²³

Die Zellproliferation in Tumorzellen ist dereguliert. In normalen Zellen wird sie durch sezernierte Wachstumsfaktoren gesteuert, die an Oberflächenrezeptoren der Zelle binden und die Proliferation über zum Beispiel Enzyme vermitteln. Viele dieser Rezeptoren, so zum Beispiel *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und Enzyme wie das G-Protein Ras sind Klientproteine von HSP90 und verhalten sich nach erhöhter Expression oder Aktivierung durch Mutationen als Onkogene.^{224,225}

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation des Zellzykluses und Induktion der Apoptose nach DNA-Schädigungen.²²⁶ Einfluss scheint es aber auch auf die Karzinogenese zu nehmen, da Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom, die eine p53-Keimbahnmutation tragen, eine höhere Anfälligkeit gegenüber Krebs aufweisen.^{227,228} Dabei scheint die mutierte Form von p53 von der Expression von HSP70 und der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase MDM2 abhängig zu sein.²²⁹ HSP27 hingegen verhindert die Seneszenz über den p53-Signalweg.²³⁰

Der programmierte Zelltod wird durch Proteine reguliert, die von HSP70 und HSP27 stabilisiert werden. Beide Chaperone fungieren so als Inhibitoren der Apoptose.^{231,232}

Inwieweit HSPs bei der Angiogenese eine Rolle spielen, ist hingegen noch nicht hinreichend beschrieben. Im Plattenepithelkarzinom konnte gezeigt werden, dass Inhibition von HSP90 eine Degradierung von Hypoxie-induzierendem Faktor 1 α (HIF-1 α) zur Folge hat.²³³ Bei der Angiogenese ist eine erhöhte Stabilität von HIF-1 α essentiell um über den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die Angiogenese zu regulieren.²³⁴

Die Metastasierung und die Invasion von Tumorzellen ist ein komplexer Vorgang, dem eine Reihe von Genveränderungsprozessen vorangehen muss. So ist eine Expressionserhöhung von HSP90, HSP70 und HSP27 mit Metastasierung assoziiert.^{235–238}

2 Zielsetzung

Die Behandlung des Burkitt Lymphoms erfolgt derzeit aus einer Kombination aus Chemotherapie und der Gabe eines CD20-Antikörpers (Rituximab). Dieser Therapieansatz ist jedoch nicht für alle Patienten gleichermaßen wirksam. So zeigen, wie oben beschrieben, zum Beispiel ältere Patienten eine gegenüber jugendlichen deutlich verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit. Aus diesem Grund muss es das Ziel sein, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Hierfür gilt es neue Zielstrukturen in entarteten Zellen bzw. bereits ausgebildeten Tumoren des Burkitt Lymphoms zu identifizieren, die eine zielgerichtete und effektive Therapie, auch im endemischen Burkitt Lymphom, ermöglichen.

Um dieses Ziel zu erreichen ist ein Verständnis von Signalwegen und deren Regulation in den Zellen des Burkitt Lymphoms notwendig, die eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Viabilität der Zellen spielen. Manipulationen eines solchen Signalwegss stellen ein großes Potenzial zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien dar.

Im Burkitt Lymphom wurde in Vorarbeiten bereits gezeigt, dass ein tonisches Überlebenssignal existiert, das über den BZR vermittelt wird. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit der tonische BZR-Signalweg und deren Komponenten näher untersucht und verstanden werden. Dies sollte unter anderem durch Zuhilfenahme massenspektrometrischer Untersuchungen erfolgen, die über Analysen des Proteoms und/oder Phosphoproteoms einen Hinweis auf Regulationsmechanismen innerhalb des Signalwegs liefern können.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen des tonischen Signalweges sollen bisher unbeschriebene Zielstrukturen identifiziert und mechanistisch im Burkitt Lymphom validiert werden.

Nicht nur im Burkitt Lymphom, sondern auch in der B-ALL gibt es Erkenntnisse auf die Existenz eines solchen tonischen Überlebenssignals, das im Gegensatz zum Burkitt Lymphom über einen Vorläufer des BZR, dem prä-BZR vermittelt wird. Erste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass der intrinsischen Antigenrezeptorsignalleitung in beiden Neoplasien ähnlichen Regulationsmechanismen zu Grunde liegen könnten.

Aus diesem Grund soll im Folgenden auch durch Zuhilfenahme massenspektrometrischer Untersuchungen geklärt werden, ob ein tonisches Überlebenssignal in der B-ALL existiert, das ebenfalls als Ausgangspunkt für die Identifizierung neuer Zielstrukturen geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelkammer und Zubehör	Peqlab
Analysenwaage AG135	Mettler Toledo, Gießen
Autoklav Varioklav®	H&P Labortechnik, Oberschleißheim
Autoklav VX-150	Systec, Linden
Bunsenbrenner Labogaz 206	Campinggaz, Hungen
Blotwippe Duomax 1030	Heidolph
Schüttelgerät ST5 (wippend)	Cat, Ballrechten-Dottingen
Digitalwaage Universal	Satorius, München
Durchflusszytometer BD FACS Fortessa™	BD Bioscience, Heidelberg
Durchflusszytometer BD FACS Aria™ III	BD Bioscience, Heidelberg
Ein-Kanal-Pipette Xplorer® plus (elektronisch)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Feinwaage AG135	Mettler Toledo, Gießen
Feinpipettensatz Eppendorf Research® plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Geldokumentationsgerät für Agarosegele	Herolab
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick, Wesseling-Berzdorf
Imaging System Odyssey® Fc	LI-COR, Lincoln (USA)
Inkubator HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Kühlschrank	Liebherr, Biberach
Massenspektrometer Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupol-Orbitrap	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Magnetrührer RCT Basic	IKA® Labortechnik, Staufen
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Axioskop 2 Plus	Carl Zeiss, Oberkochen
Multi-Rotator PTR-35	Grant-bio, Cambridgeshire
2000c Spektrometer (Nanodrop)	Peqlab (VWR), Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Neubauer, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
pH-Meter pH 522	WTW, Weilheim
Pipettierhelfer PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences, Biebertal
Reaktionsgefäßrüttler Vortex Mixer	Neo Lab, Heidelberg
Roller RM 5	CAT, Ballrechten-Dottingen
SpeedVac (Concentrator Plus)	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Spannungsgerät PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad, München
Stickstofftank MVE TEC 3000	Chart, Garfield Heights (USA)
Thermozykler T100™	Bio-Rad, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima XPN-80	Beckman Coulter, Krefeld
Ultraschallhomogenisator mit Power Supply	Bondelin
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel

Name	Hersteller
Wasserdeionierungsanlage	Millipore, Bergisch-Gladbach
Werkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Western Blot Kammern und Zubehör	Bio-Rad, München
Zellzählgerät TC20™	Bio-Rad, München
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.2 Software

Name	Quelle
Adobe Creative Suite 6 Design & Web Premium	Adobe, Dublin
BD FACS Diva Software Version 8.0.1	BD Bioscience, Heidelberg
Easy-to-Use Image Studio v3.1	LI-COR
FlowJo® V10	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, Inc.
IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	QIAGEN Bioinformatics
MaxQuant	Cox und Kollegen ²³⁹
Odyssey Fc	LI-COR Biosciences
Perseus	Tyanova und Kollegen ²⁴⁰
ImageJ	https://imagej.net/
UniProt (humane Proteindatenbank)	https://www.uniprot.org

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bechergläser	Schott, Mainz; Brand Wertheim
Chromatographie-Papier (Whatman Papier)	Th. Geyer
Einfrigerboxen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz; Brand Wertheim
FACS-Röhrchen mit Filter (#352235)	Corning, Wiesbaden
FACS-Röhrchen (#55.1575)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Messzylinder	Schott, Mainz; Brand Wertheim
Nitrozellulose Membran (0,45 µM)	Bio-Rad, München
Objektträger für die Zellzählung (Dual-Chamber)	Bio-Rad, München
Parafilm (#PM-996)	Bemis (VWR),
Pasteurpipetten	Hirschmann®Laborgeräte, Eberstadt
Petrischalen (10 x 1,5 cm; 15 x 1,5 cm)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Plastikpipetten	Costar GmbH, Bodenheim
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen

Name	Hersteller
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugationsgefäße Ultra Clear	Beckmann Coulter
Skalpell	Feather
Omnifix Luer (50 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Untersuchungshandschuhe (Peha-soft Nitril)	Hartmann
Zellkulturplatten	Costar GmbH, Bodenheim
Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Name	Produktnummer	Hersteller
1-kb DNA-Molekulargewichtsleiter	#D3937	Sigma-Aldrich
10x Tris/Glyzin Puffer	#161-0771	Bio-Rad, München
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	#161-0772	Bio-Rad, München
100 bp DNA-Molekulargewichtsleiter	#SM0241	Thermo Fisher Scientific
2-Propanol	#33539-M	Merck
4x Lämmli Probenpuffer	#161-0747	Bio-Rad, München
7-AAD	#559925	BD Bioscience, Heidelberg
Acrylamidlösung (30 %)	#A3626,0500	Applichem
Albumin Fraktion V (pH 7,0)	#A6588,0100	Applichem
Ammoniumpersulfat (APS)	#9592.3	Carl Roth
Ampicillin-Natriumsalz BioChemica	#A0839,0025	Applichem
β -Glycerophosphat	#G9891	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	#A1108,0025	Applichem
cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	#11484100	Roche
Dimethylsulfoxid	#A3672	Applichem
Doxycyclinehydrate	#D9891	Sigma-Aldrich
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	#A5097	Applichem
Ethanol (absolut 99,8 %)	#2410-2.5L-R	Sigma-Aldrich
FastDigest Green Buffer (10x)	#B72	Thermo Fisher Scientific
Fc-Rezeptor-Blockierlösung (human)	#130-059-901	MiltenyiBiotec
Formaldehyd, 16 % (m/v), Methanol-frei	#28906	Thermo Fisher Scientific
GelPilot DNA Loading Dye	#239901	Qiagen
HD Green Plus Safe DNA dye	ISII-HDGreen Plus	Intas
Kaliumchlorid	#A2939,0500	Applichem

Name	Produktnummer	Hersteller
L-Glutamin (100x, 200 mM)	#25030-024	Gibco
LB-Agar (Lennox)	#X965.1	Carl Roth
LB-Medium (Lennox)	#X964.1	Carl Roth
Methanol	#32213-M	Sigma-Aldrich
Milchpulver, Blotting grade	#T145.2	Carl Roth
Natriumazid (NaN ₃)	#13412	Riedel de Haen
NaCl	#194848	MP Biomedicals
Natriumdeoxycholat	#30970	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	#A1112	Applichem
Natriumfluorid	#6449	Merck
Natriumhydroxid	#A2509	Applichem
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	#A2196,0005	Applichem
N-Ethylmaleimide	#E3876	Sigma-Aldrich
NEBuffer Pack for T4 DNA Ligase	#M0202	New England BioLabs
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	#2367.1	Carl Roth
NP-40 (10 % in H ₂ O)	#2111	BioVision
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	#NP0007	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	#NP0009	Thermo Fisher Scientific
Onalespib (AT13387)	#S1163	Selleckchem
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set	#23208	Thermo Fisher Scientific
Protein A/G PLUS-Agarose	#sc-2003	Santa Cruz
Protein-Größenstandard <i>Precision Plus Prot. All Blue Standard</i>	161-0393SP	Bio-Rad
Protein-Größenstandard <i>Precision Plus Prot. Dual Color Standard</i>	161-0394SP	Bio-Rad
PRT062607	#S8032	Selleckchem
R406	#S2194	Selleckchem
Salzsäure (6N)	#0281.1	Carl Roth
TRIS-HCl	#9090.3	Carl Roth
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	#T8154	Sigma-Aldrich
Tween® 20 BioChemica	#A1389,0500	AppliChem
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	#10977049	Thermo Fisher Scientific
Universal-Agarose	#35-1020	Peqlab
Urea	#17-1319-01	GE Healthcare Life Sciences

3.1.5 Enzyme

Name	Produktnummer	Hersteller
Benzonase Endonuklease	#1.01695.0001	Merck
FastDigest EcoRI	#ER0273	Thermo Fisher Scientific
FastDigest XhoI	#FD0694	Thermo Fisher Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	#EF0654	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA-Ligase	#M0202S	New England BioLabs
Trypsin	#V5117	Promega

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primäre Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-β-Aktin pAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-β-Aktin pAb	Maus	Cell Signaling Technologie
Anti-AKT mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-BLNK pAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-BTK mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-CD79a pAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-ERK mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-GFP mAb	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-HA mAb	Ratte	Roche
Anti-HSP90α pAb	Kaninchen	Novusbio
Anti-HSP90β pAb	Kaninchen	Abcam
Anti-LYN mAb	Maus	Cell Signaling Technologie
Anti-LC3B pAb	Kaninchen	Novusbio
Anti-p53 mAb	Maus	Santa Cruz
Anti-pAKT mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-pBLNK pAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-pBTK pAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-pERK mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-Phosphotyrosin mAb	Maus	Merck Millipore
Anti-SYK mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie

3.1.6.2 Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Spezies	Hersteller
F(ab') ₂ anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	Ziege	Dianova
F(ab') ₂ anti-Maus IgG (H+L)-HRPO	Ziege	Dianova
F(ab') ₂ anti-Ratte IgG (H+L)-HRPO	Ziege	Dianova

3.1.6.3 Antikörper für Histo-Färbungen

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-HSP90α	Maus	GeneTex
Anti-HSP90β	Kaninchen	Abcam

3.1.6.4 Antikörper für Immunpräzipitation

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-HA mAb	Ratte	Roche
Anti-HSP90 α/β	Kaninchen	Abcam
Anti-SYK (C-20) pAb	Kaninchen	Santa Cruz

3.1.6.4 Sonstige Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-F(ab') ₂ anti-human IgM (μ)-unkonjugiert	Ziege	Dianova
Anti-human IgM APC mAb	Maus	eBioscience
IgG XP® (DA1E) mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technologie
Anti-Annexin A5 (PE-gekoppelt)	keine Angabe	BD Bioscience
IgG Fluor 647	Maus	eBioscience

3.1.7 Plasmide

Name des Plasmids	Verwendung	Quelle
LT3-GECIR	Expression von shRNA	Fellmann und Kollegen ²⁴¹
FUW-Luc-TEL-SYK-puro	Expression von TEL-SYK	Puissant und Kollegen ²⁴²
pMD2.G	Expression von VSV-G	Addgene (#12259)
pCMV-dR8.2 dvpr	Expression von gag und pol	Addgene (#8455)
psPAX2	Expression von gag und pol	Addgene (#12260)

3.1.8 Kit-Systeme

Name des Kits	Produktnummer	Hersteller
APC BrdU Flow Kit	#552598	BD Bioscience
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	#K0503	Thermo Fisher Scientific
NucleoBond®Xtra Midi EF	#740422.50	Macherey-Nagel
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	#23227	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Western Blotting Substrate	#32106	Thermo Fisher Scientific
QIAquick PCR Purification Kit	#28106	Qiagen
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	#34096	Thermo Fisher Scientific
Zell Proliferations Kit XTT	#A8088,1000	Applichem

3.1.9 Oligonukleotide

3.1.9.1 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Die Sequenzierungen der klonierten Plasmide (LT3-GECIR) wurden extern von der Firma SeqLab durchgeführt. Pro Sequenzierung wurde nur ein Oligonukleotid (Primer) verwendet. Lieferte die Sequenzierung mit dem *forward*-Sequenzierungsprimer kein Ergebnis, so wurde der *reverse*-Sequenzierungsprimer verwendet.

Name des Primers	Sequenz des Primers in 5'→3'-Richtung
<i>forward</i>	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTAC
<i>reverse</i>	ATGCTCCAGACTGCCTT

Tabelle 2: Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der Klonierung von shRNA in LT3-GECIR

3.1.9.2 Oligonukleotide zur Klonierung von shRNA zum Knockdown von Proteinen

Für die Klonierung von shRNA zum Knockdown von Proteinen wurden Oligonukleotide von der Firma Sigma-Aldrich bestellt (siehe Tabelle 3). Die jeweilige Zielsequenz der shRNA ist unterstrichen.

Ziel-mRNA	shRNA-Sequenz	Sequenz des Oligonukleotids in 5'→3'-Richtung (die jeweilige Zielsequenz der shRNA ist unterstrichen)
hCD79a	1	<u>TGCTGTTGACAGTGAGCGAGGGGCTTCCTTAGTCATATTC</u> <u>TAGTGAAGCCACAGATGTAGAATATGACTAAGGAAGCCC</u> <u>CCTGCCTACTGCCTCGGA</u>
hCD79a	2	<u>TGCTGTTGACAGTGAGCGAACGCTGCTGCTGTTTCAGGAAA</u> <u>TAGTGAAGCCACAGATGTATTTCTGAACAGCAGCAGCGT</u> <u>CTGCCTACTGCCTCGGA</u>
hCD79a	3	<u>TGCTGTTGACAGTGAGCGACCAGGCCCTGTGGATGCACAA</u> <u>TAGTGAAGCCACAGATGTATTGTGCATCCACAGGGCCTGG</u> <u>CTGCCTACTGCCTCGGA</u>
hLYN	1	<u>TGCTGTTGACAGTGAGCGACAGATTTGTTTTGACAATGTA</u> <u>TAGTGAAGCCACAGATGTATACATTGTCAAACAAATCTG</u> <u>GTGCCTACTGCCTCGGA</u>
hLYN	2	<u>TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCCGGACGACTTGTCTTTCAA</u> <u>TAGTGAAGCCACAGATGTATTGAAAGACAAGTCGTCCGG</u> <u>GTTGCCTACTGCCTCGGA</u>
hLYN	3	<u>TGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGGTGCTAAGTTCCTATTA</u> <u>TAGTGAAGCCACAGATGTATAATAGGGAACCTTAGCACCTT</u> <u>CTGCCTACTGCCTCGGA</u>

Tabelle 3: Oligonukleotide zur Klonierung von shRNA in LT3-GECIR

3.1.9.3 Oligonukleotide zur Klonierung von unspezifischer shRNA (Kontroll-shRNA)

Für die Klonierung von unspezifischer shRNA, die als Kontroll-shRNA für Knockdownsequenzen verwendet wurden, wurden Oligonukleotide von der Firma Sigma-Aldrich bestellt (siehe Tabelle 4). Die jeweilige unspezifische shRNA-Sequenz ist unterstrichen.

Name der shRNA-Kontrollsequenz	Sequenz des Oligonukleotids in 5'→3'-Richtung (die jeweilige unspezifische Sequenz der shRNA ist unterstrichen)
Ren	CTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAGGAAT <u>TATAATGCTTATCTATAGTGAAGCCACAGATGTATAGATAA</u> GCATTATAATTCCTCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CTAGAATTC
NTC	CTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGGCTG <u>AAGAGCCTGATCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGATCA</u> GGCTCTTCAGCCGGTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CTAGAATTC
GL2	CTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCACGTAC <u>GCGGAATACTTCGATAGTGAAGCCACAGATGTATCGAAGT</u> ATCCGCGTACGTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CTAGAATTC

Tabelle 4: Oligonukleotide zur Klonierung von Kontroll-shRNA in LT3-GECIR

3.1.10 Eukaryotische Zelllinien

3.1.10.1 Humane Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Zellen wurden durch Multiplexion (Heidelberg) authentifiziert. Informationen zu Zelllinien, die im Rahmen einer Kooperation verwendet wurden, sind der Publikation von Walter und Kollegen²⁴³ zu entnehmen und werden an dieser Stelle nicht gelistet.

Name der Zelllinie	Klassifizierung
BL2	Burkitt Lymphom
Daudi	Burkitt Lymphom
DB	DLBCL
DG75	Burkitt Lymphom
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen
RCH-ACV	B-ALL
Ramos	Burkitt Lymphom
SMS-SB	B-ALL
U2932	DLBCL

Tabelle 5: Klassifizierung verwendeter Zelllinien

3.1.10.2 *E.coli*

Name	Artikelnummer	Hersteller
kompetente <i>E. coli</i> (NEB 5-alpha)	#C2987H	New England BioLabs

3.1.11 Medien**3.1.11.1 Medien für eukaryotische Zelllinien**

Medium	Produktnummer	Hersteller
DMEM	#41965-062	Gibco
RPMI 1640	#21875-034	Gibco
RPMI für SILAC	#H280001300	Silantes
RPMI für SILAC	#H88365	Thermo Scientific

3.1.11.2 Medien für *E.coli*

Name	Artikelnummer	Hersteller
S.O.C.-Medium	#15544-034	Invitrogen
LB-Medium (Lennox)	#X964.1	Roth
LB-Agar (Lennox)	#X965.1	Roth

3.1.11.3 Zusätze für Zellkulturmedien

Zusatz	Produktnummer	Hersteller
Dialysiertes FKS	#F0392	Sigma-Aldrich
FKS	#F7524	Sigma-Aldrich
L-Arginin	#A5006	Sigma-Aldrich
L-Arginin:HCl (13C6, 99 %)	#CLM-2265-H-1	Euriso-top
L-Arginin:HCl (13C6, 99 %; 15N4, 99 %)	#CNLM-539	Euriso-top
L-Glutamin (100x, 200 mM)	#25030-123	Gibco
L-Lysin Dihydrochlorid	#L5751	Sigma-Aldrich
L-Lysin:2HCl (4,4,5,5-D4, 96 -98 %)	#DLM-2640	Euriso-top
L-Lysin:2HCl (13C6, 99 %; 15N2, 99 %)	#CNLM-291	Euriso-top
L-Prolin	#1713.2	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	#15140-122	Life Technologies

3.1.12 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Herstellung von Puffern und Lösungen beschrieben. Soweit nicht anders vermerkt, wurden wässrige Lösungen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Herstellung wurde stets ddH₂O verwendet.

3.1.12.1 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit Proteinen

3.1.12.1.1 Lysepuffer

NP-40-Lysepuffer

TRIS-HCl (pH 7,5)	50	mM
NaCl	150	mM
NaF	5	mM
NP-40 (10 %)	0,5	% (v/v)
Natriumorthovanadat	1	mM
25x Protease Inhibitor Cocktail	4	% (v/v)

Urea-Lysepuffer

HEPES (pH 8,0)	20	mM
Urea	9	M
Natriumorthovanadat	1	mM
Natriumdiphosphat	2,5	mM
β-Glycerophosphat	1	mM

3.1.12.1.2 Puffer und Lösungen für SDS-Page

10x SDS-Gellaufpuffer

Tris/HCl (pH 8.3)	250	mM
Glyzin	1,92	M
SDS (10 %)	0,4	% (v/v)

4x Lämmli Puffer

Der Puffer wurde im Verhältnis 1:4 (v/v) mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

Trenngel-Puffer

TRIS/HCl (pH 8,8)	1,5	M
SDS	0,4	% (m/v)

4x Sammelgel-Puffer

TRIS/HCl (pH 6,8)	0,5	M
SDS	0,4	% (m/v)

8 % Trenngel

Acrylamid (30 %)	4	ml
4x Trenngel-Puffer	3,75	ml
H ₂ O	7,1	ml
APS	150	µl
TEMED	6	µl

10 % Trenngel

Acrylamid (30 %)	5	ml
4x Trenngel-Puffer	3,75	ml
H ₂ O	6,1	ml
APS	150	µl
TEMED	6	µl

14 % Trenngel

Acrylamid (30 %)	7	ml
4x Trenngel-Puffer	3,75	ml
H ₂ O	4,1	ml
APS	150	µl
TEMED	6	µl

5 % Sammelgel

Acrylamid (30 %)	1,7	ml
4x Sammelgel-Puffer	2,5	ml
H ₂ O	5,45	ml
APS	125	µl
TEMED	12,5	µl

3.1.12.1.3 Puffer und Lösungen für Western BlotWettransfer-Puffer

Methanol	20	% (v/v)
10x SDS-Gellaufpuffer	10	% (v/v)

TBS-Tween (TBS-T)

TRIS/HCl (pH 8,0)	50	mM
NaCl	150	mM
KCl	2,5	mM
Tween-20	0,1	% (v/v)

Blockierlösung

Als Blockierlösung wurde standardmäßig eine 5 % (m/v) Magermilchlösung verwendet, bei der die Magermilch in TBS-T gelöst wurde.

Antikörperlösung

Primäre Antikörper wurden standardmäßig in 5 % (m/v) BSA-Lösung aufgenommen, bei der BSA in TBS-T gelöst wurde. Außerdem wurde die Lösung noch mit 0,5 % (v/v) Natriumazid versetzt.

Der verwendete anti-GFP-Antikörper wurde in Blockierlösung aufgenommen (siehe oben) und bei -20 °C gelagert.

3.1.12.2 Lösungen für Arbeiten mit DNATRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

TRIS/HCl (pH 8,0)	40	mM
Essigsäure	20	mM
EDTA	1	mM

Gel-Loading Puffer

Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Sonstige Puffer

Puffer	Produktnummer	Hersteller
HBSS	#H9269	Sigma-Aldrich
DPBS	#14190-094	Gibco

Hinweis: HBSS wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen und Bakterien

3.2.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Suspensionszelllinien

Alle Suspensionszelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ unter feuchten Bedingungen gehalten und dreimal die Woche gesplittet. Hierfür wurden die Zellen gezählt und in einem adäquaten Volumen an Zellkulturmedium aufgenommen um die jeweilig optimale Zelldichte an Zellen im Medium zu erreichen. Die jeweiligen Werte für die Zelldichte wurden dem jeweiligen Datenblatt der entsprechenden Zelllinie entnommen.

Als Zellkulturmedium wurde standardmäßig RPMI mit 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Außerdem wurde das Medium mit 10 % (v/v) FKS versetzt, das im Vorfeld für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert wurde.

Im Vorfeld massenspektrometrischer Untersuchungen wurden die Zellen über eine Dauer von mindestens 6 Zellteilungszyklen in SILAC- (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Medium kultiviert, das entweder mit normal-schwerem L-Arginin (172,2 g/mol) und L-Lysin (219,11 g/mol), mit den mittel-schweren Isotopenvarianten L-Arginin (216,62 g/mol, L-Arginin+6) und L-Lysin (223,13 g/mol, L-Lysin+4) oder mit den schweren Isotopenvarianten L-Arginin (220,59 g/mol, L-Arginin+10) und L-Lysin (227,05 g/mol, L-Lysin+8) versetzt wurde. Die Menge an zugegebenen Aminosäuren wurde an die jeweilige Zelllinie angepasst und ist in Tabelle 6 zusammengefasst. Statt FKS wurden dem SILAC-Medium zudem dialysiertes FKS zugegeben, das im Vorfeld für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und abzentrifugiert (15 min, ~ 2000 x g) wurde.

SILAC-Markierung	Aminosäure	Daudi	DG75
		c (mM)	c (mM)
„normal-schwer“	L-Arginin	0,37	0,25
	L-Lysin	0,89	0,61
„mittel-schwer“	L-Arginin+6	0,38	0,26
	L-Lysin+4	0,93	0,63
„schwer“	L-Arginin+10	0,38	0,26
	L-Lysin+8	0,89	0,60

Tabelle 6: Konzentrationen der Aminosäuren im SILAC-Medium

Zellen sind in der Lage einen auftretenden Prolinmangel durch Konversion von Arginin zu Prolin wieder zu beheben. Bei der Kultivierung der Zellen in SILAC-Medium, das mit den schweren Aminosäuren versetzt wurde, kann es so zu einer Konversion des „mittel-schweren“ oder „schweren“ Arginins zu Prolin kommen. Um diese Konversion zu verhindern und Fehler bei der späteren Analyse der massenspektrometrischen Ergebnisse zu minimieren, wurde dem SILAC-Medium daher standardmäßig 200 mg/l L-Prolin zugegeben.²⁴⁴

3.2.1.2 Kultivierung von adhärenenten HEK293T

HEK293T wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ unter feuchten Bedingungen in Zellkulturschalen gehalten. Als Zellkulturmedium fand DMEM mit 10 % (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin und eine Mischung aus Penicillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) Verwendung. Die Zellen wurden mehrmals die Woche gesplittet, so dass die Zellen nicht konfluent wurden.

Um die adhärenenten Zellen von der Platte zu lösen, wurde das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, ehe sie durch Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt wurden. Die Verdauungsreaktion wurde durch Zugabe einer größeren Menge an Medium gestoppt. Das darin enthaltene FKS enthält Protease-Inhibitoren, die die Reaktion unterbinden.

3.2.1.2 Kultivierung von *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte bei 37 °C in LB-Flüssigmedium und auf LB-Agarplatten. Zur Selektion der jeweiligen Klone wurde beides mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum versetzt.

3.2.3 Inhibitionsexperimente in Zelllinien und primären Zellen

3.2.3.1 Inhibition von SYK

Um den BZR-Signalweg zu untersuchen, wurden Zellen mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 bzw. R406 für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Titration von PRT062607 wurde die minimale effektive Konzentration auf eine Konzentration von $c = 250$ nM festgelegt, die standardmäßig für alle Experimente verwendet wurde.

3.2.3.2 Inhibition von HSP90

Der Einfluss von HSP90 auf den BZR-Signalweg wurde durch die Verwendung von zwei verschiedenen HSP90-Inhibitoren (AT13387 und STA-9090) untersucht. Nach Titration und Bestimmung der minimalen effektiven Konzentration des jeweiligen Inhibitors wurden standardmäßig 100 nM STA-9090 und 500 nM AT13387 verwendet.

3.2.3.3 Inhibitorscreen

Der Inhibitorscreen wurde in Kollaboration mit Prof. Dr. med. Thorsten Zenz (Heidelberg) durchgeführt und in Walter und Kollegen²⁴³ publiziert.

3.2.4 Stimulation des BZR durch Anti-IgM

Um den Einfluss von Inhibitoren (hier: PRT062607, AT13387 und STA-9090) auf den stimulierten BZR-Signalweg zu untersuchen, wird selbiger nach Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren aktiviert. Dies erfolgt durch Zugabe eines Anti-IgM-Antikörpers, der an den BZR bindet und die BZR-Signaltransduktion auslöst.

Für die Stimulationsversuche wurden 1×10^7 Zellen mit DPBS gewaschen und für 20 min in serumfreien Medium kultiviert um externe Stimuli zu minimieren, die zu einer möglichen (falsch positiven) Aktivierung des Signalweges führen. Nach Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Anti-IgM-Antikörper erfolgte eine Inkubationszeit von 5 min ehe die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert wurden.

3.2.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Analyseverfahren, bei dem Zellen hinsichtlich ihrer Form, Struktur oder Färbung untersucht werden können. Hierfür werden Zellen einer Zellpopulation im Durchflusszytometer zunächst durch hydrodynamische Fokussierung in einem Hüllstrom vereinzelt. Im vereinzelt Zustand werden sie dann durch einen Mikrokanal und den Messbereich eines Lichtstrahls und/oder Laser geleitet. Neben Messungen der Größe der Zellen über das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) oder der Granularität über das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) können auch Fluoreszenzmessungen mit unterschiedlichen Lasern, die je nach Konfiguration des Gerätes variieren, durchgeführt werden.

Eine Abwandlung des Systems ist in Durchflusszytometern gegeben, mit denen man die analysierten Zellen zudem anhand ihrer Eigenschaften in Echtzeit sortieren kann. Wird der kontinuierliche Hüllstrom durchbrochen und nur Einzeltropfen in denen nur eine Zelle Platz findet an den Detektoren vorbeigeleitet, kann der jeweilige Tropfen (inklusive der Einzelzelle) durch einen elektrostatischen Sortiermechanismus abgelenkt bzw. sortiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kam das Durchflusszytometer „LRS Fortessa“ für Zellanalysen und das Durchflusszytometer „FACS Aria III“ für Zellsortierungen zur Anwendung. Die jeweiligen Konfigurationen der Geräte sind der Tabelle 7 (siehe nächste Seite) zu entnehmen.

Cytometer: **LSR Fortessa**
 Name der Konfiguration: NEW BD Service 2-Blue 3-Red 6-Violet 5-YG

Laser	Wellenlänge (nm)	Detektoranordnung	Filtername	Parameter	in der Arbeit verwendete Dyes
rot	640	Trigon	R-670/30	APC	APC
blau	488	Trigon	B-695/40	PerCP-Cy5-5	7-AAD
			B-530/30	FITC	GFP
				SSC	
gelb-grün	561	Oktagon	G-610/20	PE-Texas Red	7-AAD, mCherry
			G-582/15	PE	PE

Cytometer: **FACS Aria III**
 Name der Konfiguration: 70u 488, 561, 633, 405 (3-5-3-6)

Laser	Wellenlänge (nm)	Detektoranordnung	Filtername	Parameter	in der Arbeit verwendete Dyes
rot	633	Trigon	R-660/20	APC	APC
blau	488	Trigon	B-695/40	PerCP-Cy5-5	7-AAD
			B-530/30	FITC	GFP
				SSC	
gelb-grün	561	Oktagon	G-610/20	PE-Texas Red	7-AAD, mCherry
			G-586/15	PE	PE

Tabelle 7: Konfigurationen der verwendeten Durchflusszytometer

Zusammenstellung der Konfigurationen der in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer LRS Fortessa (oben) und FACS Aria III (unten) mit Angabe der in dieser Arbeit verwendeten Dyes (letzte Spalte).

Auf die Bedienung der beiden Geräte wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Diese kann auf der Homepage des Herstellers durch das Studium der Bedienungsanleitung nachvollzogen werden. Vielmehr soll im Folgenden näher auf die grundlegenden Einstellungen wie das sog. „*Gating*“ und Kompensieren fokussiert werden, die in dieser Arbeit standardmäßig durchgeführt wurden, wenn Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert wurden.

Beide Durchflusszytometer wurden über die Software BD FACSDIVA™ bedient, über die eine Echtzeitanalyse der zu untersuchenden Zellen durchgeführt werden kann. Diese kann zum Beispiel in Form von Scatter Blots visualisiert werden, wie sie in Abbildung 7 (siehe nächste Seite) exemplarisch an der Zelllinie RCH-ACV dargestellt sind. Hierbei erfolgt die erste (*Gate*)-Einstellung über den *Forward Scatter* (FSC) und *Sideward Scatter* (SSC), die zur Diskriminierung der viablen Zellen herangezogen werden. Im nächsten Schritt werden Zellklumpen aus mehreren Zellen von der Messung ausgeschlossen, da diese zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen könnten. Mit den viablen Einzelzellen kann dann im Folgenden die eigentliche Analyse der Zellen hinsichtlich der Expression eines Reporterproteins (zum Beispiel GFP oder mCherry) oder einer Fluoreszenz nach Färbung der Zellen mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper (zum Beispiel APC- oder PE-gekoppelt) erfolgen.

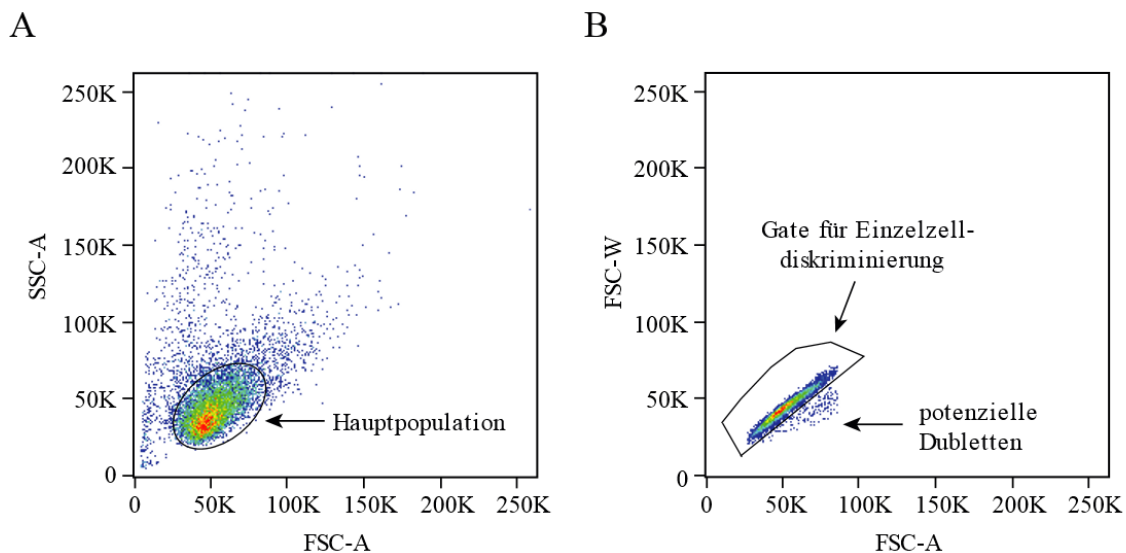


Abbildung 7: Exemplarische Gating-Strategie zur Vermeidung von Dubletten bei der Analyse von Einzelzellen

(A) Exemplarische Darstellung einer B-ALL-Zellpopulation im Forward- (FSC-A) und Sideward- (SSC-A) Scatter zur Diskriminierung der Hauptpopulation an Zellen. (B) Darstellung der Hauptpopulation aus (A) im FSC-A gegen den FSC-W zur Identifikation von Einzelzellen bzw. zum Ausschluss potenzieller Dubletten.

Tabelle 7 (siehe vorherige Seite) zeigt die jeweiligen Filtereinstellungen der Detektoren (siehe unter „Filtername“), mit denen die Messung bei der jeweiligen Wellenlänge erfolgte. Es ist zu erkennen, dass die Filter zwar so gewählt wurden, dass sie das jeweilige Optimum bzw. Maximum des Spektrums des jeweiligen *dyes* abdecken, aber auch einen Teil eines Fremdspektrums detektieren. So zum Beispiel bei gleichzeitiger Detektion von PE-gekoppelten-Antikörpern und 7-AAD im Fall der Durchführung eines Apoptose-Assays. Um falsch positive Ergebnisse zu reduzieren bzw. zu vermeiden, wurde daher bei Mehrfachfärbungen eine Kompensation durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine rechnerische Korrektur der Software, bei der der Anteil der Messung, der aus dem Fremdspektrum herrührt (entspricht dem Anteil der Überlappungsfläche der betrachteten beiden Spektren zur Gesamtfläche des zu analysierenden Spektrums), anteilig vom eigentlichen Signal abgezogen wird. Dieser Anteil kann über die Messung von Einzelfärbungen bestimmt bzw. eingestellt werden.

3.2.6 Apoptose-Assay

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods der Zelle, die physiologisch in fast allen Geweben vorkommt um u. a. die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase zu gewährleisten. Die Apoptose ist gegliedert in eine Reihe von aufeinander folgenden morphologischen Veränderungen der Zelle, beginnend mit dem Verlust der Membranasymmetrie. In apoptotischen Zellen kann daher im Gegensatz zu vitalen Zellen das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) auf der Membranaußenseite nachgewiesen werden.

Der hier verwendete Assay basiert auf der Calcium-abhängigen Bindung des Proteins Annexin A5 (im Folgenden als Annexin bezeichnet) an PS, sobald sich dieses auf der Membranaußenseite exponiert. Die Menge an gebundenem Annexin gibt so Auskunft über den vitalen Zustand der Zelle und kann aufgrund der Markierung durch einen Farbstoff (hier Phycoerythrin, PE) mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Eine Diskriminierung von Zellen, die sich in einer späten Phase der Apoptose und/oder sich bereits in einem nekrotischen Zustand befinden erfolgt durch gleichzeitige DNA-Färbung mit 7-AAD.

Für den Assay wurden jeweils 1×10^6 Zellen verwendet, die in 198 μ l Annexin-Binde-Puffer und 2 μ l PE-gekoppelten Annexin-Antikörper resuspendiert wurden. Nach Inkubation für 15 min bei 4 °C im Dunklen wurden die Zellen gewaschen und in 198 μ l Annexin-Bindepuffer und 2 μ l 7-AAD aufgenommen. Nach erneuter Inkubation im Dunkeln für 15 min bei 4 °C wurden 200 μ l FACS-Bindepuffer zugegeben und die Zellen im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Positivität auf Annexin und 7-AAD analysiert. Zur Einstellung des Durchflusszytometers (sog. „Gating“ und Kompensieren) wurden ungefärbte Zellen und Zellen mit den jeweiligen Einzelfärbungen verwendet.

Der Zellstatus wurde aufgrund der folgenden Kriterien beurteilt:

Zellstatus	Annexin positiv	7-AAD positiv
nicht apoptotisch	Nein	Nein
früh apoptotisch	Ja	Nein
spät apoptotisch	Ja	Ja
Nekrotisch	Nein	Ja

Tabelle 8: Beurteilung des Zellstatus der Zelle aufgrund der Positivität von Annexin und 7-AAD

Die graphische Darstellung der Apoptose-Assays erfolgte mit Graphpad Prism wobei die Konzentration der jeweiligen Inhibitoren logarithmisch gegen die Rate an viablen Zellen normalisiert gegen die Kontrolle aufgetragen wurde. Basierend auf einer nicht-linearen Regression wurde eine sigmoidale Kurve interpoliert („Sigmoidal, 4PL“), die von GraphPad Prism zur Berechnung der Konzentration des Inhibitors verwendet wurde, bei der der halbmaximal mögliche Effekt des Inhibitors in dem gewählten Inkubationszeitraum erreicht wurde (IC50-Wert).

Erfolgte eine Titration mit mehr als zwei Zelllinien, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Regressionskurven gezeigt.

3.2.7 Kompetitiver Proliferations-Assay

Um unterschiedlich behandelte oder gentechnisch veränderte Zellen der gleichen Zelllinie miteinander hinsichtlich ihrer Proliferation zu vergleichen, wurde ein kompetitiver Proliferations-Assay verwendet. Hierbei werden Zellen des Wildtyps mit gentechnisch veränderten Zellen (hier transduzierte Zellen) in einem Verhältnis von 1 : 1 gemischt. Die

transduzierten Zellen tragen einen Fluoreszenzmarker und können so mittels Analyse am Durchflusszytometer von Wildtyp-Zellen unterschieden werden.

Für den Assay wurden jeweils 5×10^5 Zellen des Wildtyps und eine gleiche Anzahl an transduzierten Zellen in einem 12-*well*-Format (Gesamtvolumen: 1 ml) gemischt und die Veränderung des Mischungsverhältnisses über einen längeren Zeitraum erfasst. Ein Mediumwechsel und Anpassung der Zelldichte erfolgte nach dem 2., 4., 7. und 9. Tag.

3.2.8 Bestimmung der Viabilität mittels XTT-Assay

Für die Messung der Viabilität von Zellen wurde das XTT-Proliferationskit von Applichem verwendet. Dieses beruht auf dem Umsatz von 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid, kurz XTT, in wasserlösliches Formazan durch das Succinatdehydrogenase-System der mitochondrialen Atmungskette.²⁴⁵ Formazan führt zu einem Farbumschlag, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einem Photometer gemessen werden kann. Die Menge an umgesetztem XTT in einem bestimmten Zeitraum dient daher als Maß für die Viabilität der Zellen.

Für die Bestimmung der Viabilität von DG75- und Daudi-Zellen nach Behandlung mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 wurden jeweils 3×10^5 Zellen in einem Doppelansatz als Triplikate in $100 \mu\text{l}$ pro *well* einer Mikrotiterplatte (96-*well*-Format) ausgesät und mit dem SYK-Inhibitor für drei Tage titriert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, als Blindwert reines Medium ohne Zellen.

Nach Zugabe des Reagenzes (XTT) nach Herstellerangaben und einer 4-stündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung der Viabilität an einem Photometer (*Tecan Infinite 200 Pro plate reader*) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 650$ nm. Die Messungen wurde an Tag 0 mit dem einen und an Tag 3 mit dem anderen Teil des Doppelansatzes auf der Platte durchgeführt.

3.2.9 Zellzyklusanalyse mit dem BrdU-Assay

Das Prinzip des BrdU-Assays basiert auf der Detektion des Nukleotidanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU), das abhängig von der jeweiligen Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet, in die DNA eingebaut wird. Bei dem BrdU-Assay wird der Zellzyklus zu einem distinkten Zeitpunkt untersucht und so der Prozentsatz an Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G0/G1, S, G2/M) bestimmt. So zeigen Zellen, die sich zum Beispiel gerade in der S-Phase befinden eine erhöhte Inkorporation von BrdU im Vergleich zu Zellen, die sich in der G0/G1 oder G2/M-Phase befinden. Durch einen Anti-BrdU-Antikörper kann die Menge an inkorporiertem BrdU bestimmt werden. Zum Abgleich wird der DNA-Gehalt durch Färbung derselben mit dem Interkalator 7-AAD bestimmt.

Für den Assay wurde das *APC BrdU Flow Kit* (BD Bioscience) nach Protokoll des Herstellers verwendet. In einer Zellkulturplatte (6-well-Format) wurden hierfür DG75- bzw. Daudi-Zellen in der Konzentration von $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ bzw. $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ ausgesät und 24 h inkubiert, ehe sie für weitere 24 h mit AT13387 (500 nM) oder STA-9090 (100 nM) behandelt wurden. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem äquivalenten Volumen an DMSO inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit BrdU (Endkonzentration $10 \mu\text{M}$) für 30 min bei 37°C ehe diese nach einem Waschschrift mit DPBS in *Cytofix/Cytoperm Buffer* für 15 - 30 min bei Raumtemperatur oder auf Eis inkubiert wurden. Nach weiteren Inkubationszeiten von 10 min in *Cytoperm Permeabilization Buffer Plus* und zur anschließenden Fixierung der Zellen für 5 min in *Cytofix/Cytoperm Buffer*, wurden die Zellen für eine Stunde mit $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I (Sigma-Aldrich) bei 37°C behandelt. Nach dem Verdau der DNA wurde in die DNA eingebautes BrdU mithilfe eines APC-konjugierten Antikörpers detektiert. Hierfür wurde $0,125 \mu\text{g}$ Antikörper verwendet, der für 20 min bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert wurde. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 5 min mit dem DNA-Interkalator 7-AAD gefärbt.

3.2.10 Bestimmung des Calciumfluxes nach Aktivierung des BZR-Signalweges

Um physiologische Effekte auf den BZR-Signalweg nach Inhibition von SYK (durch PRT062607) und Inhibition von HSP90 (durch AT13387 und STA-9090) zu vergleichen, wurde der Calciumflux in der Zelle nach BZR-Stimulation bestimmt. Dies wurde in Kooperation mit Dr. Michael Engelke (AG Wienands, UMG Göttingen) durchgeführt und ist in Walter und Kollegen²⁴³ publiziert.

3.2.11 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde entweder mithilfe der Neubauer-Zählkammer oder mit einem automatischen Zellzählgerät durchgeführt. Hierfür wurden $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension zur gleichzeitigen Viabilitätsbestimmung mit $10 \mu\text{l}$ einer 0,4 % Trypanblau-Lösung gemischt und $10 \mu\text{l}$ dieser Mischung auf eine Neubauer Zählkammer bzw. auf ein Slide des Zellzählgerätes pipettiert. Bei Verwendung der Neubauer-Zählkammer wurde bei optisch gleichmäßiger Verteilung der Zellen in der Zählkammer 1 Großquadrat à 4×4 Kleinquadrate ausgezählt und die Zahl an viablen (Trypanblau-negativen) Zellen bestimmt.

Zellen, die eine Viabilität von unter 80 % aufwiesen, wurden nicht für Versuche verwendet.

3.2.12 Proteinisolierung aus Zellen

Zwecks Analyse der Proteinexpression und -regulation wurden die Zellen mit einem Lysepuffer aufgeschlossen. Hierfür wurden je nach Anwendung verschiedene Lysepuffer und verschiedene Protokolle angewendet.

3.2.12.1 Proteinisolierung für den Western Blot

Für den Aufschluss von Zellen wurde ein Lysepuffer verwendet, der auf Basis des Detergenz NP-40 beruht.

Hierfür wurden die zu lysierenden Zellen in einem geeigneten Volumen an vorgekühlter DPBS-Lösung gewaschen und anschließend in einer geeigneten Menge an NP-40-Lysepuffer ($5 \mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen) aufgenommen, resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation des Lysates (5 min, $> 20000 \times g$) wurde der Überstand ($\hat{=}$ Proteinlysate) abgenommen und das Pellet verworfen. Für eine spätere Proteinbestimmung wurden $1,5 \mu\text{l}$ des Proteinlysates in ein separates Reaktionsgefäß mit einem Volumen von 1,5 ml überführt und gemeinsam mit dem Rest des Lysates bei -20°C gelagert.

3.2.12.2 Proteinisolierung für massenspektrometrische Analysen

Für die Analysen wurden SILAC-markierte Zellen der einzelnen Konditionen nach jeweiliger Behandlung mit den SYK- und HSP90-Inhibitoren oder nach BZR-Stimulation mit vorgekühltem DPBS gewaschen und in Urea-Lysepuffer aufgenommen. Alle Lysate wurden bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung gelagert. Lysate der einzelnen Konditionen wurden vor der Prozessierung im äquivalenten Verhältnis (bezogen auf die Proteinmenge) gemischt.

3.2.13 Massenspektrometrische Analysen

3.2.13.1 Proteomanalyse von Tyrosin-phosphorylierten Peptiden (pYome)

Tyrosinphosphorylierungen sind im Vergleich zu den anderen Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten in den Zellen unterrepräsentiert.²⁴⁶ Aus diesem Grund wurden Tyrosinphosphorylierte Proteine zunächst aus den Urea-Lysaten mittels Immunpräzipitation mit dem pY100-Antikörper (Cell Signaling) basierend auf einem Protokoll von Rush und Kollegen²⁴⁷ angereichert.

Hierfür wurden die SILAC-markierten Zellen der zu vergleichenden Konditionen nach jeweiliger Lyse in Urea-Lysepuffer (9 M Urea, 20 mM HEPES pH 8, 1 mM Natriumorthovanadat, 2,5 mM Natriumpyrophosphat und 1 mM β -Glycerophosphat) mit Ultraschall behandelt um die Effizienz der Lyse zu erhöhen. Nach Zentrifugation der Lysate wurde die Proteinkonzentration der abgenommenen Überstände bestimmt und die einzelnen Lysate der jeweiligen Konditionen äquivalent (bezogen auf ihre Proteinmenge) gemischt. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um Lysate von Zellen, die entweder mit „normal-schweren“, „mittel-schweren“ oder „schweren“ Aminosäuren markiert wurden.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Reduktion der Proteine im Lysat durch Inkubation mit 4,5 mM Dithiothreitol (DTT), gefolgt von einer Alkylierung mit 0,19 % (m/v) Indol-3-essigsäure (IAA) für jeweils 1 h bei 37°C im Dunkeln unter stetiger Durchmischung.

Nach Verdünnung des Lysates auf 2 M Urea mit 20 mM HEPES erfolgte der Verdau der Proteine über Nacht bei 37 °C durch 1 % (m/m) Trypsin. Trypsin ist eine Serinprotease und spaltet Proteine nach den basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifiziertem Cystein. So entstehen durch den Proteinverdau mit Trypsin definierte Peptide, die durch einen "C18-stagetip" (SEP-Pak) entsalzt und aufgereinigt wurden.²⁴⁸

Die Anreicherung von Phosphotyrosinpeptiden erfolgte durch eine anschließende Immunpräzipitation mit *PTMScan® Phospho-Tyrosine Motif (Y*) (P-Tyr-1000) Immunoaffinity Beads* (Cell Signaling) und anschließender Aufnahme der angereicherten Phosphopeptide in Trifluoressigsäure (TFA). Über eine *SpeedVac* wurden diese dann getrocknet und konzentriert.

3.2.13.2 Proteomanalysen

Für die Analysen des Proteoms wurde Daten verwendet, die von Peptidsequenzierungen der Analyse des Phosphoproteoms extrahiert wurden.

3.2.13.3 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Nach Vorbereitung der Phosphopeptide für die Massenspektrometrie erfolgt die Analyse derselben an einem Q Exactive HF Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific), bei dem zwei massenspektrometrische Einheiten (MS/MS) nacheinandergeschaltet und diese an dem Flüssigchromatographen (LC) *Ultimate 3000 RSLC nano System* (Dionex) gekoppelt sind.

Die Phosphopeptide werden zunächst mit Ladepuffer auf Wasserbasis (2 % Acetonitril, 0,02 % Trifluoressigsäure) versetzt und durch eine Säule mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 µl/min laufen gelassen, ehe sie mittels selbstgegossenen analytischen Säulen (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 µm, Dr. Maisch GmbH, 75 µm x 30 cm) separiert wurden. Dabei wurde zunächst ein linear aufsteigender Gradient (1 - 35 %) an Puffer B (80 % Acetonitril, 0,1 % Formaldehyd) von 90 min verwendet, dem ein 10-minütiger Gradient an Puffer B (1 - 60 %) mit einer konstanten Durchflussrate von 300 nl/min folgte.

Für weitere Infos zu den jeweiligen Einstellung des Q Exactive HF Massenspektrometers siehe Walter und Kollegen²⁴³.

3.2.13.4 Datenauswertung

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden mit MaxQuant²³⁹ prozessiert und die MS/MS-Spektren mittels der Adromeda-Peptid-Suchmaschine²⁴⁹ basierend auf einer humanen Datenbank (Quelle: Uniprot) analysiert.

Die Datenanalyse wurde mit dem Programm Perseus durchgeführt, mit dem standardmäßig alle Einträge von möglichen Kontaminanten und von Einträgen mit einer Identifizierungswahrscheinlichkeit von unter 75 % herausgefiltert wurden.

Für die Bestimmung der signifikant regulierten Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurde in Perseus ein t-Test durchgeführt und dieser mit einem Ausreißertest („Outlier A“-Analyse) kombiniert. So wurden zunächst Phosphorylierungsstellen mittels einseitigem t-Test identifiziert, die nach jeweiliger Behandlung im Experiment gegenüber der Kontrolle signifikant reguliert waren ($p < 0,05$). Da im diesem Fall aber nach Proteinen gesucht werden sollte, die nicht nur signifikant gegenüber der Kontrolle reguliert waren, sondern die auch unter allen signifikant regulierten Proteinen eine starke Regulation erfuhren, wurden mittels der „Outlier A“-Analyse Grenzen festgelegt, wonach eine Einteilung der Phosphoproteine in signifikant schwach und signifikant stark reguliert erfolgte. Für die „Outlier A“-Analyse wurde ebenfalls ein p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Wenn nicht anders angegeben wurden die Phosphoproteine in den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil als signifikant reguliert gekennzeichnet, wenn diese in beiden Tests als signifikant eingestuft wurden.

3.2.14 Arbeiten mit DNA

3.2.14.1 Isolierung von DNA

3.2.14.1.1 Isolierung von DNA aus *Escherichia coli* im kleinen Maßstab

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (*E.coli*) wurde das Kit „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific) verwendet und die Isolierung wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

Die Isolierung erfolgte aus *E.coli*, die über Nacht in 3 ml einer mit Antibiotikum versetzter LB-Lösung bei 37 °C unter stetiger Durchmischung inkubierten. Nach Zentrifugation der Bakterien wurden diese in 300 µl kaltem Resuspensionspuffer resuspendiert, der mit RNase versetzt war. Der alkalische Lyseschritt erfolgte durch Zugabe von 300 µl Lysepuffer, der NaOH enthält und aufgrund seines alkalischen pH-Wertes zur Denaturierung der DNA führt. Ein Ausfällen der Proteine erfolgte durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer, der SDS und Kaliumacetat enthält. In diesem Schritt kann sich die vorher denaturierte Plasmid-DNA rehybridisieren, nicht aber die bakterielle DNA, und im Puffer lösen. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde die DNA-Lösung auf eine DNA-bindende Membran in einer Säule gegeben und diese mit 500 µL Waschpuffer gewaschen. Die Eluierung der DNA erfolgte mit 30 µl H₂O.

3.2.14.1.2 Isolierung von DNA aus *E.coli* im großen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Kit „NucleoBondXtra Midi Plus EF“ (Macherey-Nagel) und wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt. Das Prinzip der Isolierung wurde bereits unter 3.2.14.1.1 detailliert beschrieben und wird im Folgenden nicht mehr näher erwähnt.

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus einer Übernachtskultur. Hierfür wurde am Vortag 3 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium mit *E.coli* angeimpft (Starterkultur) und für ca.

6 h unter stetiger Durchmischung inkubiert. Danach wurde die Starterkultur in 200 ml Selektivmedium überführt und über Nacht unter stetiger Durchmischung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 4 °C abzentrifugiert und in 8 ml Resuspensionspuffer („RES-EF“), der mit RNase A versetzt wurde, aufgenommen. Nach Zugabe von 8 ml Lysepuffer („LYS-EF“) zu der Suspension und leichter Durchmischung derselben erfolgte ein Inkubationsschritt von 5 min bei Raumtemperatur, ehe die Suspension mit 8 ml Neutralisationspuffer („NEU-EF“) versetzt wurde. Eine Durchmischung der Suspension erfolgte so lange, bis der in dem Lysepuffer enthaltene blaue pH-Indikator einen Farbumschlag zu farblos erfuhr. Nach Beladung des zuvor mit 15 ml Äquilibrierpuffer („EQU-EF“) versetzten Säulenfilters mit der nun neutralisierten Suspension, wurde 5 ml Waschpuffer („FIL-EF“) auf den oberen Rand des Filters gegeben und dieser nach Durchlauf des Puffers verworfen. Nach zwei weiteren Waschsritten (35 ml Puffer „ENDO-EF“ und Puffer 15 ml „WASH-EF“) erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 5 ml Elutionspuffer („ELU-EF“) und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol. Mit Hilfe des *Nucleobond® Finalizers*, einem auf einer Spritze aufgesteckten Filter, wurde die Plasmid-DNA schließlich gebunden, mit 2 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 400 µl H₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte am Nanodrop.

3.2.14.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Konzentration isolierter DNA wurde der Nanodrop verwendet. Hierfür wurden 1,5 µl der DNA-Lösung auf den Analysearm des Nanodrops pipettiert und die Konzentration bestimmt.

3.2.15 Klonierung von shRNA in Expressionsvektoren

3.2.15.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient zur Amplifikation bzw. Vervielfältigung einer spezifischen Sequenz eines DNA-Stranges *in vitro*. Durch die Wahl kurzer DNA-Stücke, die als sog. Primer für die Polymerase fungieren, ist es möglich, mehrere Kopien einer Sequenz zu generieren, die von der Primersequenz flankiert wird.

Für die Klonierung der gewünschten shRNAs in die Expressionsplasmide wurden Oligonukleotide („Oligos“) von Sigma Aldrich synthetisiert, die als *template* für die PCR verwendet wurden (siehe Abbildung 8, nächste Seite).

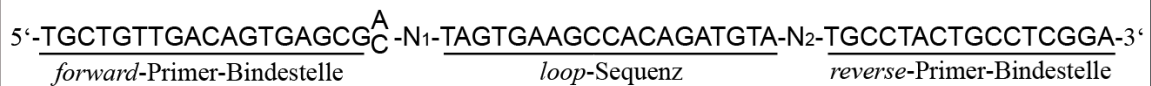


Abbildung 8: Sequenz des synthetischen Oligos zur Klonierung von shRNA in Expressionsplasmide

Sequenz des synthetischen Oligos in 5'-3'-Richtung mit den Nukleotiden Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T) und der variablen shRNA-Ziel-Sequenz (N1) und Guide-Sequenz (N2). Die *forward*- und *reverse*-Primer-Bindestelle der jeweiligen Primer aus Abbildung 9 ist gekennzeichnet.

Die für die PCR verwendeten Primer sind der Abbildung 9 zu entnehmen.

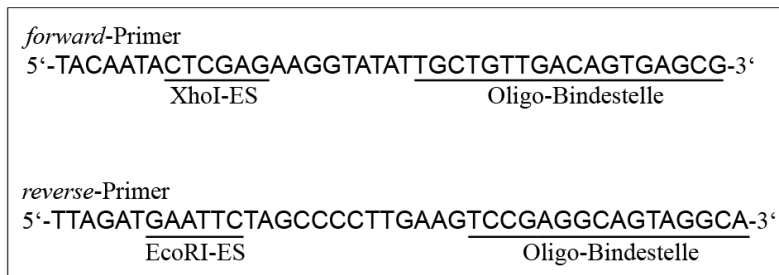


Abbildung 9: Primer zur Amplifikation von shRNA-Konstrukten aus Oligos

Sequenz des *forward*- und *reverse*-Primers in 5'-3'-Richtung mit den Nukleotiden Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Die Erkennungssequenz (ES) der jeweiligen Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI und der Bindestelle an das Oligonukleotid aus Abbildung 8 sind markiert.

3.2.13.2 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich DNA-Fragmente, wie sie zum Beispiel nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR entstehen, nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufzutrennen und zu identifizieren. Zur Auftrennung wurden TAE-Agarosegele verwendet, die als molekulares Sieb fungieren. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern ihrer Länge entsprechend unterschiedlich schnell durch das elektrische Feld. Je kürzer das Fragment, desto schneller wandert es durch das Gel.

Für die Gelelektrophorese wurden Gelkonzentrationen von 1 % (m/v) Agarose verwendet, wobei dem Gel zur späteren Visualisierung der Fragmente die DNA-interkalierende Substanz HD Green (4 µl HD Green pro 100 ml Agarosegel) beigemischt wurden, die unter UV-Licht nach Interkalation visuell detektierbar sind. Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde stets ein Größenmarker aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TAE, die angelegte Spannung wurde auf 100 Volt eingestellt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einer entsprechenden Menge an DNA-Ladepuffer versetzt.

Die Gele wurden nach erfolgreicher Auftrennung der DNA-Fragmente am Geldokumentationsgerät analysiert, das gewünschte PCR-Amplifikat aus dem Agarosegel geschnitten und die amplifizierte DNA aus dem Gel unter Verwendung eines Gelextraktionskits (*GeneJET Gel Extraction Kit*, Thermo Fisher) eluiert.

3.2.13.3 Eluieren von DNA aus Agarosegelen

Das Eluieren von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach erfolgreicher Agarosegelelektrophorese mit Hilfe des Kits *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers. Hierfür wurden zunächst Agarosegelblöcke mit der darin enthaltenen DNA mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert und mit Bindepuffer versetzt (100 µl/100 mg des Agarosegelblocks). Nach einer 10-minütigen Inkubation der Lösung bei 50 - 60 °C löst der chaotrope Puffer die Agarose und denaturiert Proteine. Nach mehreren Waschschritten auf einer Kieselgelsäule, die die gelöste DNA bindet, wurde die DNA in 20 µl H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.13.4 Inkubation mit Restriktionsendonukleasen

Bei Klonierungen spielt der Restriktionsverdau eine entscheidende Rolle. Mit dieser Methode kann man Plasmide oder DNA-Fragmente durch eine gezielte Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen schneiden. Dies erfolgt durch sog. Restriktionsendonukleasen (RENs), die spezifische Basenpaarabfolgen in der DNA (sog. Erkennungssequenzen) erkennen, daran binden und die DNA hydrolysieren. Für die Klonierung der shRNA-Sequenzen wurden RENs des Typs II verwendet (hier XhoI und EcoRI), die innerhalb ihrer palindromischen Erkennungssequenz schneiden und weder ATP noch eine Methyltransferaseaktivität benötigen.

Um eine spätere Ligation zu ermöglichen, wurden das Zielplasmid und das amplifizierte shRNA-Konstrukt mit den gleichen RENs geschnitten. Die Reaktionszeit betrug dabei 30 min bei 37 °C nach folgendem Ansatz:

Ansatz für den Restriktionsverdau

2 µg Plasmid bzw. 16 µL Amplifikat (aufgereinigt in 3.2.13.3)

2 µl FastDigest Puffer

1 µl EcoRI

1 µl XhoI

ad 20 µl H₂O

Nach Inkubation wurde nur der Plasmidansatz, nicht aber der Ansatz mit dem shRNA-Amplifikat mit antarktischer Phosphatase inkubiert (siehe 3.2.13.5) und beide Ansätze anschließend aufgereinigt (siehe 3.2.13.6).

3.2.13.5 Inkubation mit alkalischer Phosphatase

Phosphatasen sind Enzyme, die Phosphorsäureester hydrolysieren. Im Rahmen von Klonierungen können sie genutzt werden um eine Religation von mit RENs geschnittener DNA zu verhindern, da die T4 DNA-Ligase, die im Anschluss für die Ligation der DNA-Fragmente eingesetzt wird, einen Phosphatrest und eine freie Hydroxylgruppe zur Verknüpfung der DNA benötigt.

Um im Rahmen dieser Arbeit die Klonierung von shRNA in den Zielvektor zu realisieren, musste dieser zunächst geschnitten und so das ursprüngliche Insert entfernt werden. Hierbei musste sichergestellt werden, dass es zu keiner Religation des ursprünglichen Inserts mit dem Zielplasmid kommt. Aus diesem Grund wurde der Restriktionsansatz mit dem Plasmid mit alkalischer Phosphatase für 10 min bei 37 °C nach folgendem Ansatz inkubiert:

1x Ansatz

20 µl Ansatz des Restriktionsverdau
1 µl alkalische Phosphatase (\cong 1 Unit)

3.2.13.6 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit dem *QIAquick PCR-Purification Kit* (Quiagen) nach Herstellerangaben.

Hierfür wurden dem zu aufreinigenden Ansatz Puffer „PB“ im Verhältnis 5 : 1 (v/v) zugesetzt und gemischt. Nach Laden der Säule (*QIAquick spin column*) mit der nun gefällten DNA in der Mischung erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, > 20000 x g), bei dem die DNA an den Filter in der Säule bindet. Nach einem Waschschrift mit 750 µl Puffer „PE“ erfolgte die Elution der DNA mit 30 µl H₂O.

3.2.13.7 Ligation

Bei Ligationen, die vor allem im Rahmen von Klonierungen eine wichtige Rolle spielen, werden DNA-Fragmente miteinander durch die Verknüpfung von Phosphodiester-Bindungen mittels einer Ligase verbunden. Dies kann nur dann erfolgen, wenn die vorher geschnittenen DNA-Fragmente miteinander kompatibel sind.

Die Ligationen wurden über Nacht bei 15 °C mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1x Ligationsansatz

2 µl Plasmid (geschnitten und dephosphoryliert)
8 µl Insert (geschnitten)
2 µl 10x Ligationspuffer
1 µl T4-DNA Ligase
7 µl H₂O

Am nächsten Tag erfolgte eine Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli*.

3.2.13.8 Erhöhung der Membranpermeabilität von *E.coli*

Bakterien können unter bestimmten Bedingungen fremde DNA aufnehmen. Durch Erhöhung der Membranpermeabilität ist es möglich, die Aufnahmefähigkeit (Kompetenz) nochmals zu verbessern. Dies wurde durch die klassische Calciummethode erreicht, bei der Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ maximal bei 0,4) befinden für 30 min in 0,1 M

Calciumchloridlösung inkubiert wurden. Zur längerfristigen Lagerung der nun kompetenten Bakterien wurden diese in 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert, mit Glycerin (Endkonzentration 20 %) versetzt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.13.9 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli* wurde mittels einer Kälte-Wärme-Behandlung, einem sog. Hitzeschock durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit dem zu transformierenden Plasmiden gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer kurzzeitigen Wärmebehandlung von 42 °C für 60 Sekunden erfolgte eine Abkühlungsphase für 5 min auf Eis. Ist auf dem zu transformierenden Plasmid ein Resistenzgen als Marker vorhanden, wurden die Bakterien zunächst für mindestens eine halbe Stunde in sog. S.O.C.-Medium, das die Transformationsrate erhöht, unter ständigem Schütteln kultiviert um die jeweilige Resistenz zu entwickeln. Erst dann wurden sie in das jeweilige Selektionsmedium überführt und kultiviert.

Für die Transformation wurden 20 µl des Ligationsansatzes mit einem Aliquot kompetenter *E.coli* gemischt. Die Aufnahme der Bakterien erfolgte in 500 µl S.O.C.-Medium.

3.2.13.10 Selektion von *E.coli*

Zur Selektion wurden die transformierten Bakterien auf einem selektiven Nährboden (LB-Agar) in Petrischalen ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des Selektivmediums wachsen nur Bakterien, die transformiert sind. Als Selektivmedium wurde LB-Agar, versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml) verwendet.

Um die erfolgreiche Ligation bzw. die einklonierte Sequenz des Plasmids zu überprüfen, wurden Einzelklone von der Agarplatte gepickt und diese über Nacht in 3 ml Selektivmedium und auf einer neuen Agarplatte kultiviert.

Nach erfolgreicher Plasmidisolierung erfolgte die Sequenzierung des Plasmids.

3.2.13.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde extern von der Firma SeqLab durchgeführt. Es wurden folgende Sequenzierungsansätze pipettiert und verschickt:

1x Sequenzierungsansatz

1,275 µg Plasmid-DNA

3 µl Sequenzierprimer (10 µM)

ad 15 µl H₂O

Das Sequenzierungsergebnis wurde mit der gewünschten Sequenz verglichen. Klone, die ein Plasmid mit falscher Sequenz trugen wurden verworfen. Von Klonen mit Plasmiden der richtigen Sequenz wurde ein Glycerolstock mit 26 % (v/v) Glycerol angelegt. Aus diesem kann

Nährmedium angeimpft werden, um Plasmide nach erfolgreicher Klonierung im großen Maßstab per Midipräparation zu isolieren.

3.2.14 Transfektion von HEK293T mit Plasmiden

Zur erfolgreichen Transfektion von HEK293T wurde die Calcium-Phosphat-Präzipitation angewandt. Bei dieser Methode, die 1973 durch Frank L. Graham und Alex J. van der Eb²⁵⁰ entwickelt wurde, bindet die zu übertragende DNA (hier: Plasmide) an ausfallendes Calciumphosphat. Das Präzipitat aus DNA und dem Salz wird dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK293T zum Ziel der Virusproduktion mit insgesamt 40 µg Plasmid transfiziert. Pro Transfektion wurde folgender Ansatz pipettiert:

1x Transfektionsansatz für insgesamt 4 Kulturschalen (10 cm Durchmesser)

20 µg Transferplasmid (hier: LT3-GECIR)

5 µg pMD2.G

15 µg pCMV delta R8.2 oder psPAX2

200 µl CaCl₂

ad 2 ml H₂O

Nach kurzem Mischen der Probe wurde diese mit 2 ml 2x HBS versetzt. Hierbei wurde die DNA-Lösung tröpfchenweise auf die Pufferlösung unter stetigem Mischen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 20 min bei Raumtemperatur wurde die nun fertige Transfektionslösung auf insgesamt vier Kulturschalen (10 cm Durchmesser) mit am Vortag ausgesäten HEK293T (5×10^6 Zellen pro Kulturschale) gegeben. Ein kompletter Mediumwechsel erfolgte nach 6 h Inkubation bei 37 °C. Nach 48 h wurden der Überstand inklusive des sezernierten Virus abgenommen und per Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

3.2.15 Überexpression von TEL-SYK in DG75- und Daudi-Zellen

Die Überexpression von TEL-SYK in DG75- und Daudi-Zellen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Tony Green („Department of Hematology“, Universität Cambridge, GB) und ist in Walter und Kollegen²⁴³ publiziert.

3.2.16 Proteinchemische Methoden

3.2.16.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit der Bicinchoninsäure- (BCA-) Methode.²⁵¹ Der Assay beruht darauf, dass unter bestimmten Bedingungen einzelne Aminosäuren der Proteine (Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan) und Peptidbindungen die in dem Reagenz des Assays gelösten Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduzieren. Nur das reduzierte Kupfer bildet dann mit BCA einen violetten Farbkomplex aus, dessen Konzentration

photometrisch bestimmt werden kann. Die Bildung dieses Farbkomplexes steigt linear mit der vorhandenen Proteinmenge an. Um die Menge an Proteinen in der Probe quantifizieren zu können, wird eine Standardkurve mit Albumin (BSA) bekannter Konzentrationen verwendet aus der sich die Konzentrationen der unbekanntes Proben berechnen lassen. Laut Herstellerangaben besteht zwischen der Bildung des Farbkomplexes und der Konzentration an BSA eine direkte Proportionalität in Konzentrationsbereichen von 20 - 2000 µg/ml. Nach Ausbildung des Farbkomplexes (dies ist nach Inkubation bei 37 °C für 20 min der Fall) können die Proben photometrisch gemessen werden.

Für die Proteinbestimmung wurden 1,5 µl des unverdünnten Proteinlysates oder die jeweiligen BSA-Standards mit 1 ml an vorher frisch angesetztem BCA-Reagenz (Reagenz A : Reagenz B = 49 : 1) gemischt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen in Küvetten überführt und die Absorption am Nanodrop bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm bestimmt.

3.2.16.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine werden dazu mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.²⁵² Dies hat eine Denaturierung der Proteine zur Folge, wobei SDS durch seine aliphatische Seitenkette nicht-kovalente Bindungen unterbricht, die die Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins stabilisieren. Des Weiteren verleiht SDS als anionisches Tensid dem denaturierten Protein durch Überdeckung seiner Eigenladung eine negative Gesamtladung. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol zum SDS-Probenpuffer sorgt außerdem für die Spaltung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken.

Zur Auftrennung der Proteine wurden Trenngele mit einem Acrylamidgehalt von 8 - 15 % (v/v) und ein Sammelgel mit 5 % Acrylamid (v/v) mit 10 oder 15 Taschen benutzt.

3.2.16.3 Western Blot

Unter Western Blot (auch Immunoblot) versteht man den Transfer von Proteinen auf eine Membran, mit anschließendem immunologischen Nachweis.²⁵³

In dieser Arbeit wurden die Proteine mittels Elektrophorese (2 h bei 70 V) im Nass-Blot-Verfahren aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 h bei RT in 5 % (m/v) Milchlösung inkubiert. Bei Membranen, die im späteren Verlauf mit einem Phosphoantikörper inkubierten, wurde anstelle der Milchlösung eine 5 % (m/v) BSA-Lösung als Blockierlösung verwendet, da Phosphoantikörper in der Milch vorkommende Phosphoproteine (z. B. Casein), unspezifisch binden können.

3.2.16.4 Inkubation von Proteinen mit Antikörpern

Zur Identifikation von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran wurden die Membranen in einer 5 % (m/v) BSA in TBS-T Lösung mit primärem Antikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder bei 4 °C über Nacht oder für 1 h bei Raumtemperatur. Die Konzentration des Antikörpers wurde nach Angaben des Herstellers gewählt.

3.2.16.5 Immunopräzipitation

Eine Methode, über die eine Interaktion in Form einer Komplexbildung zwischen Proteinen nachgewiesen werden kann, ist die Immunopräzipitation (IP). Mittels Antikörpern, die an „Agarose-Kügelchen“ (*beads*) gekoppelt sind, wird das jeweils zu untersuchende Protein mitsamt seiner Interaktionspartner (Co-Präzipitate) aus dem Gemisch präzipitiert und somit konzentriert. Durch einen anschließenden Western Blot mit den Präzipitaten können erstens der Erfolg der IP überprüft und zweitens Interaktionspartner identifiziert bzw. bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden IPs durchgeführt um die Interaktion zwischen HSP90 (WT und mutiertem HSP90) und SYK zu identifizieren. Hierfür wurden jeweils 2×10^7 Zellen in 400 μ l NP-40-Lysepuffer lysiert und mit den Antikörpern gegen HSP90, SYK oder den Hämagglutinin- (HA-) *tag* über Nacht unter stetiger Durchmischung bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 μ l einer 50 %igen (v/v) Suspension an *beads* (Protein A/G PLUS-Agarose von Santa Cruz) erfolgte eine erneute Inkubation bei 4 °C unter stetiger Durchmischung, bei der die Antikörper an die *beads* binden, die wiederum zuvor an das jeweilige Zielprotein gebunden haben. Über mehrere Waschschrte können die mit dem Präzipitat beladenen *beads* mittels Zentrifugation von ungebundenen Proteinen des Lysates separiert werden. Zur Vorbereitung der Probenauftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurde das Präzipitat mit 40 μ l 4x Lämmli versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht um die Zielproteine und deren Interaktionspartner zu denaturieren.

3.2.17 Lentivirus

3.2.17.1 Produktion des Virus in HEK293T

Für die Produktion von Lentiviren wurde eine Variante der humanen Zelllinie HEK293 verwendet, die eine Expression des „SV40 *large T-antigen*“-Gens aufweist und als HEK293T bezeichnet wird. Durch diese zusätzliche Expression können episomale Plasmide mit dem „SV40 *origin of replication*“ in dieser Zelllinie repliziert werden. Nach Transfektion von HEK293T mit lentiviralen Plasmiden werden diese in der Zelle repliziert und vermehrt. Dies führt zu einer anhaltenden Überexpression der eingebrachten Vektorgene.

Für die Produktion von infektiösen Lentiviren wird die 2. Generation des lentiviralen Systems verwendet, bei dem alle lentiviralen Proteine, die benötigt werden um in den Zellen virale Partikel zu generieren, auf einem Helferplasmid (hier als Helferplasmid 1 bezeichnet) codiert

sind. Insgesamt werden drei unterschiedliche Plasmide benötigt, die parallel in HEK293T transfiziert werden (siehe Tabelle 9). Dabei blieben die Helferplasmide unverändert. Das Transferplasmid LT3-GECIR (inklusive der jeweiligen klonierten shRNA) wurde je nach Anwendung variiert.

Art des Plasmids	Name des Plasmids	exprimierte Gene	Funktion
Helferplasmid 1	pCMV delta R8.2 oder psPAX2	GAG/POL, Tat und Rev	Expression von lentiviralen Proteinen
Helferplasmid 2	pMD2.G	VSV-G	Expression des Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV)
Transferplasmid	LT3-GECIR	shRNAs	Expression von shRNA zum Knockdown von Proteinen

Tabelle 9: Plasmide für die Produktion von Lentiviren in HEK293T

Helferplasmid 1 trägt die Gene GAG/POL, Tat und Rev und wird zum Zusammenbau des Lentivirus benötigt, aus denen die einzelnen Komponenten des Virus hervorgehen. In einem mehrstufigen Prozess entstehen aus dem *Gag/Pol*-Vorläuferprotein die einzelnen Komponenten des Virus (Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsid, Reverse Transkriptase und Integrase). Tat ist ein regulatorisches Protein, das die Effizienz der viralen Transkription erhöht. Rev hingegen ist ein transaktivierendes Protein, das im Kern am mRNA-Export beteiligt ist und somit überhaupt für die notwendige Translation von mRNA verantwortlich ist.^{254–257}

Helferplasmid 2 trägt das Gen für das Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), kurz VSV-G genannt, das für die Pseudotypisierung der Virushülle Verwendung findet. Es codiert für einen homotrimeren Rezeptor in der Virushülle und stellt somit den Peplomer des Virus dar. VSV-G weist einen hohen Tropismus auf und erleichtert die Transduktion von Zielzellen unterschiedlicher Art.²⁵⁸

Die Transferplasmide tragen das jeweils zu exprimierende Gen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden shRNAs und Reportergene bzw. Selektionsmarker (Puromycin, GFP und mCherry) exprimiert.

3.2.17.2 Konzentration des Virus mittels Ultrazentrifuge

Zur Erhöhung des Titers und letztlich Verbesserung der Effizienz der Transduktion wurden die Lentiviren mittels Ultrazentrifugation konzentriert.

Hierfür wurde der Überstand der mit viralen Plasmiden transduzierten HEK293T 48 h nach Transfektion abgenommen und bei 4 °C zentrifugiert (300x g, 5 min). Nach anschließender Filtration des Überstandes (Porengröße des verwendeten Filters: 0,45 µm) erfolgte eine zweistündige Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 4 °C (50000x g). Der Überstand wurde

verworfen und das Zentrifugat (\cong Lentiviren) in insgesamt 200 μ l RPMI aufgenommen. Die Lagerung des Virus erfolgte in zehn 20 μ l Aliquots bei -80 °C.

3.2.17.3 Transduktion von Zellen

Die Infektion von Zielzellen, bei der Fremdgene mittels viralen Vektoren übertragen werden, wird als Transduktion bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DG75-, Daudi- und RCH-ACV-Zellen mittels Lentiviren transduziert. Hierfür wurden 20 μ l an aufkonzentriertem Virus auf 1×10^6 Zellen gegeben und diese für 72 h inkubiert. Je nach transduziertem Plasmid erfolgte eine Selektion transduzierter Zellen mittels Antibiotikum oder deren Anreicherung mittels Durchflusszytometrie.

3.2.18 Immunhistochemische Färbung von Primärmaterial

Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Dr. Hanibal Bohnenberger (UKM Göttingen) an Schnitten von Lymphknoten durchgeführt. Diese wurden aus insgesamt 32 Patienten isoliert und nach anschließender Fixierung mit 4 % Formalin in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 2 μ m dicke Schnitte angefertigt, die für die Färbung verwendet wurden.

Die Schnitte wurden in einer Antikörperlösung (*EnvisionFlex Target Retrieval Solution*, Dako, Hamburg) mit primärem Antikörper für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Antikörper gegen HSP90 α (GeneTex) wurde hierbei eine Verdünnung von 1 : 5000 und für den Antikörper gegen HSP90 β (Abcam) eine Verdünnung von 1 : 500 verwendet.

Zwecks Visualisierung wurde den Schnitten, in denen HSP90 α gefärbt wurde ein sekundärer Antikörper zugegeben, der Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelt hat. Ein sekundärer Antikörper war bei den Schnitten, die gegen HSP90 β gefärbt wurden nicht notwendig, da der Primärantikörper bereits HRPO-gekoppelt war. Durch die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB, Dako) wurden die Stellen blau gefärbt, an denen der Antikörper gebunden hatte.

Die Schnitte wurden mittels Lichtmikroskopie nach vorheriger Gegenfärbung mit Meyer's Hämatoxylin von zwei unabhängigen Personen analysiert und je nach Stärke der Färbung in unterschiedliche Klassen eingestuft. Hierbei wurde ein 3-Stufen-Klassifizierungsmodell (siehe Tabelle 10) angewendet.

Score	Beurteilung der Expressionsstärke des untersuchten Proteins
0	nicht nachweisbar
1	Schwach
2	Stark

Tabelle 10: 3-Stufen-Klassifizierungsmodell zur Einstufung der Proteinexpressionsstärke in Gewebeschnitten

3.2.19 Densitometrische Quantifizierung von Immunoblots mit ImageJ

Für die Quantifizierung von Immunoblots wurde die Software ImageJ verwendet. Hierfür wurden die Bilder mit der Software geöffnet und im 16-Bit-Modus dargestellt. Nach Markierung der jeweiligen zu quantifizierenden Banden, wurde die Signalstärke durch Berechnung der Fläche unter dem Graphen (AUC, *area under curve*) in der Plot-Ansicht bestimmt. Eine Normalisierung der Werte erfolgte standardmäßig auf die jeweilige Kontrolle.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des tonischen BZR-Signalweges im Burkitt Lymphom

4.1.1 Reduktion der Oberflächenexpression des BZR

4.1.1.1 Der Knockdown der BZR-Teilkomponente CD79a führt zu einer Reduktion der Oberflächenexpression des BZR

B-Zellen weisen ein tonisches BZR-Signal auf, das über den auf der Zelloberfläche exprimierten BZR vermittelt wird und die Zellen am Leben erhält. Durch Herunterregulation der BZR-Expression kann die Auswirkung auf den tonischen Signalweg und dieser als solcher näher untersucht werden. Dies kann durch einen Knockdown des membranständigen Proteins CD79a erreicht werden. Es ist bekannt, dass die membranständigen Proteine CD79a und CD79b zur Oberflächenexpression des BZR auf der B-Zelle essentiell sind und stabilisierende Funktion übernehmen. Zudem sind diese intrazellulären Anteile des BZR für die Signaltransduktion essentiell. Ein Knockdown von CD79a führt zu einer reduzierten Oberflächenexpression des BZR und dient somit als Voraussetzung um den tonischen BZR-Signalweg zu untersuchen.

Um zunächst die Oberflächenexpression des BZR zu bestimmen, wurden Analysen mittels Durchflusszytometrie mit einem Anti-IgM-Antikörper durchgeführt, der zunächst auf seine Spezifität getestet wurde. Hierfür wurden jeweils zwei IgM-positive Burkitt-Lymphom-Zelllinien (DG75 und Daudi) und zwei IgM-negative prä-B-Zelllinien (RCH-ACV und SMS-SB) verwendet.

In Abbildung 10 sind Histogramme der IgM-Färbung der einzelnen Zelllinien zu sehen. Die IgM-positiven Burkitt-Lymphom-Zelllinien DG75 und Daudi zeigen hierbei ein deutliches IgM-Signal. Die beiden IgM-negativen Zelllinien hingegen zeigten erwartungsgemäß keine positive IgM-Färbung. Die jeweiligen Kurven waren hier nahezu deckungsgleich.

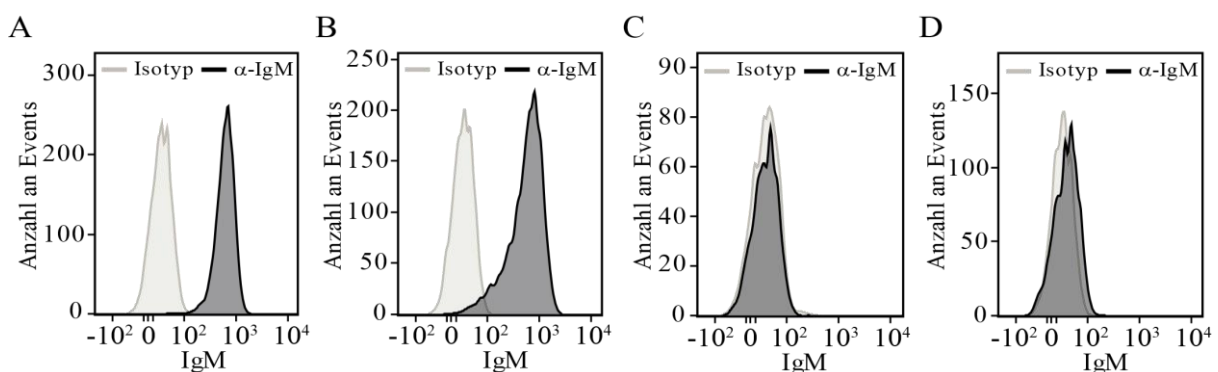


Abbildung 10: Validierung der Spezifität des APC-gekoppelten Anti-IgM-Antikörpers

Analyse der IgM-Expression auf der Zelloberfläche der IgM-positiven Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi (A) und DG75 (B) und der IgM-negativen prä-B-Zelllinien RCH-ACV (C) und SMS-SB (D) mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer APC-gekoppelten Isotypkontrolle gefärbt. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit FlowJo ausgewertet.

Für den CD79a-Knockdown wurden DG75- und Daudi-Zellen mit Lentivirus behandelt, um eine stabile Integration eines shRNA-exprimierenden Konstrukts zu ermöglichen. Als Expressionsplasmid diente der induzierbare LT3-GECIR-Vektor (siehe Abbildung 11), der es ermöglichte, transduzierte Zellen über den fluoreszierenden Marker mCherry anzureichern und somit eine reine Population an Zellen für eine induzierbaren Knockdown von CD79a zu generieren.

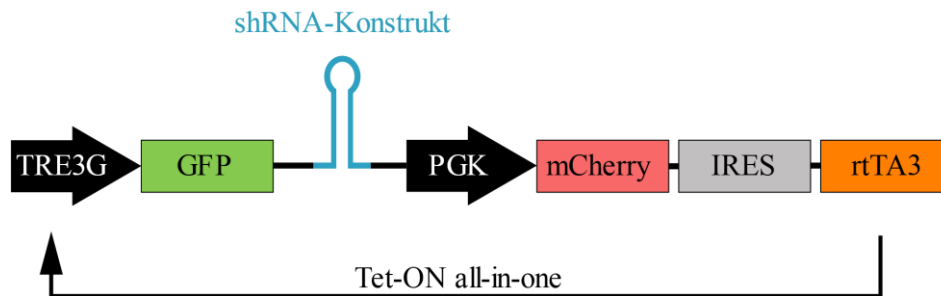


Abbildung 11: shRNA-Expressionsplasmid LT3-GECIR

Schematische Darstellung der durch Tetracyclin oder Doxycyclin induzierbaren Kasette von LT3-GECIR mit dem induzierbaren bzw. konstitutiv exprimierenden Promotor TRE3G bzw. PGK, den beiden Fluoreszenzmarkern GFP und mCherry und den durch Tetracyclin kontrollierten Transaktivator 3 (rtTA3), der über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit der konstitutiven Expression von mCherry gekoppelt ist.

Für die Untersuchungen der BZR-Oberflächenexpression nach CD79a-Knockdown wurden jeweils 1×10^7 Zellen für 48 h mit Doxycyclin ($3 \mu\text{g/ml}$) behandelt, um die Expression der shRNA zu induzieren. Anschließend wurden mit jeweils 1×10^6 Zellen eine Anti-IgM-Färbung mit oben beschriebenem Protokoll durchgeführt. Zum Vergleich wurden die restlichen Zellen lysiert und per Western Blot hinsichtlich des CD79a-Knockdowns untersucht. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse des Versuchs in DG75- und Daudi-Zellen.

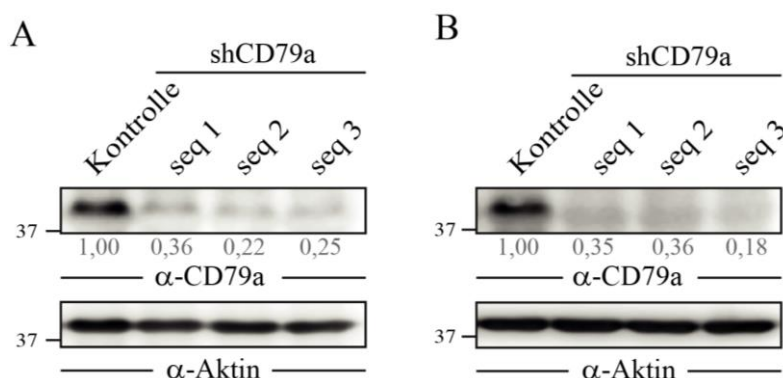


Abbildung 12: Knockdown von CD79a in DG75- und Daudi-Zellen

Immunologische Detektion von CD79a in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), 48 h nach Induktion der Expression der Kontrollsequenz „Ren“ oder eine von drei CD79a-shRNAs-Sequenzen (seq 1 - 3). Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der jeweiligen Zellen integriert wurde. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte über die Dauer des Experimentes mit $3 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin. Als Beladungskontrolle diente Aktin. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms ImageJ. Die relative CD79a-Expression der Kontroll-shRNA-exprimierenden Zellen wurde dabei jeweils auf 1 gesetzt. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Für den CD79a-Knockdown wurden jeweils drei unterschiedliche shRNA-Sequenzen, die gegen die mRNA von CD79a gerichtet sind verwendet. Alle drei verwendeten Sequenzen zeigen 48 h nach Induktion der jeweiligen Sequenz eine vergleichbare Reduktion des CD79a-Proteins.

Die korrespondierenden BZR-Färbungen auf der Zelloberfläche zeigten durchweg eine Reduktion der Expression des BZR der Zellen nach CD79a-Knockdown im Vergleich zu den Zellen, die eine Kontroll-shRNA-Sequenz exprimierten (Abbildung 13). Durch die Verwendung der Isotypkontrolle wird deutlich, dass der BZR nicht vollständig verschwindet, sondern noch in geringem Maße auf der B-Zelle exprimiert wird.

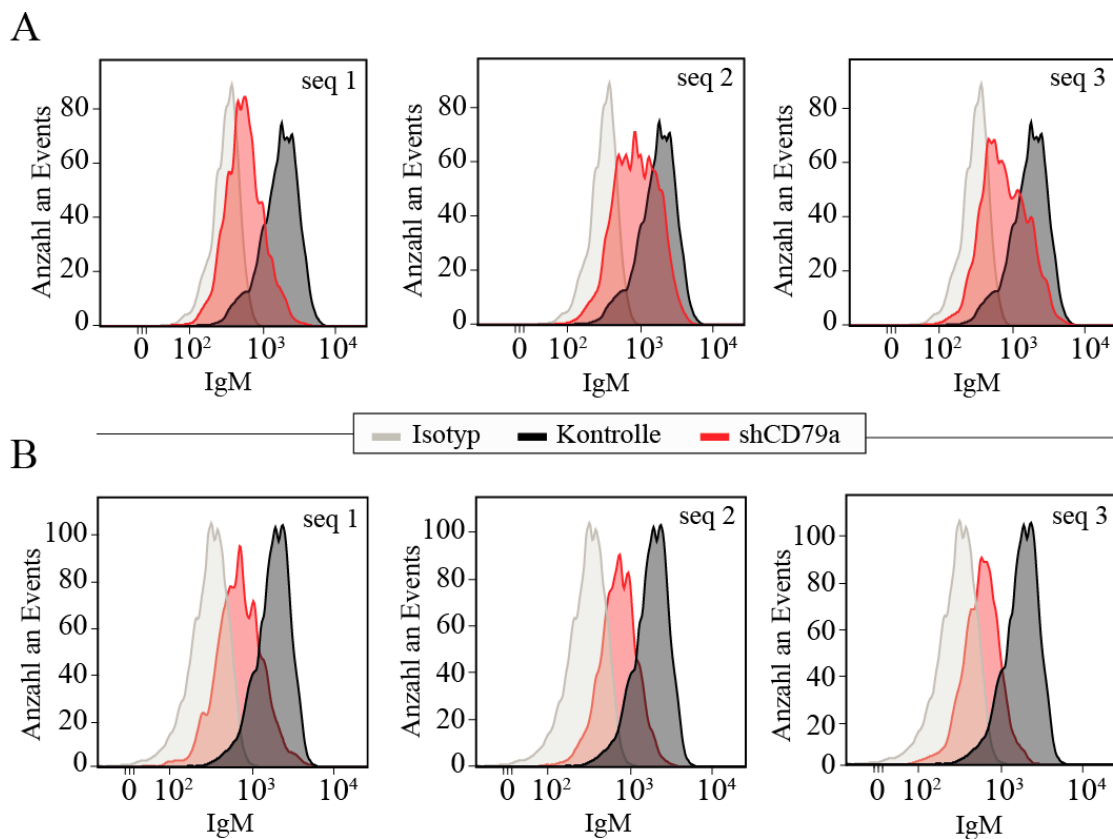


Abbildung 13: BZR-Oberflächenexpression nach induziertem CD79a-Knockdown in DG75- und Daudi-Zellen

Analyse der IgM-Expression auf der Zelloberfläche von DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) 48 h nach Induktion der Expression der Kontrollsequenz „Ren“ (Kontrolle) oder drei CD79a-shRNAs (seq 1 - 3) mittels Durchflusszytometrie. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte mit 3 µg/ml Doxycyclin. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer APC-gekoppelten Isotypkontrolle gefärbt. Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der jeweiligen Zellen integriert wurde. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit FlowJo ausgewertet.

4.1.1.2 Knockdown von CD79a führt zu einer Reduktion der Zellzahl im kompetitiven Assay

Die Auswirkung einer verringerten Oberflächenexpression des BZR_s kann in einem kompetitiven Assay untersucht werden. Hierfür wurden WT-Zellen und Zellen, die lentiviral mit dem Vektor LT3-GECIR transduziert wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und in letzteren die shRNA durch Zugabe von Doxycyclin (3 µg/ml) induziert. Durch die induzierte Expression des Markers GFP in den transduzierten Zellen wurde die Anzahl derselben in einem Zeitraum von 16 Tagen im Verhältnis zu GFP-negativen Wildtyp-Zellen gemessen. Eine Normalisierung der CD79a-Knockdownzellen erfolgte auf Zellen, die mit der Kontroll-shRNA-Sequenz „Ren“ transduziert wurden.

Da dieser Assay auf der Annahme basiert, dass die GFP-Expression mit dem Knockdown von CD79a bzw. der Expression des BZR der Zellen korreliert, wurde zunächst untersucht, ob diese Voraussetzung gegeben ist. Hierfür wurde die IgM-Expression der Zellen 8 Tage nach Induktion des Knockdowns in Abhängigkeit ihrer GFP-Expression bestimmt (siehe Abbildung 14).

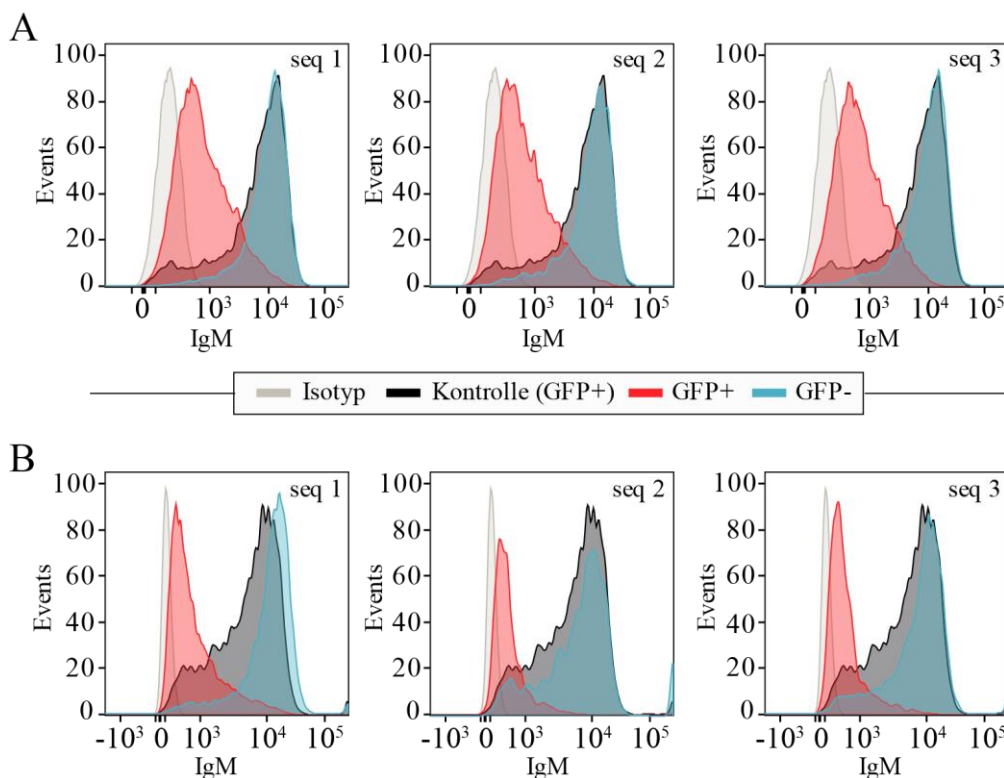


Abbildung 14: IgM-Expression in DG75- und Daudi-Zellen in Abhängigkeit ihrer GFP-Expression nach CD79a-Knockdown

Analyse der IgM-Expression in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) 8 Tage nach Induktion der Expression der Kontrollsequenz „Ren“ (Kontrolle) oder drei CD79a-shRNAs (seq 1 - 3) in Abhängigkeit ihrer GFP-Expression (GFP+ oder GFP-) mittels Durchflusszytometrie. Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der jeweiligen Zellen integriert wurde. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte über die Dauer des Experimentes mit 3 µg/ml Doxycyclin. Als Färbekontrolle wurden die Zellen mit einer APC-gekoppelten Isotypkontrolle gefärbt. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit FlowJo ausgewertet, die Anzahl an Events normalisiert dargestellt („normalized to mode“).

Zellen mit einer hohen GFP-Expression zeigen erwartungsgemäß eine maximale Reduktion des Oberflächenproteins, wohingegen Zellen einer niedrigen bzw. ohne GFP-Expression nur eine bedingte bzw. keine Verringerung der IgM-Expression zeigen.

In Abbildung 15 ist die graphische Auftragung des kompetitiven Assays zu sehen. Es zeigt sich, dass die Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen in beiden verwendeten Zelllinien nach Induktion des CD79a-Knockdowns über die Dauer des Versuchs stetig abnimmt und 16 Tage nach Induktion, mit Ausnahme einer Sequenz, einen Wert von unter 50 % des Ausgangsverhältnisses aufweist.

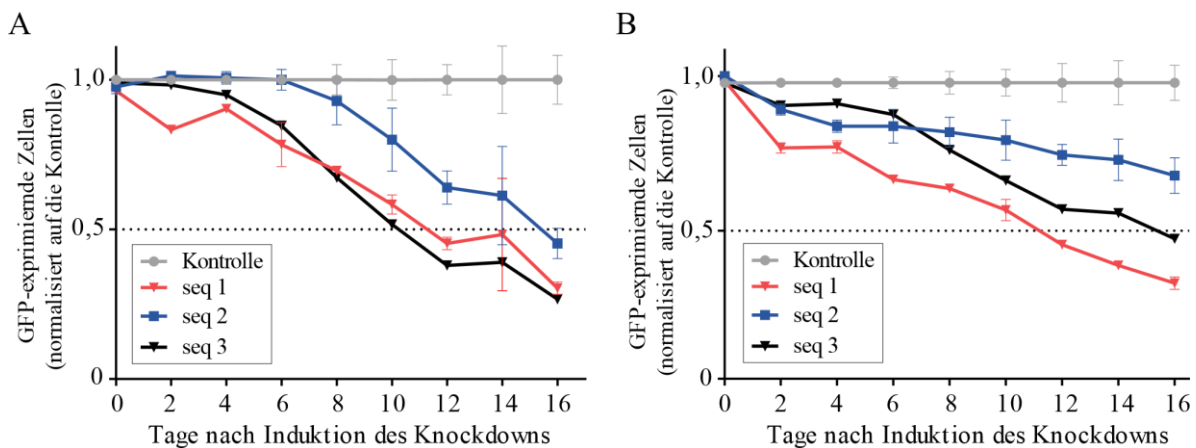


Abbildung 15: Kompetitiver Proliferations-Assay mit Daudi- und DG75-Zellen mit induziertem CD79a-Knockdown

Auswertung der Proliferation von DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) im kompetitiven Assays nach Induktion des CD79a-Knockdowns durch Expression von jeweils 3 CD79a-shRNAs (seq 1 - 3). Als Kontrollzellen dienen Zellen, die nach Induktion die Kontroll-shRNA „Ren“ exprimierten. Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der jeweiligen Zellen integriert wurde. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte über die Gesamtdauer des Experimentes mit 3 µg/ml Doxycyclin. Der Anteil an shRNA- bzw. Kontrollsequenz-exprimierender Zellen (GFP-positive Zellen) an der Gesamtpopulation wurde alle zwei Tage mittels Durchflusszytometrie bestimmt und auf den jeweiligen Anteil der Zellen der Kontrolle am jeweiligen Messtag normalisiert. Die Kontrolle wurde dabei auf 1 gesetzt. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit FlowJo ausgewertet, die Abbildung mit GraphPad Prism erstellt. (n = 3)

In Abbildung 16 (siehe nächste Seite) ist die Auswertung der kompetitiven Assays zu sehen, bei dem die jeweilige Fläche (AUC, *area under the curve*) berechnet wurde, die jeder Graph der einzelnen Sequenzen mit der Abszisse einschließt. Nach Vergleich der Tendenz mit der im Durchflusszytometer bestimmten Oberflächenexpression des IgM-Rezeptors 48 h nach Induktion des CD79a-Knockdowns zeigt sich eine negative Korrelation der IgM-Oberflächenexpression zur Stärke des Effekts im kompetitiven Assays. Der Korrelationskoeffizient r liegt nach Berechnung bei $r = 0,88$.

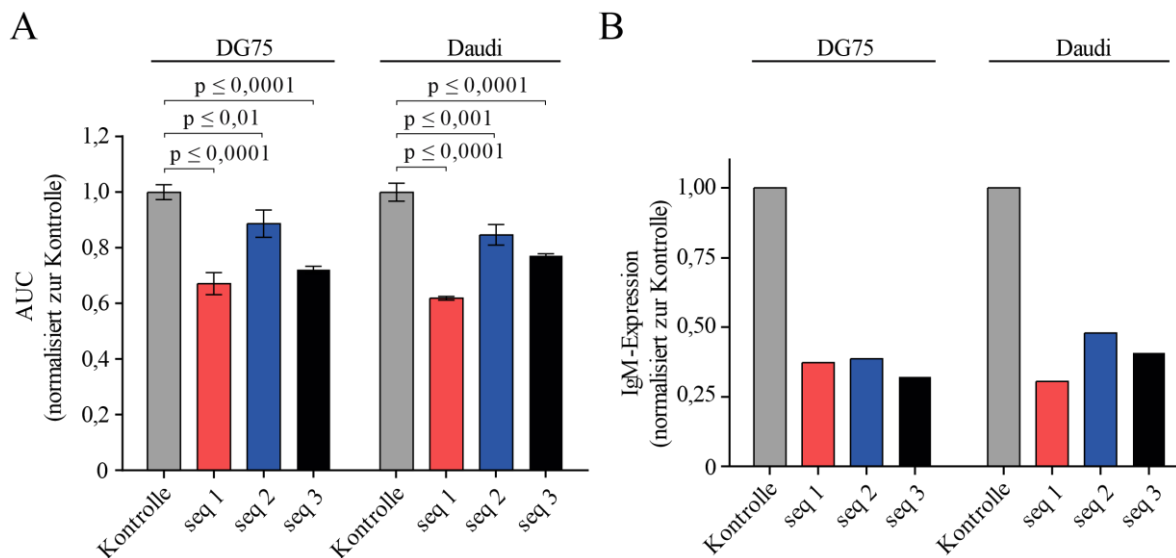


Abbildung 16: Die Reduktion der Zellzahl im kompetitiven Assay korreliert mit der Stärke des CD79a-Knockdowns

(A) Auftragung der berechneten relativen Fläche unter dem Graphen (AUC, *area under curve*) des kompetitiven Assays aus Abbildung 15 für die Dauer von 16 Tagen nach Induktion des CD79a-Knockdowns in DG75- und Daudi-Zellen. Die Normalisierung erfolgte auf den Flächenwert der Zellen, die die Kontroll-shRNA „Ren“ exprimierten. Die jeweiligen p-Werte wurden mit der Statistiksoftware GraphPad Prism berechnet. (n = 3) (B) Auftragung der relativen medianen Fluoreszenzintensität der IgM-Färbung aus Abbildung 13 72 h nach Induktion des CD79a-Knockdowns in DG75- und Daudi-Zellen. Die Fluoreszenzintensitätswerte der CD79a-Knockdown-Zellen wurden jeweils auf die betreffenden Werte der Kontroll-shRNA („Ren“) exprimierenden Zellen normalisiert, die auf 1 gesetzt wurden. (n = 1)

4.1.2 Inhibition der Kinase SYK durch den SYK-Inhibitor PRT062607

4.1.2.1 PRT062607 besitzt im Vergleich zu R406 bei gleicher Konzentration eine höhere Inhibitionsrate der Kinaseaktivität von SYK

Für die Inhibition von SYK in Burkitt-Lymphom-Zellen wurde zunächst ein geeigneter Inhibitor für die nachfolgenden Experimente bestimmt. Im Zeitraum dieser Arbeit standen zwei Inhibitoren zur Verfügung (PRT062607 und R406), die prinzipiell Verwendung finden konnten. Um den geeigneteren Inhibitor zu identifizieren, wurde zunächst das Inhibitionsvermögen der Kinaseaktivität von SYK beider Inhibitoren in DG75-Zellen bei gleicher Konzentration verglichen.

Hierfür wurden 1×10^7 Zellen der Zelllinie DG75 für 1 h mit $1 \mu\text{M}$ R406 bzw. $1 \mu\text{M}$ PRT062607 behandelt und anschließend lysiert. Die Lysate wurden hinsichtlich der Expression von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen mittels Western Blot analysiert. Die Wirkung des Inhibitors sollte so zunächst über die Reduktion der Phosphorylierung eingeschätzt werden.

In Abbildung 17 (siehe nächste Seite) ist das Ergebnis des Western Blots zu sehen, bei dem die Phosphorylierung im Vergleich zu DMSO-inkubierten Zellen nur in Zellen reduziert wurde, die mit dem Inhibitor PRT062607 behandelt wurden. R406 zeigte nach 1 h Inkubation keine nennenswerte Reduzierung der Phosphorylierung bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$.

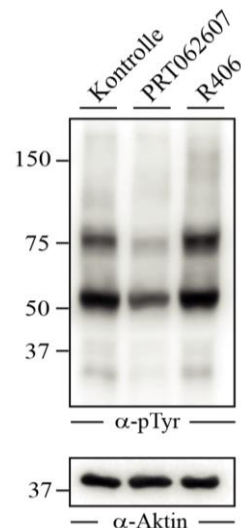


Abbildung 17: Tyrosinphosphorylierungen nach Behandlung von DG75-Zellen mit SYK-Inhibitoren

Immunologische Detektion von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen (pTyr) in DG75-Zellen, die 1 h mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 oder R406 in der angegebenen Konzentration behandelt wurden. Als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung wurden Zellen mit DMSO inkubiert. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Eine weitere Einschätzung der Wirkungseffizienz der beiden Kinaseinhibitoren lieferte eine Datenbank (<http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk/kinase-inhibitors>) in der online Daten zur Wirkungseffizienz bzw. Spezifität verschiedener Inhibitoren (darunter auch PRT062607 und R406) hinterlegt sind. Dabei wurde die Restaktivität von unterschiedlichen Kinasen nach Verwendung des jeweiligen Inhibitors bestimmt. Die Werte für die Restkinaseaktivität nach Inkubation mit den SYK-Inhibitoren PRT06267 und R406 wurden graphisch in Abbildung 18 dargestellt.

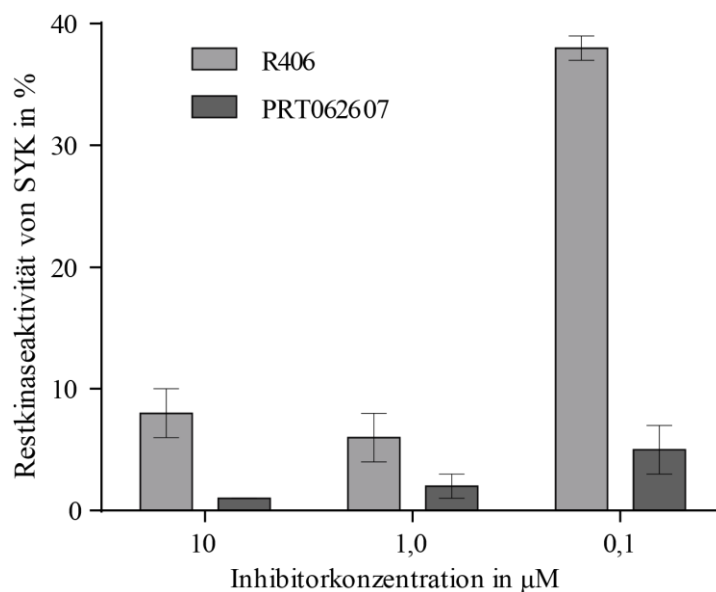


Abbildung 18: Restaktivität der Kinasefunktion von SYK nach Behandlung mit SYK-Inhibitoren

Restaktivität der Kinasefunktion von SYK nach Behandlung mit den SYK-Inhibitoren R406 und PRT062607 mit den angegebenen Konzentrationen. Die Werte der Restaktivität der jeweiligen Kinasen wurden einer Online-Datenbank (<http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk/kinase-inhibitors>) entnommen. (n = 3)

Auch hier zeigte sich, dass PRT062607 im Vergleich zu R406 in allen drei getesteten Konzentrationen einen größeren inhibitorischen Effekt auf SYK erzielte und bei einer Konzentration von $c = 0,1 \mu\text{M}$ einen deutlichen Vorteil gegenüber R406 hatte.

4.1.2.2 Bestimmung der Arbeitskonzentration von PRT062607

Um die Arbeitskonzentration von PRT062607 in Burkitt-Lymphom-Zellen zu bestimmen, wurde eine Titration durchgeführt, bei der die Zelllinie DG75 für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot die Wirkung des Inhibitors auf die Tyrosinphosphorylierung von BLNK an Position 96 (Tyr96) untersucht. BLNK liegt downstream von SYK im BZR-Signalweg und wird in Folge der BZR-Aktivierung an Tyr96 durch SYK phosphoryliert.

Um einen Effekt auf die Phosphorylierung von BLNK im Western Blot zu beurteilen, wurden der BZR-Signalweg in DG75-Zellen nach Inkubation mit dem SYK-Inhibitor durch Zugabe eines Anti-IgM-Antikörpers ($10 \mu\text{g/ml}$, Dianova) für 5 min stimuliert. In Abbildung 19 ist das Ergebnis dieser Titration zu sehen, bei der die Lysate aus unstimulierten und stimulierten Zellen aufgetragen wurde. Es zeigt sich, dass PRT062607 bereits bei der geringsten hier verwendeten Konzentration die Phosphorylierung von Tyrosin 96 an BLNK maximal reduziert.

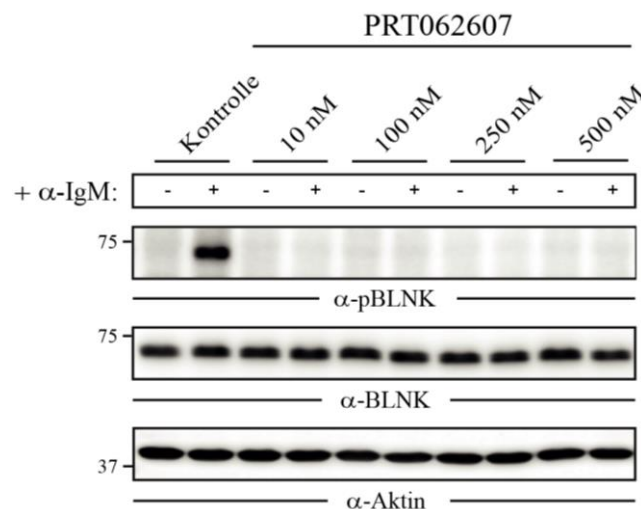


Abbildung 19: PRT062607 hemmt die Phosphorylierung von BLNK nach Stimulation des BZRs

Immunologische Detektion von pBLNK (Tyr96) und BLNK in DG75-Zellen, die mit den angegebenen Konzentrationen des SYK-Inhibitors PRT062607 für 1 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZRs mit einem Anti-IgM-Antikörper ($10 \mu\text{g/ml}$) für 5 min. DG75-Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienen als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZRs. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Um die Konzentration des SYK-Inhibitors zu bestimmen, bei der auch im BZR-Signalweg weiter *downstream* liegende Effekte in der Signalleitung auftreten, wurde zudem auch die Serinphosphorylierung an Position 473 (Ser473) der Kinase AKT (pAKT) in DG75-Zellen untersucht. AKT liegt *downstream* von SYK im BZR-Signalweg und wird in Folge der

Aktivierung an diesem Serinrest phosphoryliert. In Abbildung 20 ist das Ergebnis der Titration des SYK-Inhibitors zu sehen, der bei steigenden Konzentrationen eine dosisabhängige Reduktion der Phosphorylierung von AKT verursacht.

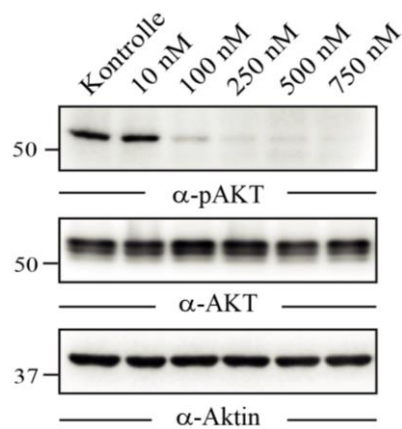


Abbildung 20: PRT062607 hemmt die basale Phosphorylierung von AKT

Immunologische Detektion von pAKT (Ser473) und AKT in DG75-Zellen, die mit den angegebenen Konzentrationen des SYK-Inhibitors PRT062607 für 1 h behandelt wurden. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. DG75-Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Die geringste Konzentration bei der der maximale Effekt der Reduktion nachweisbar war, lag bei einer Inhibitorkonzentration von $c = 250 \text{ nM}$, die für Burkitt-Lymphom-Zelllinien als Arbeitskonzentration für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

4.1.2.3 Reduzierte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen nach SYK-Inhibition

Der Inhibitor PRT062607 inhibiert die Kinaseaktivität von SYK. Da die Kinase Hauptmediator des BZR-Signalwegs und essentiell für die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege ist, unterbleibt dementsprechend auch die Signalleitung des BZR-Signalwegs nach SYK-Inhibition. Um sich einen ersten Eindruck über den Phosphorylierungsstatus in den Zellen nach Inhibition der Kinase zu verschaffen, wurde ein Western Blot durchgeführt und Tyrosinphosphorylierte Proteine mittels eines Phosphotyrosin-Antikörpers untersucht.

Hierfür wurden jeweils 1×10^7 Zellen 1 h mit 250 nM PRT062607 vorbehandelt und anschließend eine 5-minütige Stimulation des BZRs durch Verwendung eines anti-IgM-Antikörpers (10 $\mu\text{g/ml}$, Dianova) unterzogen. Um eine stärkere Aktivierung des Signalweges zu erzeugen, wurden die Zellen 20 min vor der Stimulation in serumfreies Medium inklusive des Inhibitors bzw. DMSO überführt. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auftragung im Western Blot und der Nachweis der an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen mittels eines Phosphotyrosin-Antikörpers (siehe Abbildung 21, nächste Seite).

In beiden Zelllinien ist eine deutliche Aktivierung des Signalwegs nach BZR-Stimulation durch eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung an Proteinen nachweisbar. Diese Aktivierung ist in mit

PRT062607 vorbehandelten Zellen zwar noch erkennbar, jedoch in deutlich abgeschwächter Form nachweisbar. Unstimulierte Zellen zeigen bereits basal ein reduziertes Phosphorylierungsmuster nach Inhibition von SYK.

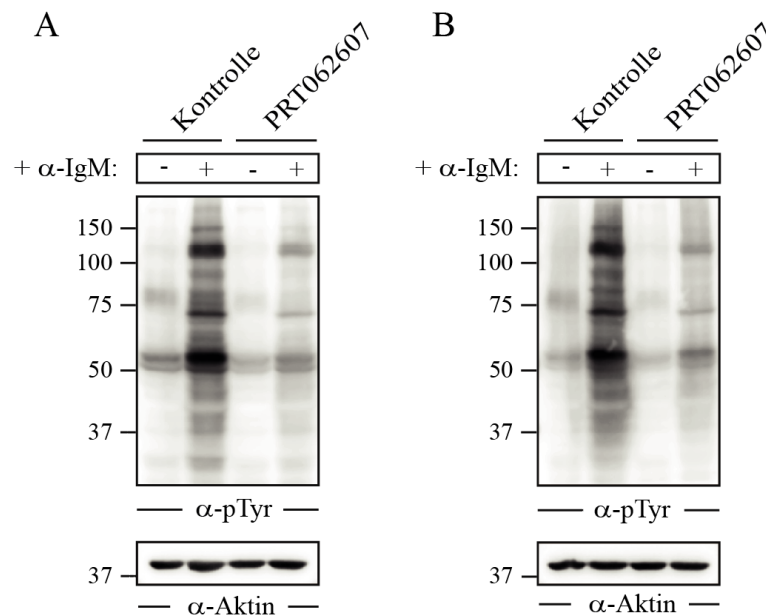


Abbildung 21: Reduzierte Tyrosinphosphorylierungen in DG75- und Daudi-Zellen nach SYK-Inhibition
 Immunologische Detektion von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in Daudi- (A) und DG75-Zellen (B), die mit 250 nM des SYK-Inhibitors PRT062607 für 1 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZR mit einem Anti-IgM-Antikörper (10 µg/ml) für 5 min. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZR. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

4.1.2.4 Burkitt-Lymphom-Zellen zeigen eine verminderte Viabilität nach SYK-Inhibition

Wie in Abbildung 21 gezeigt, sind die Tyrosinphosphorylierungen nach SYK-Inhibition durch PRT062607 in DG75- und Daudi-Zellen im basalen Zustand reduziert. Im Folgenden sollte näher untersucht werden, ob der Inhibitor einen Effekt auf die Viabilität der Zellen zeigt. Hierfür wurde ein XTT-Assay mit DG75- und Daudi-Zellen durchgeführt, mit dem kolorimetrisch die Produktion von NAD(P)H über die Reduktion von 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT) nachgewiesen wird. Da die Produktion von NAD(P)H mit der Glykolyserate korreliert, kann der Umsatz von XTT als ein Maß für die Viabilität der Zellen verstanden werden.

Für den XTT-Assay wurden je 3×10^5 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an PRT062607 in einer Mikrotiterplatte (96-well-Format) in einem Volumen von 100 µl inkubiert und nach drei Tagen der Umsatz von XTT innerhalb von 4 h ermittelt. Zur Normalisierung wurde zusätzlich an Tag 0 der jeweilige basale XTT-Umsatz bestimmt.

Abbildung 22 (siehe nächste Seite) zeigt die graphische Auswertung des XTT-Assays in DG75- und Daudi-Zellen nach SYK-Inhibition. Nach drei Tagen ist ein Effekt auf die Viabilität der

mit PRT062607 behandelten Daudi- und DG75-Zellen zu erkennen. So zeigen Zellen nach Inhibition von SYK eine dosisabhängige Erniedrigung ihrer Viabilität. Der mit der Software GraphPad Prism berechnete IC₅₀ lag in DG75- bzw. Daudi-Zellen bei 1,20 µM bzw. 1,03 µM.

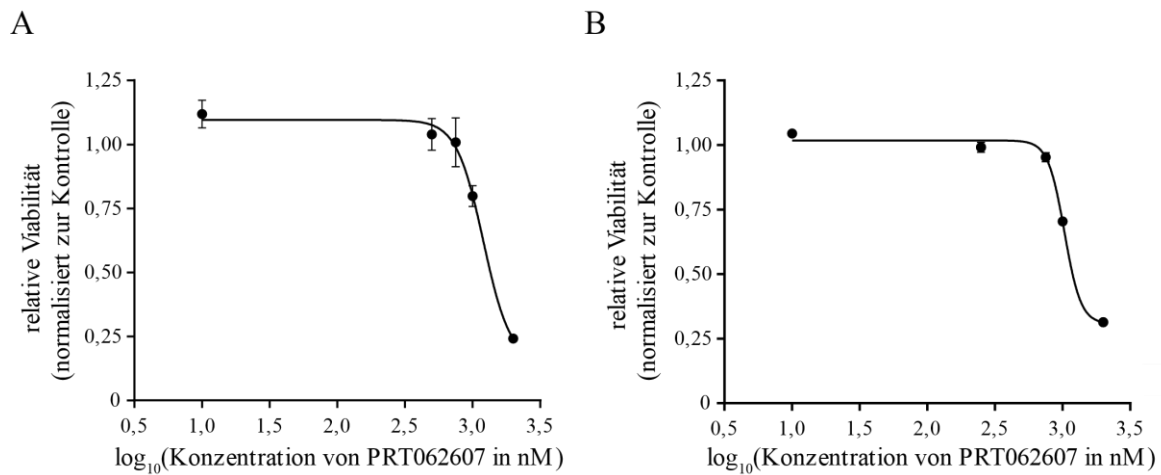


Abbildung 22: PRT062607 reduziert die Viabilität von DG75- und Daudi-Zellen

Auswertung von XTT-Assays zur Bestimmung der Viabilität von DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) nach Inkubation mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 in den angegebenen Konzentrationen. Gemessen wurden Triplikate der einzelnen Proben an Tag 0 und Tag 3. Die Messwerte von Tag 3 wurden mit den korrespondierenden Messwerten der Proben von Tag 0 verrechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellen genommen, die mit DMSO inkubiert wurden. Die Standardabweichungen wurden aus den Werten der Triplikate berechnet. (n = 1)

Da der durch den XTT beobachtete Viabilitätsverlust der Zellen nach SYK-Inhibition prinzipiell über einen proliferativen als auch über einen apoptotischen Effekt erklärbar ist, wurde zur näheren Charakterisierung des Effekts ein Annexin-basierter Apoptose-Assay durchgeführt bei dem DG75- und Daudi-Zellen für eine Woche mit steigenden Konzentrationen an PRT062607 inkubiert wurden. Abbildung 23 (siehe nächste Seite) zeigt die Auswertung des Assays bei dem der Anteil an viablen Zellen (Annexin- und 7-AAD-negativ) gegen die jeweilige Konzentration des Inhibitors aufgetragen ist. Es zeigt sich, dass PRT062607 in Konzentrationen von $c \leq 1 \mu\text{M}$ nach einer Woche Inkubation keinen signifikanten Effekt auf die Apoptoserate der Zellen besitzt.

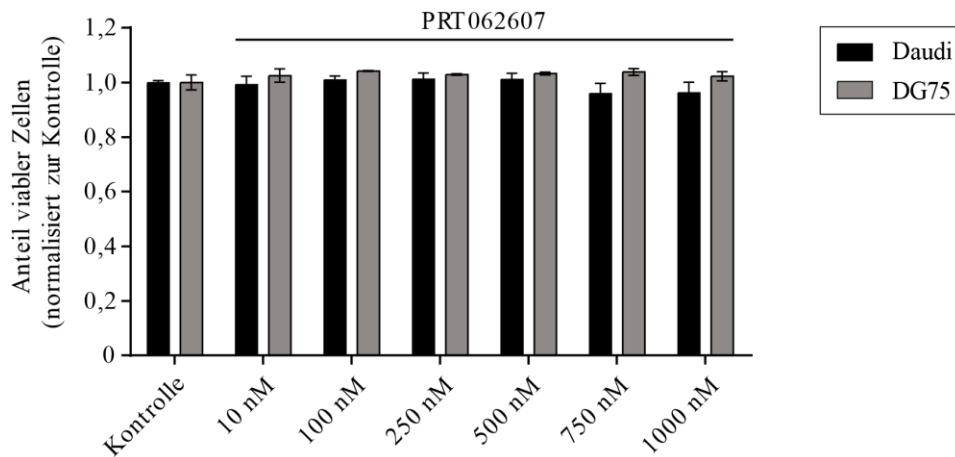


Abbildung 23: PRT062607 zeigt keine apoptotischen Effekte in DG75- und Daudi-Zellen

Auswertung des Annexin-basierten Apoptose-Assays mit DG75- und Daudi-Zellen, die eine Woche mit den angegebenen Konzentrationen an PRT062607 behandelt wurden. Die Darstellung zeigt den normalisierten Anteil an viable Zellen (Annexin- und 7AAD-doppelt-negativ) in Relation zu viable Zellen in der Kontrollzellpopulation, die mit DMSO inkubiert wurden. (n = 3)

4.1.2.5 Inhibition von SYK führt zu deregulierten Phosphoproteinen, die mit dem BZR-Signalweg assoziiert sind

Die Inhibition der Kinase SYK durch PRT062607 führte im Burkitt Lymphom zu einer Reduktion der Proliferation. Ein apoptotischer Effekt konnte nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollten regulierte Signalwege nach Inhibition von SYK identifiziert werden, um die Effekte des Inhibitors näher charakterisieren zu können. Hierfür wurden DG75- und Daudi-Zellen 1 h nach SILAC-Markierung mit dem Inhibitor PRT062607 behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde das Lysat massenspektrometrisch hinsichtlich regulierter Tyrosinphosphorylierter Proteine (pYome) untersucht. Eine schematische Darstellung der SILAC-Markierung und anschließender Probenbehandlung ist aus Abbildung 24 ersichtlich.

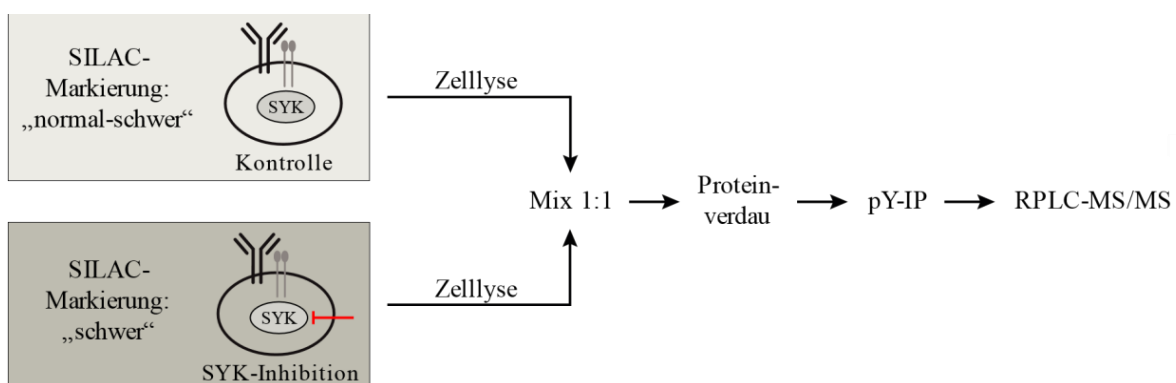


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Probenherstellung und -prozessierung für die pYome-Analyse
Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

In Abbildung 25 (siehe nächste Seite) ist die Auftragung von angereicherten Tyrosinphosphorylierten Proteinen zu sehen, die in beiden Burkitt-Lymphom-Zelllinien (DG75 und

Daudi) nach Inhibition von SYK detektiert wurden. Phosphoproteine, die in mindestens einer der beiden Zelllinien signifikant reguliert waren, sind farblich markiert dargestellt.

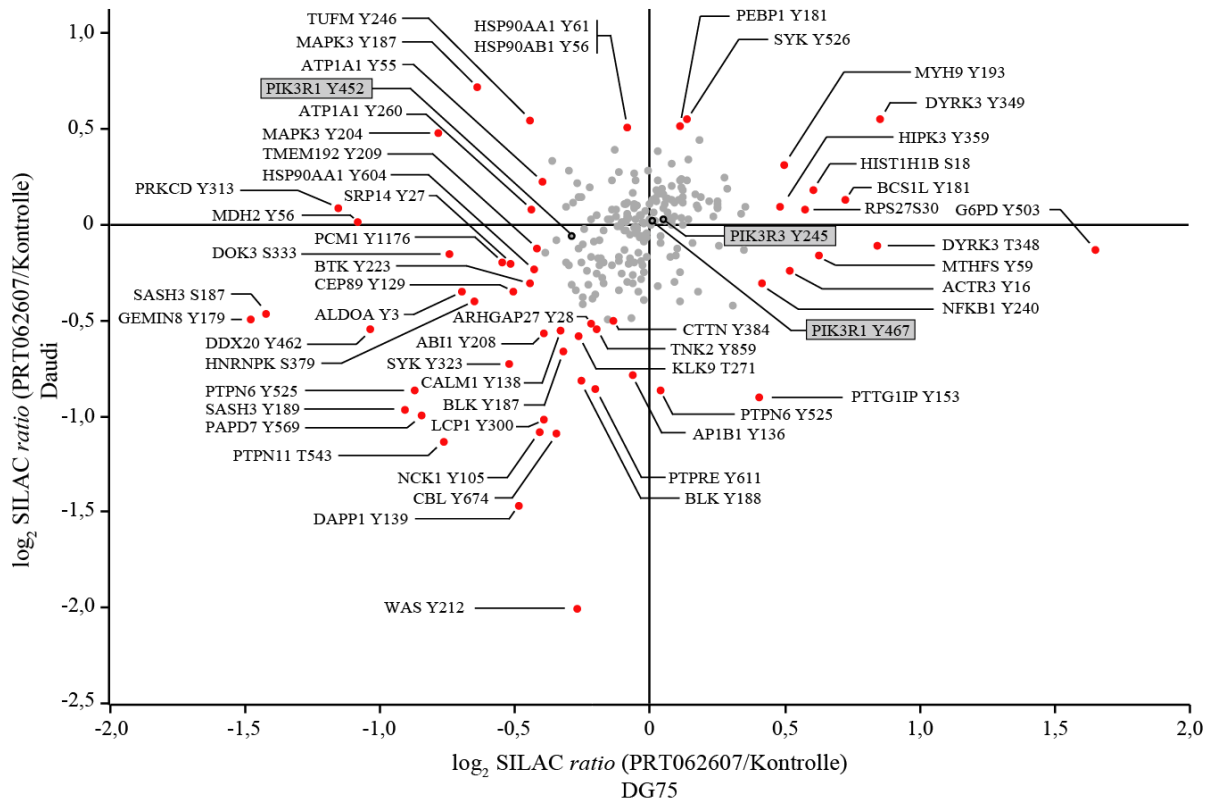


Abbildung 25: Tyrosin-phosphorylierte Proteine (pYome) nach Inhibition der Kinase SYK

Scatter Plot mit detektierten angereicherten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in DG75- und Daudi-Zellen, die 1 h mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 (250 nM) behandelt wurden. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit DMSO inkubiert wurden. Signifikant regulierte Phosphoproteine in mindestens einer Zelllinie sind rot markiert, nicht signifikant regulierte Phosphoproteine der PI3K-Untereinheiten (PIK3R1 und PIK3R3) schwarz umrandet. Der Signifikanztest wurde in Perseus nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur für multiple Vergleiche in Kombination mit einem Ausreißertest („Outlier A“-Analyse) durchgeführt. Die in dieser Darstellung verwendeten Daten sind bereits durch einen Kooperationspartner in Corso und Kollegen²⁵⁹ in anderer Form ausgewertet und veröffentlicht worden.

Eine Signalwegsanalyse mit den signifikant regulierten Phosphoproteinen gibt Aufschluss über die Art der betroffenen Signalwege nach SYK-Inhibition (siehe Abbildung 26).

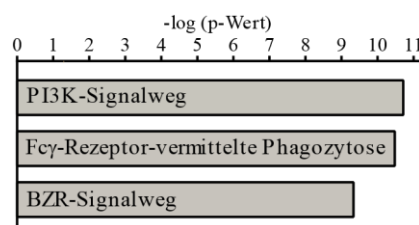


Abbildung 26: Signalwegsanalyse von regulierten Phosphoproteinen in DG75- und Daudi-Zellen nach SYK-Inhibition

Signalwegsanalyse von angereicherten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen, die nach Behandlung von DG75- und Daudi-Zellen signifikant reguliert waren (siehe Abbildung 25). Die Signalwegsanalyse wurde mit IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Quiagen) durchgeführt. Darstellung der Top 3 Signalwege, geordnet anhand der Signifikanz der Zugehörigkeit der jeweiligen Proteine zum jeweiligen Signalweg.

So zeigt sich nach Inhibition von SYK in DG75- und Daudi-Zellen vor allem eine Regulation der Phosphorylierung in Proteinen, die mit dem BZR-Signalweg inklusive des PI3K-Signalweges assoziiert sind. Interessanterweise zeigen die identifizierten regulatorischen Untereinheiten der PI3K (PIKR1 und PIK3R3) jedoch keine signifikante Regulation.

4.2 Burkitt-Lymphom-Zellen zeigen eine hohe HSP90-Abhängigkeit

4.2.1 Der HSP90-Inhibitor AT13387 besitzt ein hohes apoptotisches Potenzial im Inhibitorscreen

Ein von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Zenz (NCT, Heidelberg) durchgeführter Screen mit 30 verschiedenen Inhibitoren und 17 unterschiedlichen Zelllinien ermöglichte die Identifikation von potenziellen Zielstrukturen in Burkitt-Lymphom-Zellen.

Hierfür wurden die Zellen 48 h mit den Inhibitoren titriert und das Level an ATP mit Hilfe des Kits „CellTiter-Glo Assay“ (Promega) bestimmt. In Abbildung 27 sind die IC₅₀-Werte der einzelnen Titrationskurven (*dose-response*-Kurve) der jeweiligen Zelllinie pro verwendeten Inhibitor dargestellt.

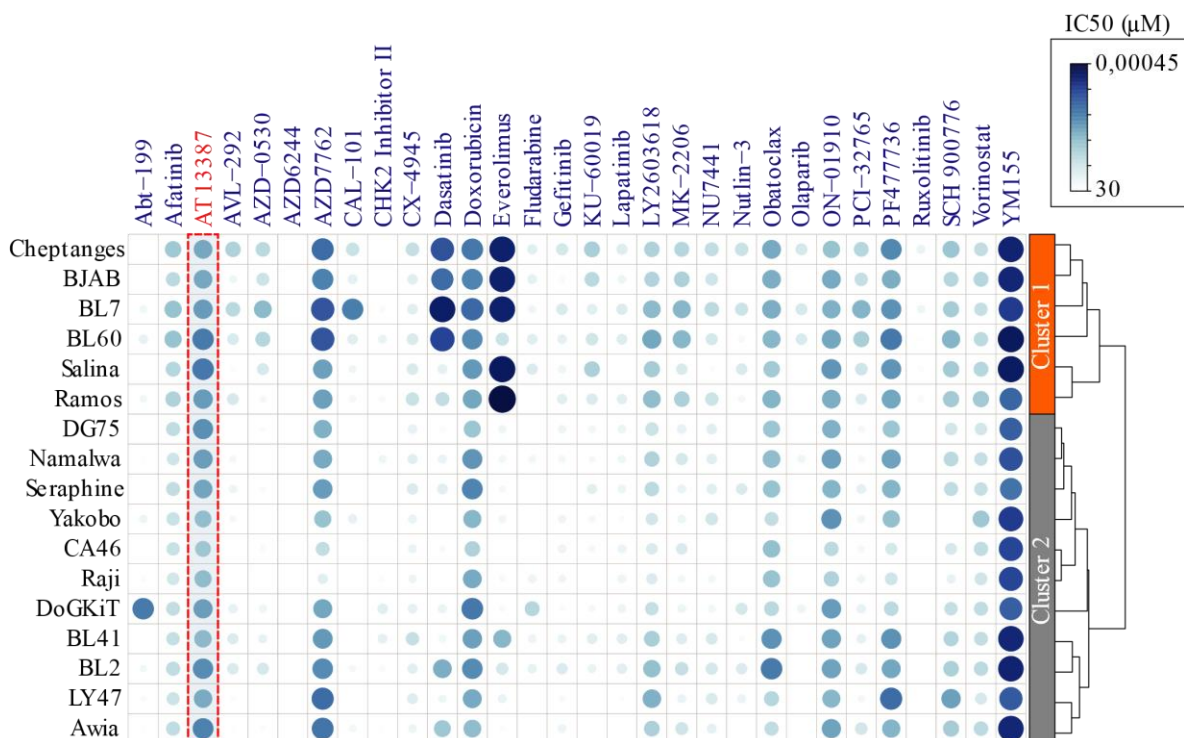


Abbildung 27: HSP90-Inhibitor AT13387 besitzt ein hohes apoptotisches Potenzial im Inhibitorscreen

Auswertung des Inhibitorscreens bei dem die getesteten Zellen (vertikal) und die verwendeten Inhibitoren (horizontal) aufgetragen sind. Die *dots* an den Knotenpunkten geben Hinweise auf den berechneten IC₅₀-Wert eines durchgeführten Viabilitäts-Assays durch Bestimmung der ATP-Konzentration nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor. Je größer und dunkler die Punkte, desto größer ist das apoptotische Potenzial des jeweiligen Inhibitors (siehe Farbskala rechts oben). Die Zelllinien wurden aufgrund ihrer Effekte auf die Inhibitoren in zwei Cluster (BL-Cluster 1 und BL-Cluster 2) eingeteilt. Der Inhibitorscreen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zenz (NCT, Heidelberg) durchgeführt. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Die Farbe und Größe der jeweiligen Punkte (*dots*) beschreibt die Affinität des verwendeten Inhibitors in der entsprechenden Zelllinie. Je niedriger der IC50-Wert des Inhibitors bzw. je wirksamer der Inhibitor ist, desto dunkler und größer der jeweilige *dot*.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Assays wurden neben an Lymphomen noch ungetesteten bereits in der Literatur beschriebene Inhibitoren verwendet. So weist der BCL-2 spezifische Inhibitor Abt-199 (1. Spalte) nur in DoGKiT einen Effekt auf, da diese Zelllinie im Gegensatz zu den anderen hier verwendeten Zelllinien eine Translokation besitzt, die das BCL2-Gen betrifft. YM155 (letzte Spalte) hingegen inhibiert die Promotoraktivität von Survivin und kann als Positivkontrolle für den Inhibitorscreen angesehen werden, bei dem alle hier verwendeten Zellen einen Verlust ihrer Viabilität zeigen. Ebenso ist es nicht verwunderlich, dass zum Beispiel die Checkpoint-Inhibitoren AZD7762 und LY2603618, die den Zellzyklus blockieren, im Gegensatz zu dem MEK-Inhibitor AZD6244 (Selumetinib), der einen für das Überleben der Lymphome nicht-essentiellen Signalweg hemmt, zur Reduktion der Viabilität von fast allen Zelllinien führt. Interessanterweise zeigt neben den in der Krebstherapie angewandten Doxorubicin, Obatoclox, ON-01910 (Rigosertib) und PF477736 auch ein bis dato in Lymphomen noch ungetesteter Inhibitor gegen HSP90 (AT13387) vergleichbare Viabilitätseffekte in allen getesteten Zelllinien.

4.2.1 Erhöhte Expression der HSP90-Isoformen im Burkitt Lymphom

Da der Inhibitorscreen HSP90 als potenzielle neue Zielstruktur im Burkitt Lymphom identifizierte (siehe Abbildung 27) und HSP90 im Zuge des tonischen Signalweges eine Regulation in seiner Phosphorylierung erfährt (siehe Abbildung 25 bzw. Corso und Kollegen²⁵⁹), sollte im Folgenden näher geklärt werden, welche funktionelle Rolle HSP90 in den Burkitt-Lymphom-Zellen einnimmt.

Hierfür wurde zunächst die Expression von HSP90 in humanen primären Lymphknoten und in humane Gewebeproben untersucht (siehe Abbildung 28, nächste Seite).

Das Patientenmaterial wurde von Dr. Hanibal Bohnenberger (Pathologie, UMG, Göttingen) zur Verfügung gestellt und die Expression der Isoformen HSP90 α und HSP90 β durch histologische Färbungen an Gewebeschnitten untersucht.

Zwei unabhängige Pathologen analysierten hierfür Schnitte von insgesamt 15 Patienten und stuften die HSP90-Expression anhand der Stärke der Färbung des jeweiligen Schnittes in unterschiedliche Klassen ein. Hierbei wurde ein 3-Stufen-Klassifizierungsmodell angewendet, wonach die Expressionsstärke in „stark“, „moderat“ und „nicht nachweisbar“ eingestuft wurde.

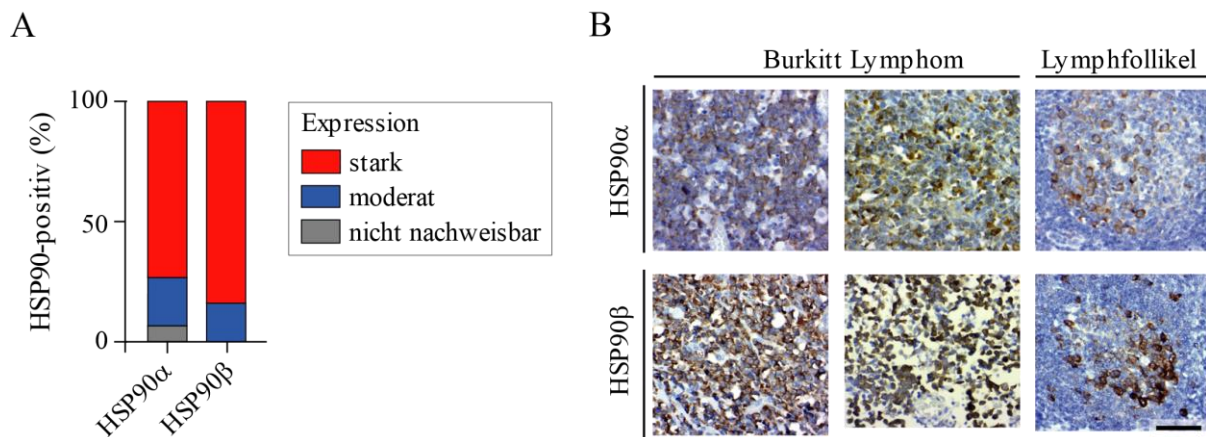


Abbildung 28: Erhöhte Expression von HSP90 in Gewebeproben von Patienten mit Burkitt Lymphom

(A) Auswertung der Expressionsdaten von HSP90α und HSP90β aus Gewebeproben von insgesamt 15 Patienten mit Burkitt Lymphom. Die Auswertung der Expression erfolgte durch zwei unabhängige Pathologen und wurde nach einem 3-Stufen-Klassifizierungsmodell durchgeführt, wonach die Expression in „stark“, „moderat“ oder in „nicht nachweisbar“ beurteilt wurde. (B) Immunhistochemische Färbungen von HSP90α und HSP90β in Gewebeproben von Patienten mit Burkitt Lymphom und Färbungen eines gesunden Lymphfollikels. Die Abbildung zeigt je zwei exemplarische Färbungen beider HSP90-Isoformen aus der Patientenkohorte, ausgewertet in (A). Der eingezeichnete Größenstandard (rechts unten) besitzt eine Länge von 50 µm. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Die Auswertung ergab, dass beide HSP90-Isoformen in den Geweben von an Burkitt Lymphom erkrankten Patienten eine erhöhte Expression aufwiesen. Eine starke Expression von HSP90α wurde in 73,3 % und von HSP90β in 86,7 % der Patientenproben befunden. Keine Expression von HSP90α konnte nur in einem Fall diagnostiziert werden.

Des Weiteren wurde die Expression beider HSP90-Isotypen in den in der Arbeitsgruppe vorhandenen Burkitt-Lymphom-Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien lysiert und die Expression mittels Western Blot analysiert (siehe Abbildung 29, nächste Seite).

Als Expressionsvergleich wurden Lysate von B-Zellen eines gesunden Spenders aufgetragen. Die B-Zellen, die nach Isolierung eines Spenders eine Reinheit von 95,2 % aufwiesen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Halvard Bönig (DRK-Blutspendedienst BaWüHe, Institut Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass beide HSP90-Isoformen in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien eine im Vergleich zu B-Zellen eines gesunden Spenders stark erhöhte Expression aufweisen (im Durchschnitt 3,6x erhöht für HSP90α und 7,8x für HSP90β).

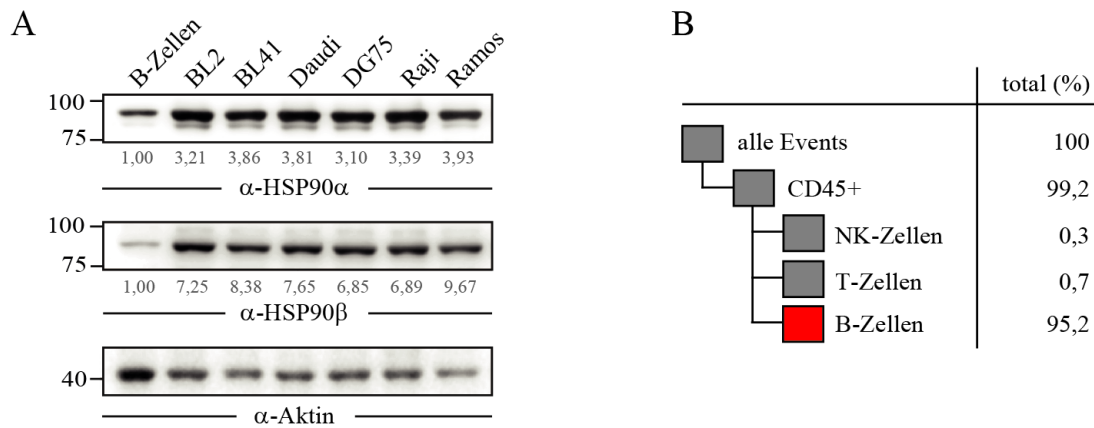


Abbildung 29: Erhöhte Expression von HSP90α und HSP90β in Burkitt-Lymphom-Zelllinien

(A) Immunologische Detektion von HSP90α und HSP90β in Burkitt-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu B-Zellen aus einem gesunden Spender, die von Prof. Dr. Halvard Bönig zur Verfügung gestellt wurden. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ wobei die jeweilige Expression von HSP90 in B-Zellen auf 1 gesetzt wurde. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. (B) Reinheit der in (A) verwendeten B-Zellen (rote Markierung) nach Isolierung und Anreicherung mittels Durchflusszytometrie. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

4.2.3 Inhibition von HSP90 in Burkitt-Lymphom-Zellen führt zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose

Da HSP90 im Zuge der Aktivierung des tonischen BZR-Signalwegs phosphoryliert wird (Corso und Kollegen²⁵⁹) und ein in einem Inhibitorscreen verwendeter HSP90-Inhibitor einen apoptotischen Effekt zeigt (siehe Abbildung 27), sollte die Rolle von HSP90 im Burkitt Lymphom näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Inhibitionsversuche durchgeführt, bei denen die ATPase-Aktivität von HSP90 gehemmt wurde. Hierfür wurde der neben dem im Inhibitorscreen verwendete HSP90-Inhibitor AT13387 (Onalespib) auch STA-9090 (Ganetespi) verwendet (siehe Abbildung 30). Beide Inhibitoren sind bereits am Patienten getestet. So sind für AT13387 bzw. STA-9090 bereits 5 bzw. 18 klinische Studien gelaufen und abgeschlossen worden (Quelle: *clinicaltrials.gov*, Stand: Juni 2018).

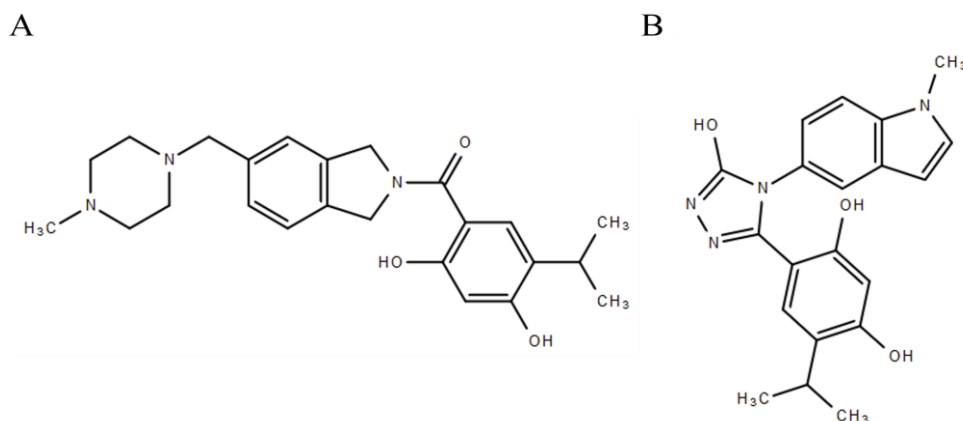


Abbildung 30: Struktur der HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090

Struktur von AT13387 (A) und STA-9090 (B). Die Strukturformeln wurden mit Hilfe von „ChemSpider“ (www.chemspider.com) erstellt.

Erste Inhibitionsversuche mit den HSP90-Inhibitoren in DG75- und Daudi-Zellen zeigten Effekte in einem Zellzyklus-Assay mit dem bestimmt werden kann, in welchen Zellzyklusphasen sich die einzelnen Zellen einer Population zum Analysezeitpunkt befinden. So konnte in dem BrdU-basierten Assay in DG75- und Daudi-Zellen nach Inhibition von HSP90 für 24 h eine gegenüber der Kontrolle signifikant reduzierte Anzahl an Zellen in der Synthese-Phase festgestellt werden (siehe Abbildung 31). Ein gleichzeitiger Anstieg an Zellen, die sich in der G0/G1- bzw. in der G2- und M-Phase befinden, sind Hinweise auf einen Zellzyklusarrest der Zellen nach HSP90-Inhibition.

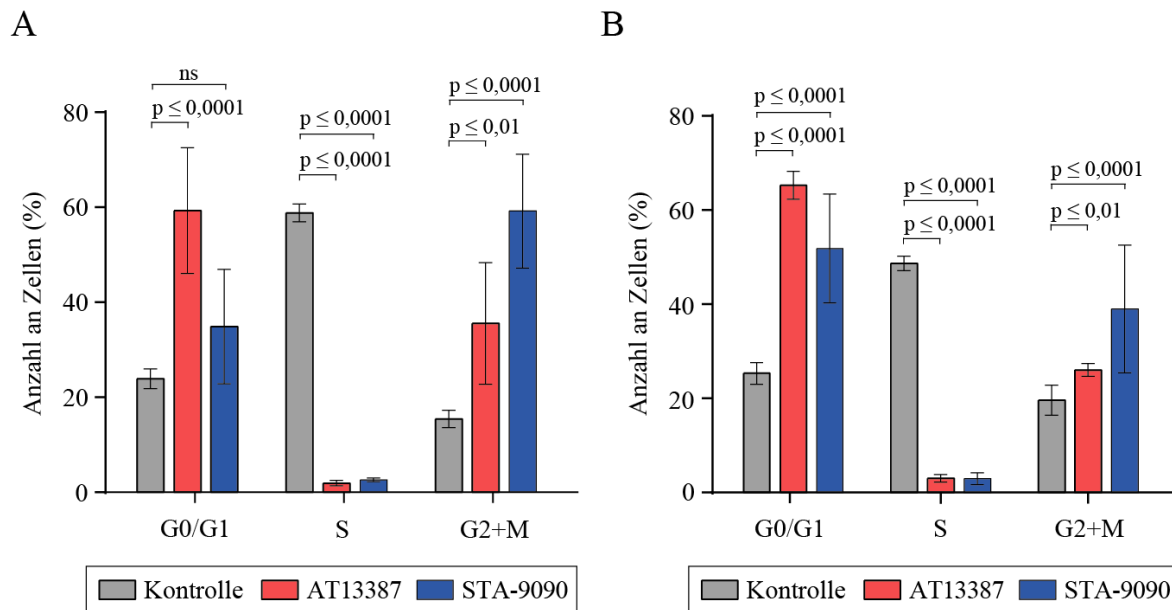


Abbildung 31: Zellzyklusanalyse in Burkitt-Lymphom-Zellen nach HSP90-Inhibition

Zellzyklusanalyse in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) nach Inkubation mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) oder STA-9090 (100 nM) für 24 h. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Angabe der Zellzahl in den jeweiligen Zellzyklusphasen: G0/G1, S (Synthese) und G2+M (Mitose). Die Auswertung der Messung erfolgte mit FlowJo, die Darstellung mit der Software GraphPad Prism. Die Signifikanz der Effekte wurde mittels t-Test überprüft und signifikante Effekte durch den jeweiligen p-Wert beschriftet. Effekte, die nicht signifikant waren sind mit „ns“ gekennzeichnet. (n = 3) Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Auch Zellen, die sich in einem Zustand der Seneszenz befinden zeigen einen Phänotyp, der mit einem Zellzyklusarrest assoziiert ist. Diese Zellen gehen nicht in Apoptose und sind weiterhin viabel.²⁶⁰ Um auszuschließen, dass die Burkitt-Lymphom-Zellen nach HSP90-Inhibition seneszent werden und stattdessen in Apoptose gehen, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Hierfür wurden mehrere Burkitt-Lymphom-Zelllinien mit AT13387 und STA-9090 titriert und der Effekt auf die Apoptose der Zellen nach einem Zeitraum von 7 Tagen bestimmt.

In Abbildung 32 ist die Auswertung des Annexin-basierten Apoptose-Assays zu sehen, bei der die viablen Zellen nach Inhibitorbehandlung im Verhältnis zu viablen Zellen nach DMSO-Inkubation graphisch aufgetragen wurden. Es zeigte sich, dass sich der Anteil an viablen Zellen in allen verwendeten Zelllinien mit steigender Inhibitorkonzentration auf ein Minimum verringerte und sich der Anteil an Zellen erhöht, die in Apoptose gehen (Annexin-positiv). Der Kurvenverlauf weist somit einen typischen sigmoidalen Charakter auf, wie er bei Titrationen mit Inhibitoren üblich ist. Eine weitere Erhöhung der Inhibitorkonzentration ab einer gewissen Konzentration führt zu keiner weiteren Verstärkung des apoptotischen Effekts.

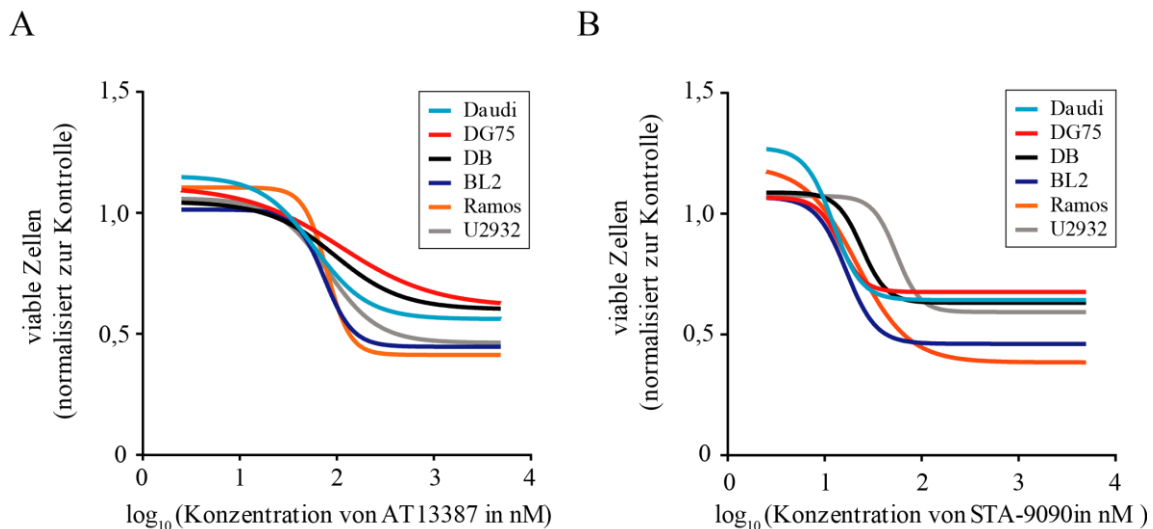


Abbildung 32: HSP90-Inhibition führt zur Apoptose in Tumorzellen

Apoptose-Assay mit dem angegebenen Panel an Tumorzelllinien, die 7 Tage mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (A) oder STA-9090 (B) titriert wurden. Die Abbildungen zeigen den relativen Anteil an Annexin- und 7-AAD-negativen (viablen) Zellen nach jeweiliger HSP90-Inhibition im Vergleich zu Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden (Kontrolle). Der Apoptose-Assay wurde mit FlowJo ausgewertet, die Regressionskurven („*nonlinear regression*“) aus den Werten der jeweiligen Inhibitorkonzentrationen pro Zelllinie mit der Software GraphPad Prism dargestellt. (n = 3)

4.3 HSP90-Inhibitoren zeigen eine erhöhte Effektivität in Tumorzellen

Wie oben gezeigt, führt die Inhibition von HSP90 zu einer Apoptose der Tumorzellen. Im Folgenden sollte geklärt werden, inwieweit diese Effekte auch in gesunden B-Zellen aus humanen Spendern auftreten. Dies würde Rückschlüsse auf die Verwendbarkeit der Inhibitoren am Patienten liefern, bei denen eine Apoptose gesunder B-Zellen kontraproduktiv wäre.

Aus diesem Grund wurden B-Zellen aus zwei verschiedenen humanen Spendern verwendet und mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 titriert. Um das Ansprechverhalten der humanen Proben aus den Spendern mit denen der Tumorzelllinien zu vergleichen, wurden die jeweiligen IC₅₀-Werte aus durchgeführten Annexin-basierten Apoptose-Assays mit der Software GraphPad Prism bestimmt und miteinander verglichen (siehe Abbildung 33, nächste Seite). Dabei zeigt sich, dass die IC₅₀-Werte der jeweiligen Inhibitoren in den Tumorzellen im Vergleich zu den B-Zellen etwa zwei \log_{10} -Stufen niedriger sind. So liegen diese bei den

Tumorzellen im Durchschnitt bei 82,69 nM (für AT13387) bzw. 24,02 nM (für STA-9090), wohingegen sie für die B-Zellen bei 9333 nM bzw. 1985 nM liegen.

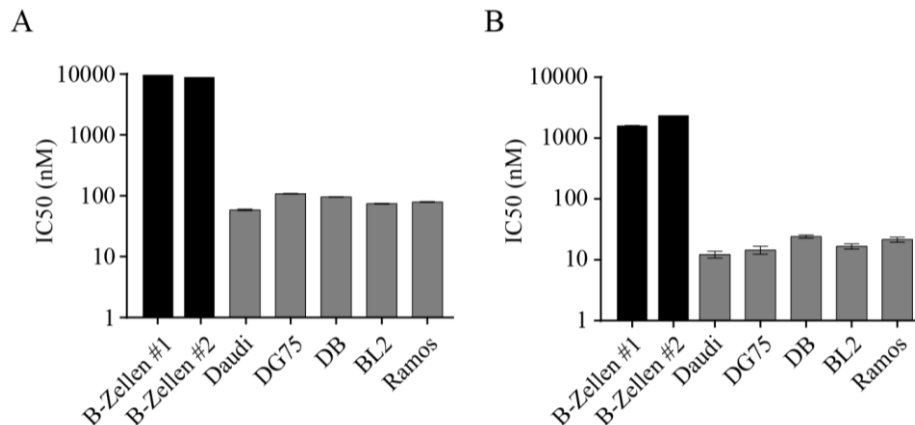


Abbildung 33: Effektivität von HSP90-Inhibitoren

Vergleich der IC₅₀-Werte der HSP90-Inhibitoren AT13387 (A) und STA-9090 (B) im angegebenen Panel von Tumorzellen und B-Zellen (B-Zellen #1 und B-Zellen #2). Die Berechnung der IC₅₀-Werte der Tumorzellen erfolgte aus dem durchgeführten Apoptose-Assay, dargestellt in Abbildung 32. Die IC₅₀-Werte der B-Zellen wurden aus Rohwerten von Apoptose-Assays berechnet, die von PD Dr. Thomas Oellerich zur Verfügung gestellt wurden. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism. (n = 3) Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

4.4 HSP90-Inhibition führt zu einem Verlust des BZR-Signals

4.4.1 HSP90-Inhibition führt zum Verlust von phosphorylierten Proteinen

Wie in Abbildung 32 gezeigt, gehen Zellen, die mit HSP90-Inhibitoren behandelt werden in Apoptose. Um diesen Effekt auf mechanistischer und molekularer Ebene untersuchen zu können, wurden die Inhibitoren zunächst titriert um die jeweilige Arbeitskonzentration zu bestimmen. Hierfür wurden DG75-Zellen für jeweils 24 h mit den Inhibitoren inkubiert und die Proteinexpression von AKT, einem von Basso und Kollegen²⁶¹ bereits beschriebenen Klientprotein von HSP90, untersucht (siehe Abbildung 34).

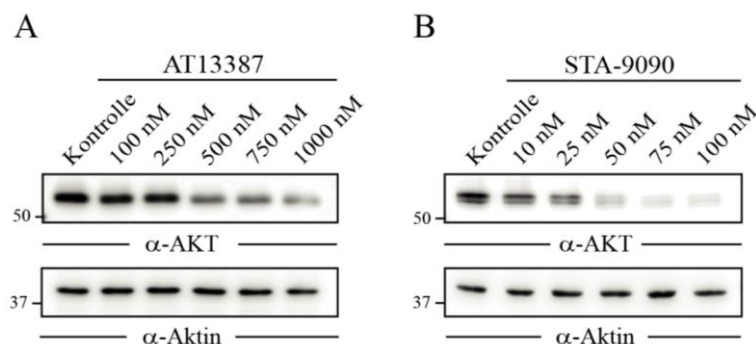


Abbildung 34: Effekt der HSP90-Inhibitoren auf die Proteinexpression von AKT

Immunologische Detektion von AKT in DG75-Zellen, die mit den angegebenen Konzentrationen der HSP90-Inhibitoren AT13387 (A) und STA-9090 (B) für 24 h behandelt wurden. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienen als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Beide Inhibitoren zeigten einen dosisabhängigen Effekt und reduzierten die Expression von AKT in DG75-Zellen. Die für die folgenden Experimente verwendete Arbeitskonzentration wurde als die geringste Konzentration definiert, bei der die maximale Reduktion von AKT vorhanden ist. Für STA-9090 wurde daher ein Wert von 100 nM und für AT13387 ein Wert von 500 nM festgelegt.

Da Burkitt-Lymphom-Zellen von einem tonischen BZR-Signalweg abhängig sind und HSP90 eine Rolle bei der Regulation von Signalwegen spielt, wurde zunächst untersucht, ob die Inhibition von HSP90 auch Auswirkungen auf den BZR-Signalweg hat.

Aus diesem Grund wurde mit den nun definierten Arbeitskonzentrationen der HSP90-Inhibitoren die Signaltransduktion des BZR-Signalweges untersucht, die überwiegend aus hintereinander geschalteten Phosphorylierungskaskaden besteht. Hierfür wurde der BZR-Signalweg in DG75- und Daudi-Zellen, die 24 h mit HSP90-Inhibitoren inkubiert wurden, durch Zugabe eines α -IgM-Antikörpers für 5 min aktiviert und der Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen untersucht. In Abbildung 35 konnte in beiden Zelllinien eine Erhöhung der phosphorylierten Proteine in den mit DMSO inkubierten Zellen (Kontrollzellen) nach Stimulation des BZR nachgewiesen werden. Diese wurde nach Vorinkubation mit beiden HSP90-Inhibitoren deutlich reduziert. Zudem war auch eine Verminderung der Phosphorylierung auf basaler Ebene zu erkennen.

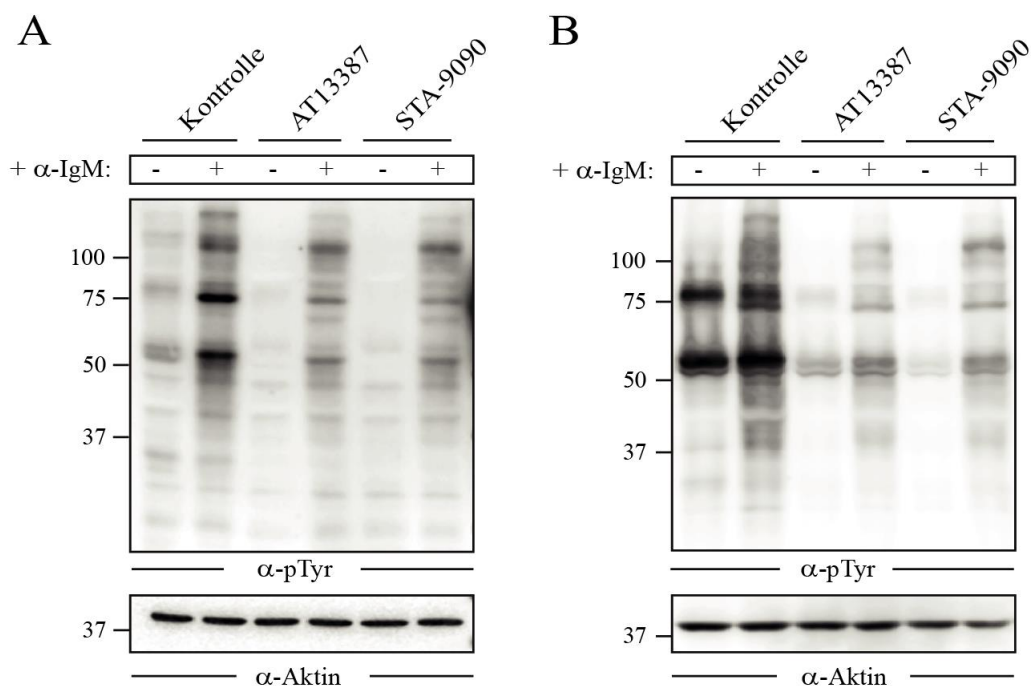


Abbildung 35: Effekte der HSP90-Inhibitoren auf die Phosphorylierung von Proteinen

Immunologische Detektion von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) bzw. STA-9090 (100 nM) für 24 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZR mit einem Anti-IgM-Antikörper (10 μ g/ml) für 5 min. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZR. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Durch massenspektrometrische Untersuchungen ist es möglich, die nach HSP90-Inhibition regulierten Phosphorylierungen eindeutig dem jeweiligen Protein und der jeweilig phosphorylierten Aminosäure zuzuordnen. Diese Methode wurde zunächst angewandt, um zelltypspezifische Effekte der HSP90-Inhibitoren in DG75- und Daudi-Zellen auszuschließen. Hierfür wurden DG75- und Daudi-Zellen nach vorheriger SILAC-Markierung mit den HSP90-Inhibitoren behandelt und die Tyrosin-regulierten Phosphorylierungsstellen nach Anreicherung durch Immunpräzipitation (pY-IP) massenspektrometrisch untersucht. Eine schematische Darstellung der SILAC-Markierung und der Probenaufarbeitung ist in Abbildung 36 dargestellt.

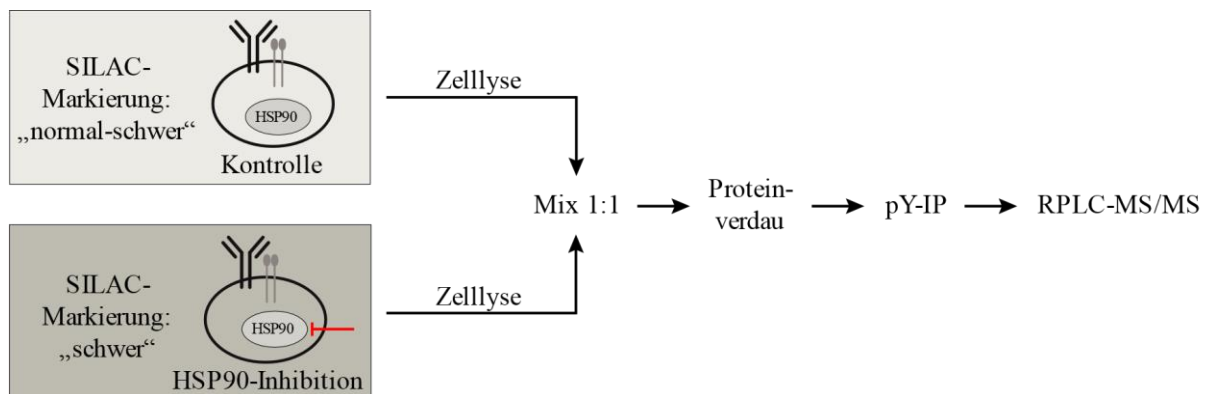


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Probenherstellung und -prozessierung für die pYome-Analyse
Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Abbildung 37 (siehe nächste Seite) zeigt die graphische Auftragung der einzelnen Tyrosin-phosphorylierten Proteine, die in beiden Zelllinien identifiziert wurden. Die einzelnen Messwerte liegen nahe der eingezeichneten Hilfslinie, die eine 100 %ige Korrelation ($r = 1$) der Werte widerspiegeln würde. Für die Behandlung von DG75- und Daudi-Zellen mit AT13387 liegt, basierend auf der Rangkorrelation nach Spearman, eine Korrelation von $r = 0,858$ und für STA-9090 eine Korrelation von $r = 0,787$ vor.

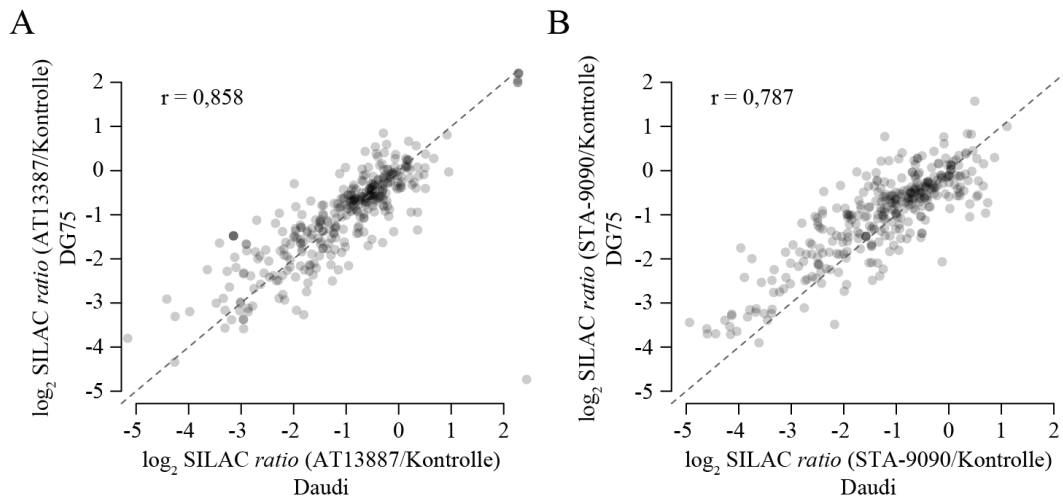


Abbildung 37: Korrelation der Effekte nach HSP90-Inhibition auf die Regulation Tyrosin-phosphorylierter Proteine

Darstellung angereicherter Tyrosin-phosphorylierter Proteine (pYome) 24 h nach Inkubation mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (A) und STA-9090 (B) in DG75- bzw. Daudi-Zellen. Die jeweilig berechneten Rangkorrelationskoeffizienten r (nach Spearman) sind angegeben. Die eingezeichnete Linie beschreibt eine Korrelation von $r = 1$. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

In Abbildung 38 sind die Tyrosin-regulierten Phosphoproteine nach Behandlung mit den beiden Inhibitoren pro Zelllinie dargestellt.

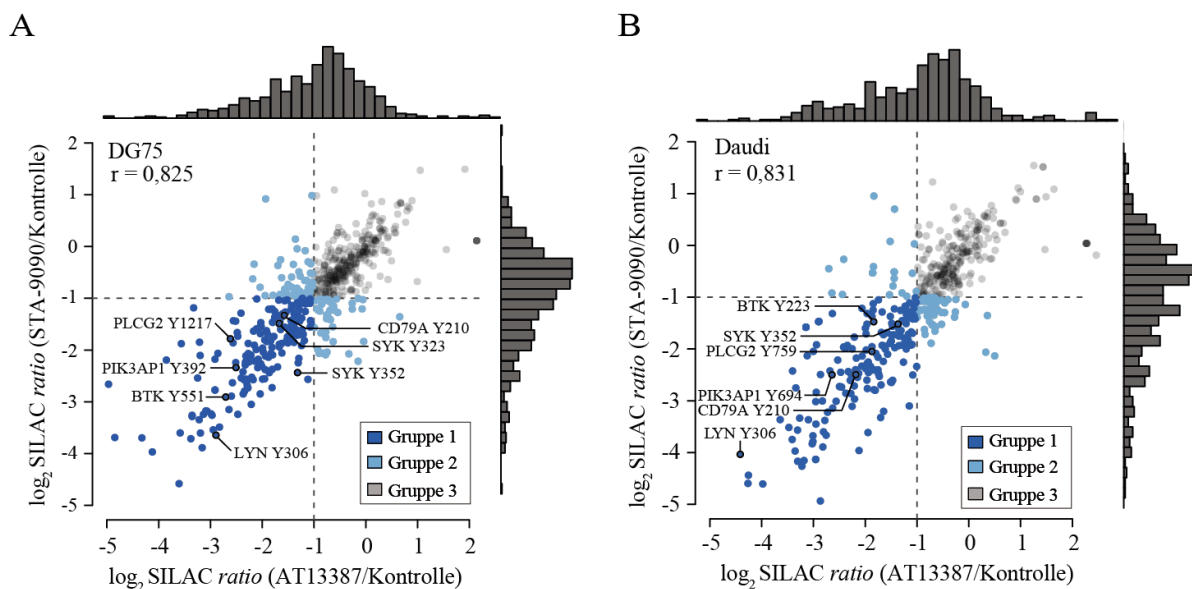


Abbildung 38: Analyse Tyrosin-phosphorylierter Proteine nach HSP90-Inhibition

Scatter-Plots von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die für 24 h mit HSP90-Inhibitoren (500 nM AT13387 bzw. 100 nM STA-9090) behandelt wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden. Die Phosphoproteine, deren Phosphorylierung im Zuge der Inhibitorbehandlung um den Faktor 2 abnahmen (angedeutet durch gestrichelte Hilfslinien), wurden blau markiert. Eine weitere Eingruppierung in Gruppen (Gruppe 1 - 3) erfolgte nach der Anzahl der HSP90-Inhibitoren, die die jeweilige Regulation hervorriefen. Einzelne Phosphoproteine mit der jeweilig regulierten Phosphorylierungsstelle sind dargestellt, ebenso die jeweiligen Rangkorrelationen r nach Spearman und die Verteilung der identifizierten Phosphoproteine. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Es zeigt sich, dass beide Inhibitoren unabhängig voneinander ähnliche Effekte auf die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen in der jeweiligen Zelllinie hervorrufen. Der Rangkorrelationskoeffizient r nach Spearman lag in den DG75-Zellen bei $r = 0,825$ und in den Daudi-Zellen bei $r = 0,831$. Zur näheren Interpretation der Daten erfolgte eine Einteilung der regulierten Phosphoproteine in verschiedene Cluster (in Abbildung 38 farblich gekennzeichnet). In Cluster 1 (dunkelblau) befinden sich Proteine, die mit beiden Inhibitoren eine signifikante Reduktion der betreffenden Phosphorylierungsstelle aufweisen. In Cluster 2 (hellblau) befinden sich Proteine, die durch jeweils nur einen Inhibitor signifikant reguliert sind. Proteine, die dem Cluster 3 (grau) zugehörig sind, weisen dagegen keine signifikante Regulation auf. Eine genauere Analyse der Phosphoproteine von Cluster 3 zeigt, dass darin wichtige Signalproteine des BZR-Signalwegss wie zum Beispiel SYK, LYN und BTK zu finden sind.

Zur Validierung der massenspektrometrischen Analysen wurden DG75- und Daudi-Zellen mit HSP90-Inhibitoren für 24 h vorinkubiert und anschließend mit anti-IgM-Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) für 5 min stimuliert. Per Western Blot wurde die Phosphorylierung von BTK an Tyrosin 223 (Y223) untersucht (siehe Abbildung 39). Laut der massenspektrometrischen Analyse ist diese herunterreguliert. Es zeigt sich, dass eine Stimulation des BZR in den Kontrollzellen mit einem Anstieg der Phosphorylierung von BTK einhergeht. Dies ist in den mit HSP90-Inhibitoren vorinkubierten Zellen nicht zu sehen. Eine Aktivierung des BZR-Signalwegs unterbleibt. Erkennbar ist weiterhin, dass eine Reduktion von BTK nach HSP90-Inhibition auf basalem Level vorliegt. In den Kontrollzellen ist im Vergleich zu den mit HSP90-behandelten Zellen deutlich mehr BTK im Lysat nachweisbar.

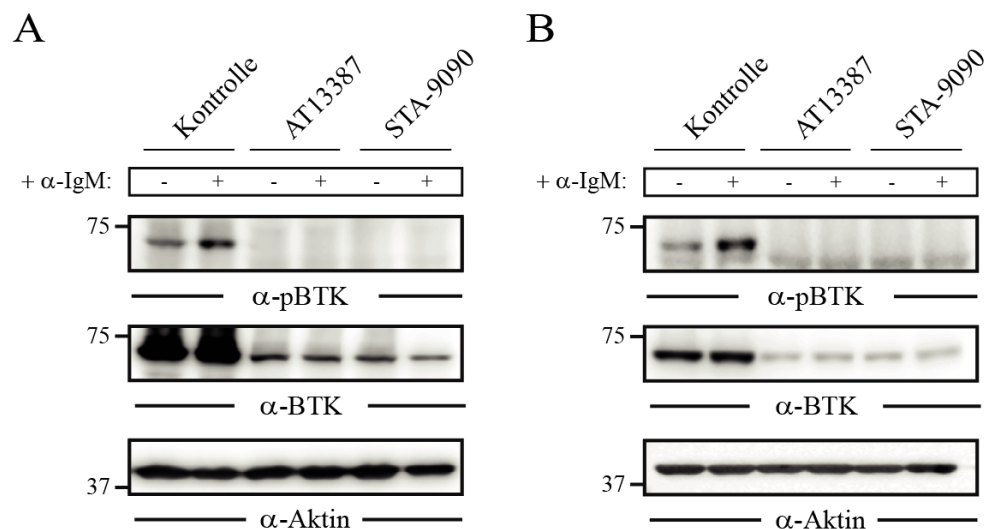


Abbildung 39: HSP90-Inhibition führt zu einem Verlust von BTK und dessen aktivierter Form pBTK
Immunologische Detektion von phosphoryliertem BTK (pBTK) an Tyrosin 223 (Y223) und BTK in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) bzw. STA-9090 (100 nM) für 24 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZR mit einem Anti-IgM-Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) für 5 min. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZR. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

4.4.2 Inhibition von HSP90 hemmt den tonischen BZR-Signalweg und dessen Aktivierung

Die Signalwegsanalyse der Phosphotyrosin-regulierten Proteine nach HSP90-Inhibition aus Abbildung 38 identifizierte, neben mit dem Immunsystem eng verwandten Signalwegen, den BZR-Signalweg (siehe Abbildung 40).

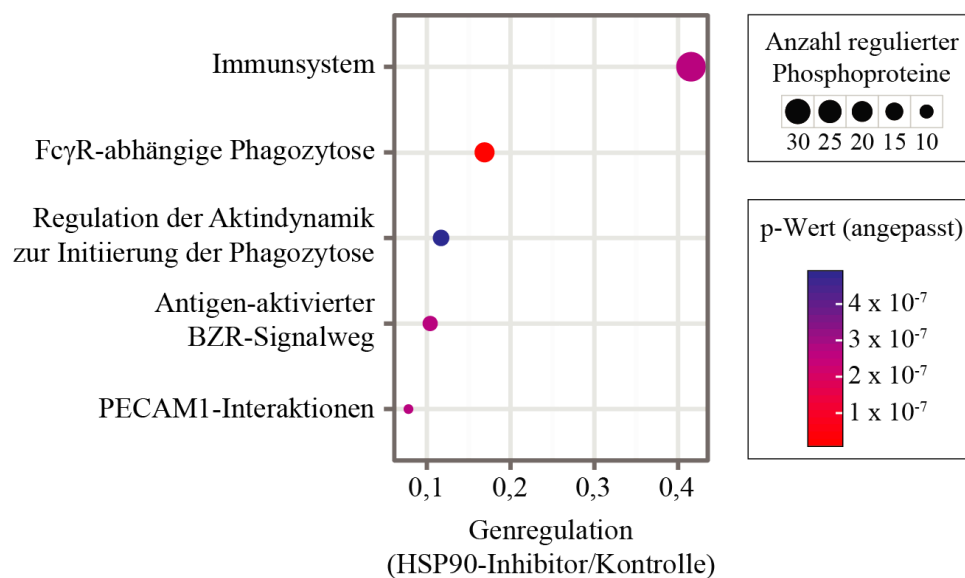


Abbildung 40: Signalwegsanalyse von regulierten Phosphoproteinen nach HSP90-Inhibition

Signalwegsanalyse von mindestens zweifach regulierten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in DG75-Zellen nach Inhibition von HSP90 für 24 h. Die Analyse wurde mit *R/Bioconductor package ReactomePA* (Version 1.16.2) durchgeführt.²⁶² Die p-Werte wurden angepasst nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur für multiple Vergleiche. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Um im nächsten Schritt die Effekte der HSP90-Inhibition auf Proteinebene zu analysieren, wurden proteomische Analysen mit DG75- und Daudi-Zellen nach HSP90-Inhibition durchgeführt, bei der aufgrund der oben genannten Daten vor allem die Expression der Hauptkinasen des BZR-Signalweges (SYK, BTK und LYN) näher untersucht wurden.

Hierfür wurden Daten verwendet, die im Zuge der phosphoproteomischen Analyse aus Lysaten von SILAC-markierten DG75- und Daudi-Zellen gewonnen wurden, die für 24 h mit den HSP90-Inhibitoren (500 nM AT13387 bzw. 100 nM STA-9090) inkubiert wurden.

In Abbildung 41 (siehe nächste Seite) ist zu erkennen, dass die Inhibition von HSP90 mit dem jeweiligen Inhibitor eine Reduktion der Expression von SYK, BTK und LYN zur Folge hat. Als Vergleich ist der Durchschnitt (avg) aller regulierten Proteine angegeben.

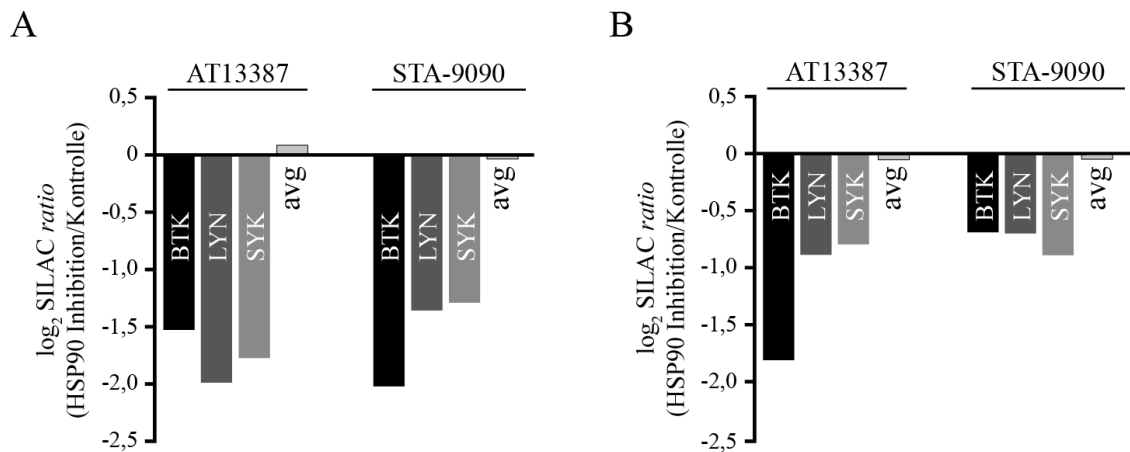


Abbildung 41: Analyse des Proteoms nach HSP90-Inhibition

Analyse der Proteinexpression der Kinasen BTK, LYN und SYK und die durchschnittliche Regulation des Gesamtproteoms (avg) nach HSP90-Inhibition in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) mit 500 nM AT13387 bzw. 100 nM STA-9090 für 24 h. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

In Abbildung 42 sind Western Blots abgebildet, die die massenspektrometrischen Daten validieren. Hierfür wurden DG75- bzw. Daudi-Zellen mit jeweils zwei unterschiedlichen Dosen an Inhibitor für 24 h bzw. 16 h inkubiert. Die Western Blots zeigen zu diesen Zeitpunkten eine dosisabhängige Reduktion der Kinasen SYK, BTK und LYN.

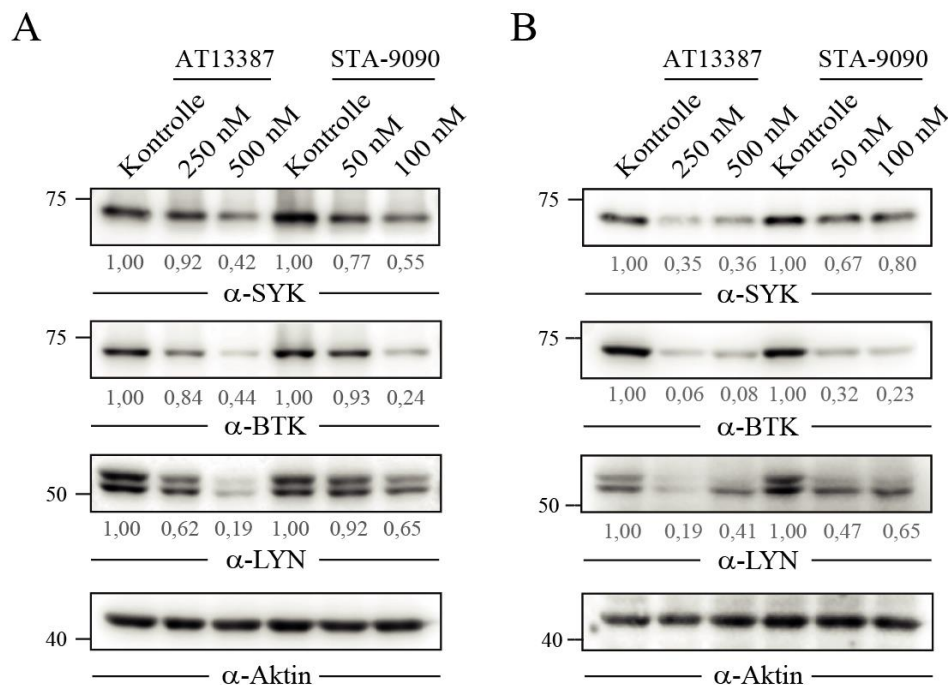


Abbildung 42: HSP90-Inhibition führt zu einem Verlust der Kinasen SYK, BTK und LYN

Immunologische Detektion von phosphoryliertem SYK, BTK und LYN in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) bzw. STA-9090 (100 nM) für 24 h bzw. 16 h inkubiert wurden. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Die Normalisierung erfolgte auf die jeweilige Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Um auszuschließen, dass die Reduktion der Kinasen Folge einer Apoptosereaktion der Zellen auf die HSP90-Inhibition ist, wurden Apoptose-Assays zu den Zeitpunkten durchgeführt, bei der die Reduktion der Kinasen bereits nachweisbar war. Für Daudi-Zellen wurde so, basierend auf den Ergebnissen aus Abbildung 42, eine Inkubationsdauer von 16 h, für DG75-Zellen eine Inkubationsdauer von 24 h festgelegt. Die Ergebnisse der korrespondierenden Apoptose-Assays zu den jeweiligen Zeitpunkten sind in Abbildung 43 abgebildet.

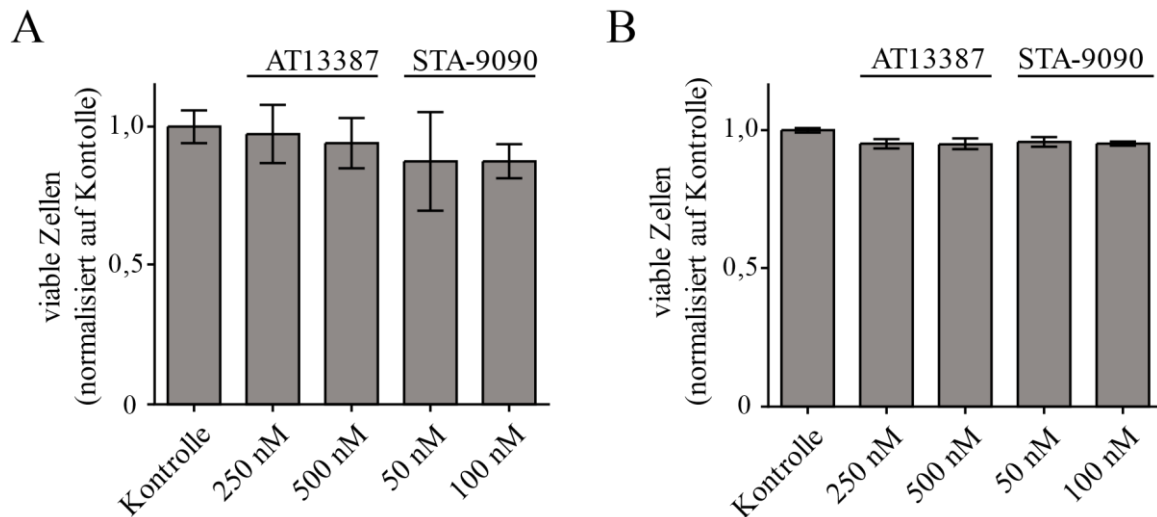


Abbildung 43: Apoptose-Assay in Burkitt-Lymphom-Zellen nach Inhibition von HSP90

Apoptose-Assay mit DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die 24 h (für DG75-Zellen) und 16 h (für Daudi-Zellen) mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 titriert wurden. Die Abbildungen zeigen den relativen Anteil Annexin- und 7-AAD-negativer (viabler) Zellen nach jeweiliger HSP90-Inhibition im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit DMSO inkubiert wurden. Der Apoptose-Assay wurde mit FlowJo ausgewertet, die Mittelwerte inklusive der Standardabweichung mit der Software GraphPad Prism berechnet und dargestellt. (n = 3)

Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Es zeigt sich, dass beide Burkitt-Lymphom-Zelllinien keine signifikant erhöhte Apoptoserate aufweisen. Da die Western Blots (siehe Abbildung 42) zu diesen Zeitpunkten eine dosisabhängige Reduktion der drei untersuchten Kinasen SYK, BTK und LYN zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass apoptotische Effekte in den Zellen in Folge einer reduzierten Proteinexpression der Kinasen auftreten.

4.4.3 Die inhibitorischen Effekte nach HSP90-Inhibition auf den tonischen BZR-Signalweg werden vorwiegend durch SYK vermittelt

Wie oben beschrieben, gehen Zellen nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren in Apoptose. Welcher Effekt hierfür aber verantwortlich gemacht werden kann, wurde bislang noch nicht identifiziert. Im Folgenden sollte dies näher untersucht werden.

Hierfür wurden die einzelnen BZR-Signalwegskomponenten hinsichtlich der Effekte nach HSP90-Inhibition untersucht und deren Auswirkung auf die Apoptose eingestuft.

Zunächst wurde die Expression des BZRs auf der Zelloberfläche nach HSP90-Inhibition analysiert. So könnte die Behandlung mit dem HSP90-Inhibitoren zu einer reduzierten Oberflächenexpression des Rezeptors führen und so die Apoptose der Zellen mit sich bringen.

Um dies zu untersuchen, wurden DG75- und Daudi-Zellen für 24 h bzw. 48 h mit dem HSP90-Inhibitor AT13387 bzw. STA-9090 behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgte nach einem Fc-Rezeptorblock die Oberflächenrezeptorfärbung mit jeweils 1×10^6 Zellen der einzelnen Konditionen und anschließende Analyse der IgM-Färbung am Durchflusszytometer.

In Abbildung 44 (siehe nächste Seite) sind die Histogramme der Färbungen zu sehen, bei der die Expressionsstärke des BZRs gegen die Anzahl an gemessenen Zellen aufgetragen ist. Es zeigt sich, dass Zellen, die 24 h bzw. 48 h mit dem HSP90-Inhibitor STA-9090 oder AT13387 inkubiert wurden, keine Reduktion der BZR-Expression aufweisen. In der Tat ist sogar eine leichte Erhöhung der Expression zu erkennen, die in den Daudi-Zellen nach einer Inkubation von 48 h im Vergleich nach 24 h nochmal leicht ansteigt.

Wie in Abbildung 42 gezeigt, wird auch die Expression der Kinase LYN nach HSP90-Inhibition reduziert. Ob der Verlust der Kinase zu einer erhöhten Apoptoserate der Zellen führt und somit die Effekte der HSP90-Inhibition erklärt werden können, wurde durch einen kompetitiven Assay mit DG75-Zellen adressiert, die einen induzierten Knockdown von LYN aufweisen.

Mittels Lentiviren wurden hierfür DG75-Zellen mit dem induzierbaren Expressionsplasmid LT3-GECIR transduziert, bei dem drei unterschiedliche shRNA-Sequenzen, gerichtet gegen die mRNA der Kinase LYN bzw. zwei unterschiedliche Kontrollsequenzen („NTC“ bzw. „GL2“) inkloniert wurden.

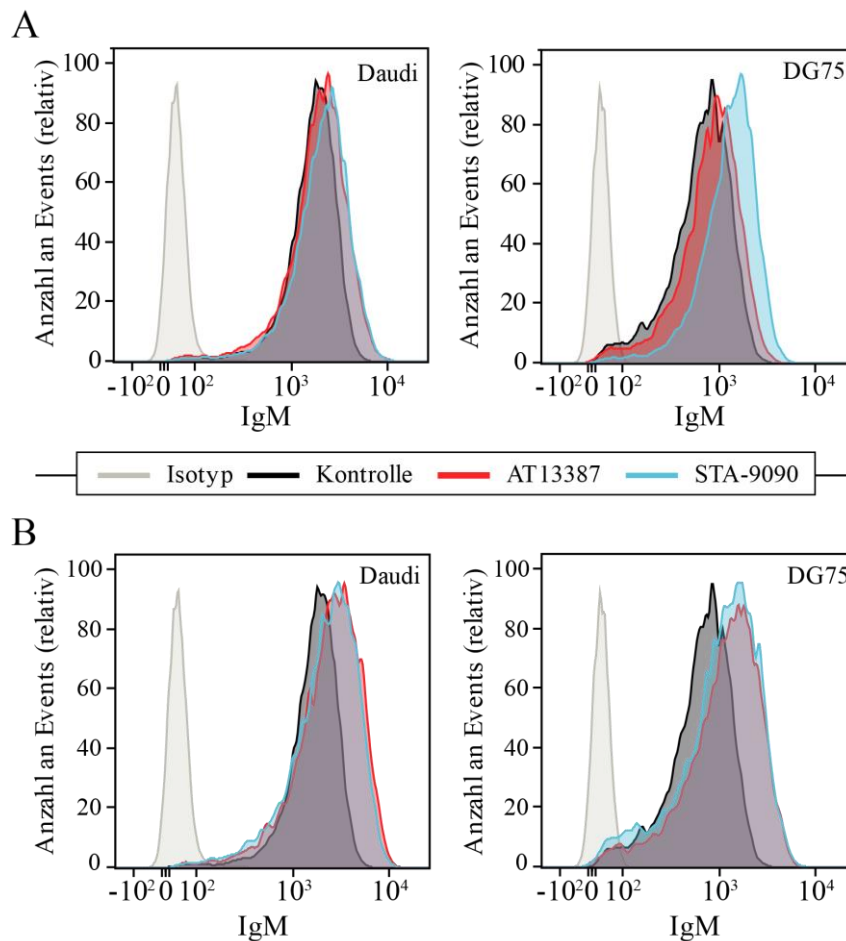


Abbildung 44: BZR-Expression nach HSP90-Inhibition

Analyse der IgM-Expression in DG75- (rechts) und Daudi-Zellen (links) nach Inhibition von HSP90 mit 500 nM AT13387 bzw. 100 nM STA-9090 für 24 h (A) oder 48 h (B) mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit einem APC-gekoppelten Anti-IgM-Antikörper gefärbt. Als Färbekontrolle wurde eine APC-gekoppelte Isotypkontrolle verwendet. Die Messergebnisse wurden mit FlowJo ausgewertet, die Anzahl an Events normalisiert dargestellt („normalized to mode“).

Nach Anreicherung der erfolgreich transduzierten Zellen über den konstitutiv exprimierenden Fluorophor mCherry am Durchflusszytometer erfolgte 72 h nach Induktion des Knockdowns (3 μ g/ml Doxycyclin) ein Western Blot zur Überprüfung der Funktionalität der shRNA-Sequenzen (siehe Abbildung 45, nächste Seite). Alle drei verwendeten Sequenzen zeigten eine Reduktion der Kinase LYN nach 72 h. Als Vergleich wurden auch Lysate von nicht-induzierten Zellen aufgetragen, bei denen weder die Expression von GFP, das nur nach Induktion exprimiert wird, noch der LYN-Knockdown nachweisbar war.

Nach Bestätigung der Funktionalität aller verwendeter Sequenzen wurde ein kompetitiver Assay mit DG75-Zellen durchgeführt, bei dem über einen Zeitraum von einer Woche nach Induktion der Anteil an mCherry-positiven Zellen über Messungen am Durchflusszytometer einer 1 : 1 Mischung aus Wildtyp und transduzierter Zellen bestimmt wurde.

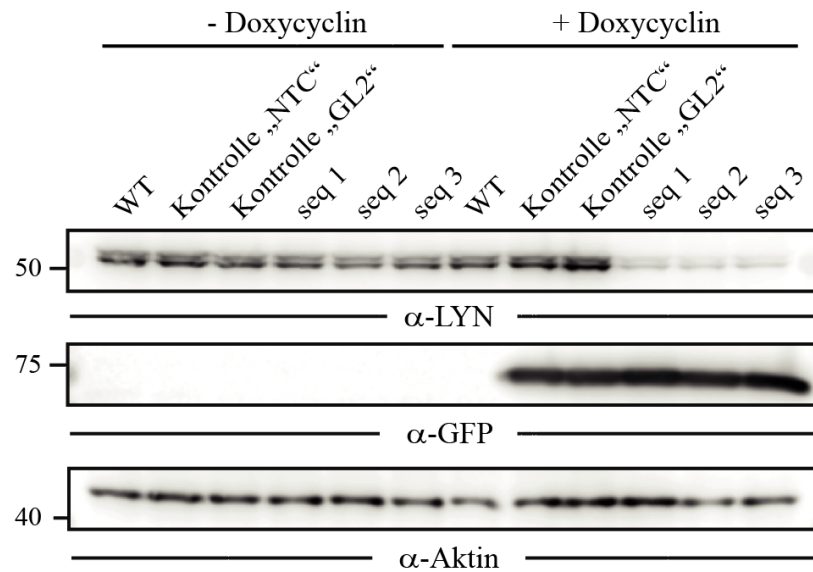


Abbildung 45: Knockdown der Kinase LYN in DG75-Zellen

Immunologische Detektion von LYN in DG75-Zellen vor und 72 h nach Induktion der Expression der Kontroll-shRNAs (Kontrollsequenzen „NTC“ und „GL2“) oder drei CD79a-shRNAs (seq 1 - 3). Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der jeweiligen Zellen integriert wurde. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte mit 3 µg/ml Doxycyclin. GFP diente als Kontrolle der Induktion der jeweiligen Vektoren, Aktin als Beladungskontrolle. Als Vergleich der LYN-Expression wurde auch Lysate von nicht-transduzierten DG75-Zellen (WT) aufgetragen. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

In Abbildung 46 ist der Verlauf der mCherry-positiven Zellen der jeweiligen shRNA-Sequenz gegen LYN normalisiert auf die Kontrollsequenz „GL2“ zu sehen. Es zeigt sich, der Knockdown der Kinase LYN keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen aufweist, die mit der nach Inhibition von HSP90 vergleichbar wäre (siehe Apoptose-Assay, Abbildung 32).

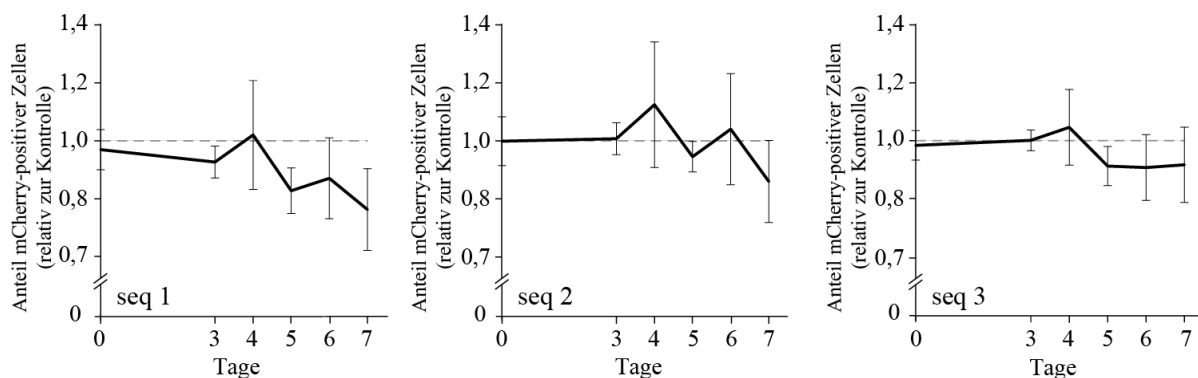


Abbildung 46: Zellproliferation nach Knockdown der Kinase LYN

Kompetitiver Proliferations-Assay mit transduzierten DG75-Zellen aus Abbildung 45. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte an Tag 0 und über die Gesamtdauer des Experimentes (7 Tage) mit 3 µg/ml Doxycyclin. Der Anteil an transduzierten Zellen (mCherry-positive Zellen) an der Gesamtpopulation wurde ab Tag 3 täglich mittels Durchflusszytometrie bestimmt und auf den jeweiligen Anteil der Zellen der Kontrolle (shRNA-Kontrollsequenz „GL2“) am jeweiligen Messtag normalisiert. Die Kontrolle „GL2“ wurde dabei auf 1 gesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte inklusive berechneter Standardabweichung dar. (n = 3)

Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Auch die Kinase BTK war nach HSP90-Inhibition in beiden Burkitt-Lymphom-Zelllinien (DG75 und Daudi) reduziert (siehe Abbildung 42). Es stellte sich daher die Frage, ob die Viabilität des Burkitt Lymphoms von BTK abhängig ist. Dies wurde im Folgenden geklärt.

Erste Hinweise, dass BTK für Burkitt-Lymphom-Zellen nicht essentiell ist, konnte aus noch unpublizierten Daten eines von James Phelan durchgeführten CRISPR-Screens in Burkitt-Lymphom-Zelllinien gezogen werden. Des Weiteren wurden die Daten des Inhibitorscreens (siehe Abbildung 27) bezüglich der Effekte des HSP90-Inhibitors AT13387 und des BTK-Inhibitors PCI-32765 (Ibrutinib) auf die Viabilität der Zellen graphisch in Abbildung 47 dargestellt. Beiden Inhibitoren zeigen demnach einen Effekt auf die Viabilität der Zellen, aber auch einen deutlichen Unterschied in ihren IC₅₀-Werten. So liegt der IC₅₀-Wert von AT13387 bei $c = 34,61$ nM und damit etwa drei log₁₀-Stufen niedriger als der IC₅₀-Wert von Ibrutinib, die bei einer Konzentration von $c = 14,92$ μ M liegt.

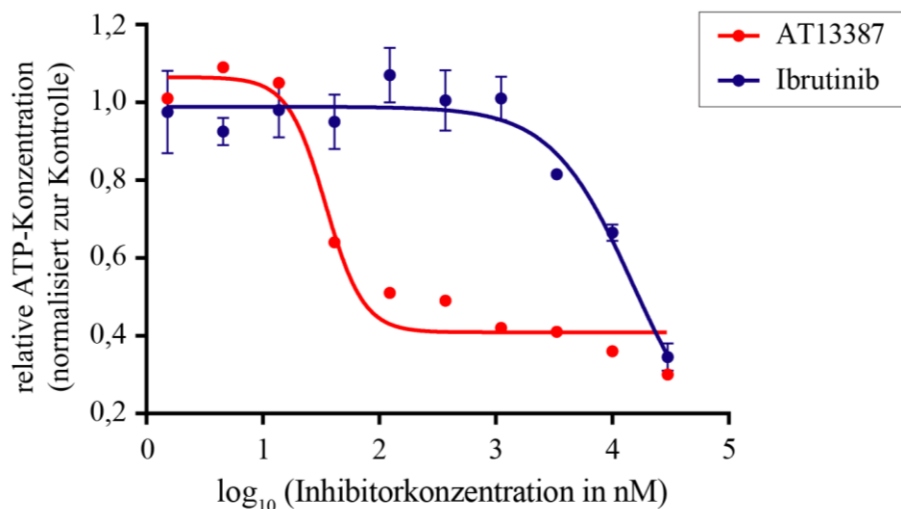


Abbildung 47: Viabilität von Zellen nach Ibrutinib-Behandlung

Bestimmung der ATP-Konzentration von DG75-Zellen als Maß für die Viabilität der Zellen nach Inkubation für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen von Ibrutinib. Die Normalisierung der Werte erfolgte auf Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden (Kontrolle). Die Werte der Kontrolle wurden auf den Wert 1 gesetzt. Die Rohdaten stammen aus einem Inhibitorscreen (siehe Abbildung 27), der in der AG Zenz (Heidelberg) durchgeführt wurde ($n = 2$ für Ibrutinib, $n = 1$ für AT13387). Die jeweiligen ATP-Konzentrationen nach Ibrutinibbehandlung sind als Mittelwerte inklusive der Standardabweichung angegeben. Die graphische Auftragung inklusive der Darstellung einer Regressionskurve („*nonlinear regression*“) erfolgte mit GraphPad Prism.

In Ibrutinib-sensitiven humanen CLL-Zellen (*ex vivo*) sind IC₅₀-Werte von etwa 1 - 10 nM beschrieben worden, die mit Hilfe von Proliferations-Assays bestimmt wurden.²⁶³ Zudem konnten Advani und Kollegen²⁶⁴ zeigen, dass die Serumkonzentration von Ibrutinib im Patienten nach Gabe einer gebräuchlichen Dosis an Ibrutinib (560 mg) auf einen Maximalwert von umgerechnet rund 0,4 μ M 2 h nach Verabreichung des Wirkstoffes steigt. Da der IC₅₀-Wert von Ibrutinib in dem durchgeführten Inhibitor-Assay eine Konzentration aufweist, die fast 40x größer ist als das Maximum der Serumkonzentration im Patienten nach Gabe von

Ibrutinib, sollte Ibrutinib näher hinsichtlich seiner Wirkkonzentration in Burkitt-Lymphom-Zellen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden DG75-Zellen mit Ibrutinib titriert und der Effekt des Inhibitors auf die Tyrosinphosphorylierung von BTK an Position 223 (Tyr223) und der Serinphosphorylierung von AKT an Position 473 (Ser473) untersucht.

Hierfür wurden 1×10^7 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ibrutinib für 1 h behandelt und nach Lyse der Zellen die jeweilige Proteinmenge an AKT bzw. pAKT (S473) und BTK bzw. pBTK (Tyr223) bestimmt (siehe Abbildung 48).

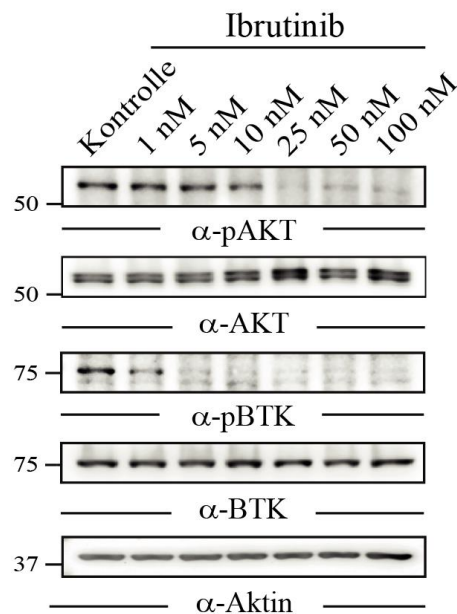


Abbildung 48: Effekte des BTK-Inhibitors Ibrutinib in DG75-Zellen

Immunologische Detektion von phosphoryliertem BTK (pBTK) an Tyrosin 223 und phosphoryliertem AKT (pAKT) an Serin 473 in DG75-Zellen, die mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib für 1 h inkubiert wurden. Zur Beurteilung der Phosphorylierung wurde jeweils auch das Gesamtprotein an BTK und AKT detektiert. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Es zeigt sich, dass Ibrutinib bereits bei einer Konzentration von $c \geq 5$ nM einen Maximaleffekt auf die Reduzierung der Phosphorylierung von BTK selbst und bei Konzentrationen von $c \geq 25$ nM auf die AKT-Phosphorylierung erzielt. Da Ibrutinib die Viabilität in DG75-Zellen aber erst ab Konzentrationen von $c > 1$ μ M beeinflusst (siehe Abbildung 47), können die Effekte nicht über die Inhibition der Kinaseaktivität von BTK, sondern über *off-target*-Effekte erklärt werden.

Zusammenfassend zeigt sich daher, dass die Kinase BTK im Burkitt Lymphom nicht als Zielstruktur geeignet ist.

Um im letzten Schritt zu klären, ob die über HSP90-Inhibitoren beobachteten Effekte über die Kinase SYK vermittelt werden, wurden DG75- und Daudi-Zellen mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 bzw. dem SYK-Inhibitor PRT062607 behandelt und die jeweiligen Effekte auf den BZR-Signalweg verglichen.

Hierfür wurden DG75- und Daudi-Zellen für 8 h oder 24 h mit 250 nM PRT062607 bzw. 24 h mit 500 nM AT13387 oder 100 nM STA-9090 vorbehandelt und nach einer 20-minütigen Inkubation in serumfreiem Medium bei 37 °C mit einem Anti-IgM-Antikörper für 5 min stimuliert, um den BZR-Signalweg zu aktivieren. Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO über die jeweiligen Zeiträume inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden die Lysate per Western Blot hinsichtlich der Expression von Effektoren des BZR-Signalweges untersucht (hier: BLNK, Proteinkinase B und p44/42 MAP-Kinase).

Für die direkte Beurteilung der Aktivität von SYK kann der Phosphorylierungsstatus von BLNK herangezogen werden. In diesem Fall wurde in DG75-Zellen die Tyrosinphosphorylierungsstelle an Position 96 (Tyr96) nach Vorinkubation mit den HSP90-Inhibitoren bzw. dem SYK-Inhibitor im Western Blot untersucht (siehe Abbildung 49). Dabei stellte sich heraus, dass die BLNK-Phosphorylierung an Tyr96 in den mit dem HSP90- bzw. SYK-Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu DMSO-inkubierten Zellen reduziert war. In den mit dem SYK-Inhibitor behandelten Zellen war ein Anstieg der Phosphorylierung von BLNK an Tyr96 nach Aktivierung des BZR-Signalweges nicht mehr nachweisbar.

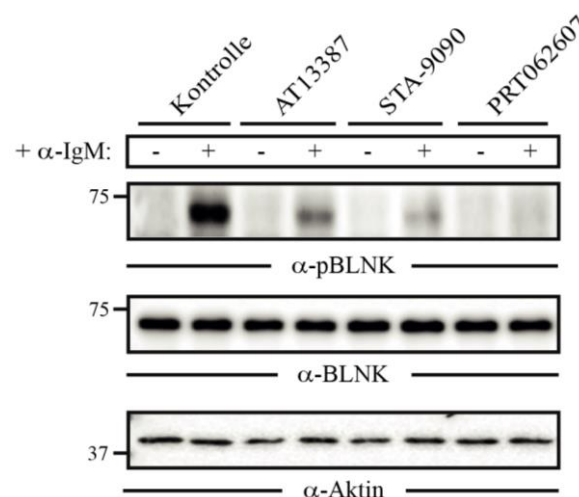


Abbildung 49: Verlust der Phosphorylierung von BLNK nach HSP90- bzw. SYK-Inhibition

Immunologische Detektion von phosphoryliertem BLNK (pBLNK) an Tyrosin 96 in DG75-Zellen, die mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) bzw. STA-9090 (100 nM) oder dem SYK-Inhibitor PRT062607 (250 nM) für 24 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZRs mit einem Anti-IgM-Antikörper (10 µg/ml) für 5 min. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZRs. Zur Beurteilung der Phosphorylierung wurde jeweils auch das Gesamtprotein an BLNK detektiert. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

In Abbildung 50 ist die Expression der Proteinkinase B (AKT) und die korrespondierende aktivierte Form der Kinase (pAKT) in DG75- und Daudi-Zellen dargestellt. In beiden Zelllinien konnte die Aktivierung des BZR-Signalweges durch Zugabe des Anti-IgM-Antikörpers über einen Anstieg von pAKT gezeigt werden. Eine Vorbehandlung mit PRT062607 führte zu einem verminderten Anstieg von pAKT gegenüber den unstimulierten Zellen und damit zu einem reduzierten Vermögen der Zellen die BZR-Transduktion über diesen Signalweg auszulösen. Vergleichbare Effekte sind auch in den mit HSP90-Inhibitoren vorbehandelten Zellen zu erkennen. Hier wird ebenfalls die Aktivierung der BZR-Signaltransduktion durch die Vorbehandlung gehemmt.

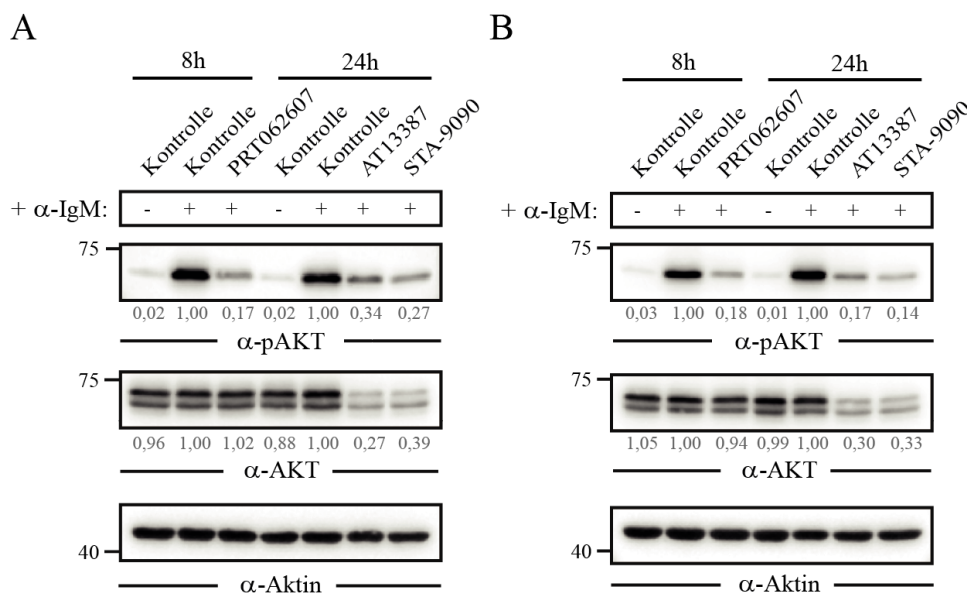


Abbildung 50: Verlust der Phosphorylierung von AKT nach HSP90- bzw. SYK-Inhibition

Immunologische Detektion von phosphoryliertem AKT (pAKT) an Serin 473 in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) bzw. STA-9090 (100 nM) oder dem SYK-Inhibitor PRT062607 (250 nM) für 24 h oder 8 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZRs mit einem Anti-IgM-Antikörper (10 μ g/ml) für 5 min. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZRs. Zur Beurteilung der Phosphorylierung wurde jeweils auch das Gesamtprotein an AKT detektiert. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*

Da bereits die basale Expression von AKT nach Inhibition von HSP90 stark reduziert wurde (AKT ist ein beschriebenes Klientprotein von HSP90) und eine Aktivierung des Signalweges unter Umständen aufgrund der ungleichen basalen Expression nicht erfolgen konnte, wurde auch die Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase (ERK1/2, im Folgenden als ERK bezeichnet) untersucht, bei der eine Inhibition von HSP90 zu keiner Veränderung der basalen Expression führte (siehe Abbildung 51, nächste Seite).

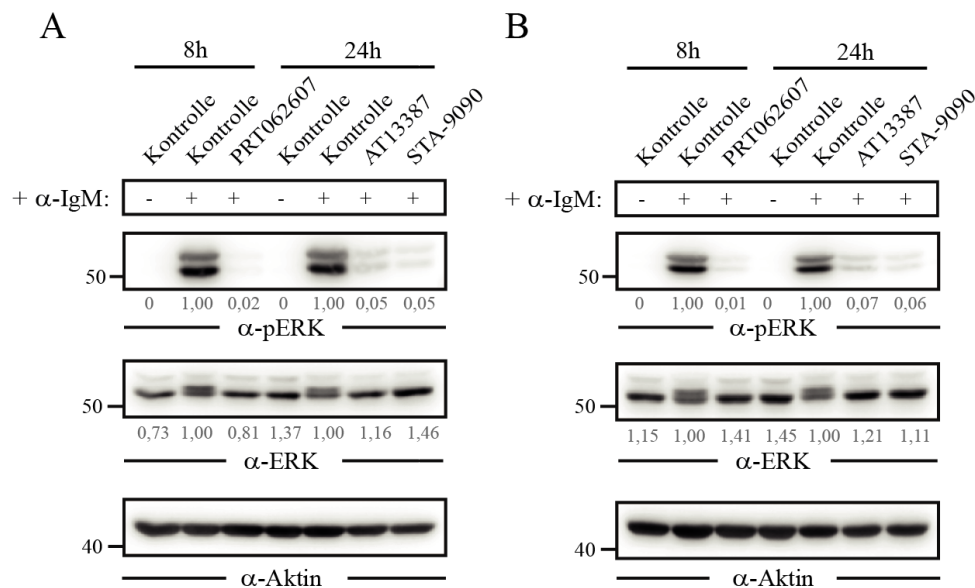


Abbildung 51: Verlust der Phosphorylierung von ERK nach HSP90- bzw. SYK-Inhibition

Immunologische Detektion von phosphoryliertem ERK (pERK) an Threonin 202 und Tyrosin 204 (für ERK1) bzw. Threonin 185 und Tyrosin 187 (für ERK2) oder phosphoryliert nur an Threonin 202 in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) bzw. STA-9090 (100 nM) oder dem SYK-Inhibitor PRT062607 (250 nM) für 24 h oder 8 h vorbehandelt wurden, gefolgt von einer Stimulation des BZRs mit einem Anti-IgM-Antikörper (10 μ g/ml) für 5 min. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, unstimulierte Zellen als Kontrolle für die Stimulation des BZRs. Zur Beurteilung der Phosphorylierung wurde jeweils auch das Gesamtprotein an ERK detektiert. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Der Effekt auf den MAP-Kinase-Signalweg nach SYK- bzw. HSP90-Inhibition in DG75- und Daudi-Zellen ist vergleichbar mit dem auf den PI3K/AKT-Signalweg. Nach Aktivierung des BZR-Signalwegs ist ein deutlicher Anstieg der aktivierten Form von ERK nachweisbar, die über einen anti-pERK-Antikörper nachgewiesen wurde. Dieser erkennt sowohl phosphoryliertes ERK1 an Threonin 202 (Threonin 185 in ERK2) als auch an Threonin 202 in Kombination mit phosphoryliertem Tyrosin 204 (Tyrosin 187 in ERK2). Eine Aktivierung von ERK ist nach Vorbehandlung der Zellen mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 praktisch nicht mehr nachweisbar. Gleiches gilt für die Aktivierung nach HSP90-Inhibition, bei der die Phosphorylierung von ERK nach Aktivierung des BZR-Signalwegs fast vollständig unterbleibt.

Nachdem sich zeigte, dass der PI3K/AKT- und der MAP-Kinase-Signalweg in DG75- und Daudi-Zellen nach Behandlung der Zellen mit dem SYK-Inhibitor oder den HSP90-Inhibitoren in ähnlichem Maße gehemmt wurde, sollte im Folgenden noch der Calciumflux in den unterschiedlich vorbehandelten Zellen untersucht werden.

Diese Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Michael Engelke (AG Wienands, UMG Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden DG75- und Daudi-Zellen für 24 h mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 (500 nM) und STA-9090 (100 nM) vorbehandelt und der Verlauf des Calciumfluxes in den Zellen nach Aktivierung des BZR-Signalweges mit 5 μ g/ml Anti-

IgM-Antikörper am Durchflusszytometer untersucht. Die Zellen wurden daher mit dem fluoreszierenden Calcium-sensitiven Acetoxymethyl-Esterderivat von Indo-1 (Indo-1-AM) inkubiert, das in seiner ungeladenen Form durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren kann. Zelleigene Esterasen modifizieren Indo-1-AM in eine geladene Form (Indo-1), so dass dieses nicht mehr im gleichen Maße aus der Zelle diffundieren kann, in der Zelle verbleibt (*dye-trapping*) und als Calciumindikator dienen kann. Bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 350$ nm verschiebt sich das Maximum der Emission von Indo-1 von $\lambda = 475$ nm in Calcium-ungebundener Form hin zu 400 nm, wenn es mit Calcium interagiert.

Aus technischen Gründen wurden während des Versuchs die Wellenlängen bei $\lambda_1 = 405$ nm und $\lambda_2 = 530$ nm gemessen, da diese robuste Messergebnisse liefern und auftretende Störeffekte wie zum Beispiel den Einfluss unterschiedlicher Zellgrößen oder Zelldicken weitestgehend reduzieren.

Abbildung 52 zeigt die Auswertung einer solchen Calciumfluxbestimmung in DG75- und Daudi-Zellen bei der der Quotient λ_1/λ_2 der Wellenlängen $\lambda_1 = 405$ nm und $\lambda_2 = 530$ nm gegenüber der Zeit in Sekunden aufgetragen ist. Je größer der Quotient, desto mehr freies Calcium war vorhanden, das an Indo-1 gebunden hat.

In Kontrollzellen, die mit DMSO inkubiert wurden, ist ein deutlicher und rascher Anstieg an intrazellulärem Calcium nach Stimulation des BZR zu erkennen. Dieser Anstieg ist in Zellen, die entweder mit dem jeweiligen HSP90-Inhibitor oder dem SYK-Inhibitor vorbehandelt wurden im gleichen Maße verzögert als auch verringert.

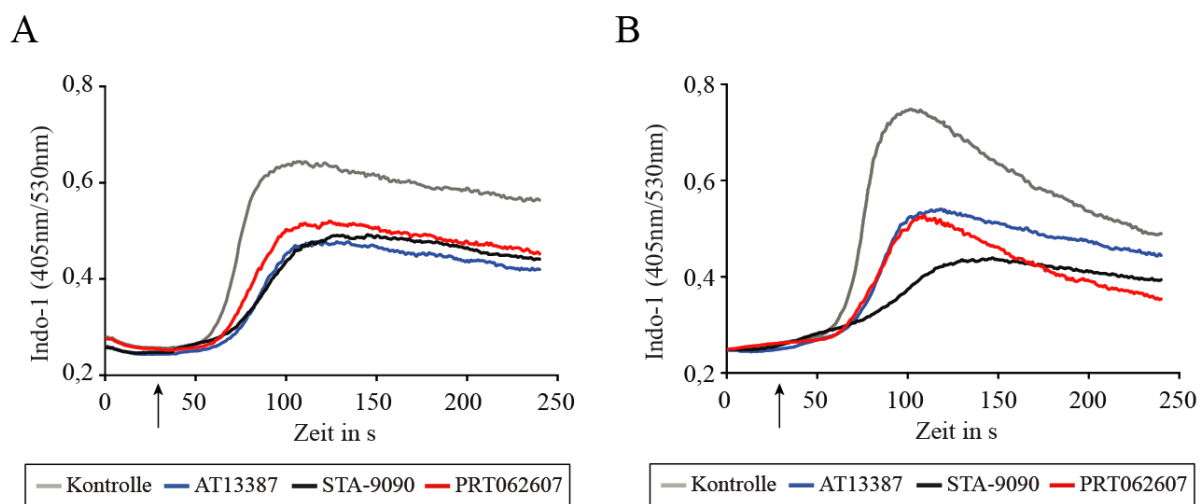


Abbildung 52: Calciumflux in BZR-aktivierten Zellen nach Inhibition von HSP90 bzw. SYK

Calciumflux-Analyse von DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) nach Aktivierung des BZR-Signalwegs durch Zugabe von 5 μ g/ml Anti-IgM-Antikörper 30 s nach Start der Messung von Indo-1 (gekennzeichnet durch Pfeil). Die Zellen wurden entweder mit HSP90-Inhibitoren (100 nM AT13387 bzw. 500 nM STA-9090) oder SYK-Inhibitor (250 nM PRT062607) vorbehandelt. Zellen, die mit DMSO inkubierten, dienten als Kontrolle der Inhibitorbehandlung. Der Versuch wurde in Kooperation mit Dr. Michael Engelke (AG Wienands, UMG Göttingen) durchgeführt. (n = 1) Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

4.5 SYK ist ein Klientprotein von HSP90 im Burkitt Lymphom, dessen Interaktion über HSP90 α -pY197 bzw. HSP90 β -pY192 erfolgt

Wie in Kapitel 4.4.3 gezeigt, werden die durch die Inhibition von HSP90 hervorgerufenen Effekte auf den BZR-Signalweg in den B-Zellen vorwiegend über die Kinase SYK vermittelt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Interaktion von SYK mit HSP90 nachweisbar ist. Hierfür wurden Immunpräzipitationen (IPs) mit HSP90 und SYK in DG75- und Daudi-Zellen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 2×10^7 Zellen lysiert und mit $4 \mu\text{g}$ SYK- bzw. HSP90-Antikörper (Santa Cruz bzw. Abcam) oder einer äquivalenten Menge an IgG-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Der *pulldown* erfolgte am nächsten Tag mit Agarose-*beads* (Santa Cruz). Die aufgereinigten Lysate wurden schließlich per Western Blot auf das Vorhandensein der jeweiligen Proteine (SYK und HSP90) untersucht.

In Abbildung 53 ist die Immunpräzipitation von HSP90 und SYK dargestellt. In beiden Zelllinien konnte im Input das jeweilige Protein nachgewiesen werden. In den Spuren der IgG-Kontrolle konnte kein bzw. nur sehr wenig (siehe HSP90-IP in DG75-Zellen) Protein detektiert werden. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass Protein aus den Lysaten bereits mit den *beads* angereichert wurde. Eine Anreicherung von Protein in der HSP90- oder SYK-Fraktion ist somit eindeutig der Zugabe der spezifischen Antikörper zuzuschreiben. In den Spuren der eigentlichen IP konnte das jeweilige Protein und der korrespondierende vermutete Interaktionspartner nachgewiesen werden. Bei der HSP90-IP wurde des Weiteren AKT als bereits von Basso und Kollegen²⁶¹ beschriebener HSP90-Interaktionspartner identifiziert.

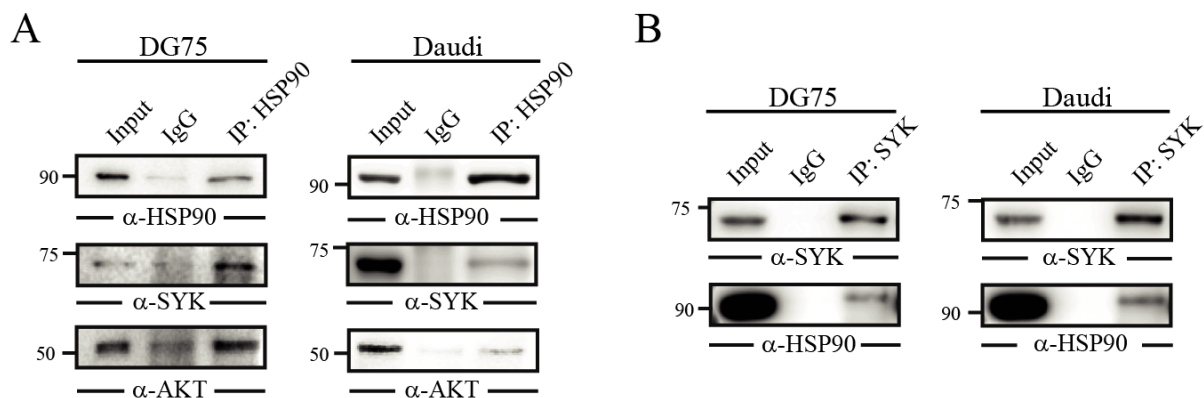


Abbildung 53: Interaktion von HSP90 und SYK

Immunpräzipitationen (IP) von HSP90 (A) und SYK (B) in DG75- und Daudi-Zellen mit anschließender immunologischer Detektion von HSP90, SYK und AKT. Als Kontrolle der spezifischen Anreicherung des Zielproteins wurden IPs mit einem Isotyp-IgG-Antikörper (IgG) durchgeführt. Input-Kontrollen dienen der Einschätzung der Effizienz der IP. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Es ist bekannt, dass der Chaperonzyklus und damit letztlich die Interaktion von HSP90 und mehreren Klientproteinen von der posttranslationalen Modifikation (zum Beispiel Phosphorylierungen) von HSP90 abhängig ist. Dies ist auch bei der Modulation des tonischen BZR-Signalweges durch SYK-Inhibition der Fall (siehe Abbildung 25). Aber auch nach CD79a-Knockdown in DG75-Zellen konnte eine reduzierte HSP90-Phosphorylierung beobachtet werden.

In Abbildung 54 ist das Spektrum des Tyrosin-phosphorylierten Peptids der Aminosäuresequenz „VILHLKEDQTEYLEER“ aus HSP90 aus der massenspektrometrischen Analyse des tonischen Signalweges in DG75-Zellen zu sehen, bei der die Phosphorylierung nach CD79a-Knockdown untersucht wurde. Hierbei ist ersichtlich, dass das oben genannte Peptid prozentual häufiger in den Kontrollzellen als in den CD79a-Knockdownzellen vorkommt. Die Inhibierung des tonischen Signalweges durch CD79a-Knockdown führt demnach zu einer Reduktion der Phosphorylierung an dem in dem Peptid vorkommenden Tyrosin.

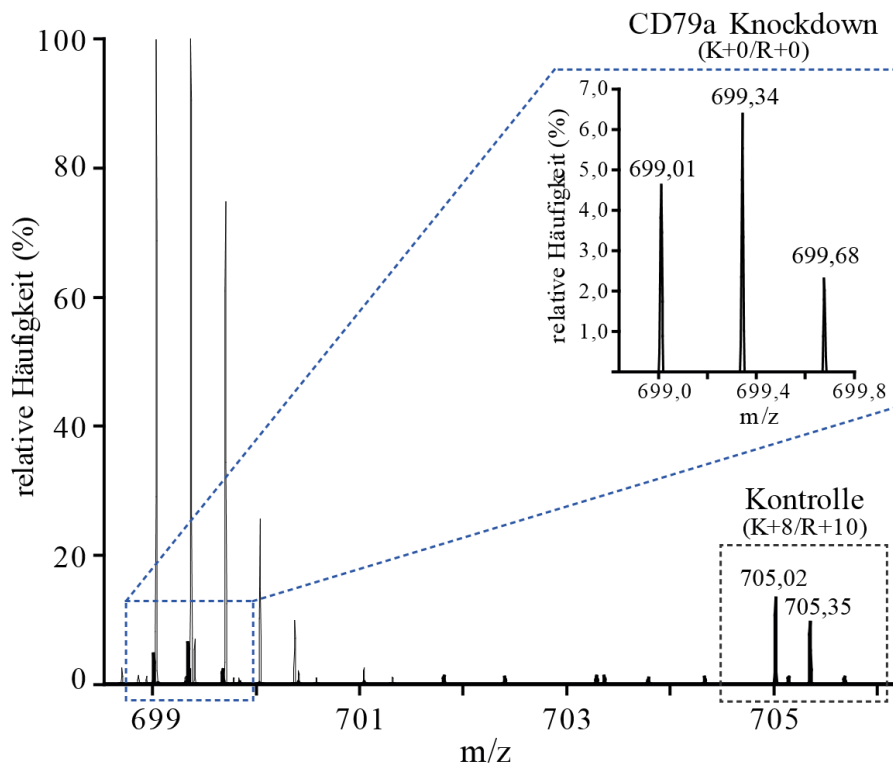


Abbildung 54: Identifikation der regulierten Phosphorylierungsstelle im HSP90-Protein nach CD79a-Knockdown

Massenspektrometrisches Spektrum der Messung von Peptiden in Lysaten von DG75-Zellen mit CD79a-Knockdown. Zur besseren Visualisierung wurden die Peaks der Lysate der DG75-Zellen mit CD79a-Knockdowns nochmals vergrößert und separat dargestellt (rechts oben). Die Rohdaten wurden aus dem Datensatz von Corso und Kollegen²⁵⁹ entnommen. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

In Abbildung 55 ist die exakte Lokalisation des Peptids durch Positionskennzeichnung in Form tiefgestellter Zahlen in den jeweiligen Isoformen des HSP90-Proteins inklusive der *Accession*-Nummer dargestellt.

HSP90 α (P07900)

V₁₈₆ I L H L K E D Q T E pY L E E R₂₀₁

HSP90 β (P08238)

V₁₈₁ I L H L K E D Q T E pY L E E R₁₉₆

Abbildung 55: Lokalisation des sequenzierten Peptids in den jeweiligen HSP90-Isoformen

Aminosäuresequenz des identifizierten und sequenzierten Peptids, die sowohl in HSP90 α (oben) und HSP90 β (unten) vorkommt. Die nach dem CD79a-Knockdown regulierte Tyrosinphosphorylierungsstelle (pY) ist rot markiert. Die tiefgestellten Zahlen beschreiben die jeweilige Aminosäureposition des Peptids im jeweiligen Protein. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Um zu klären, ob die im tonischen Signalweg regulierte Phosphorylierungsstelle (pY192 in HSP90 β und pY197 in HSP90 α) eine Rolle bei der Interaktion von HSP90 mit SYK spielt, wurde Tyrosin 197 in HSP90 α durch die Aminosäure Phenylalanin (F) ersetzt bzw. mutiert, so dass an dieser Position keine Phosphorylierung mehr ausgebildet werden kann. Sollte die Phosphorylierungsstelle jedoch essentiell für die Bindung des Klientproteins SYK an HSP90 sein, würde keine Interaktion zwischen dem an dieser Stelle mutierten HSP90 α -Proteins und der Kinase SYK nachweisbar sein.

Um dies zu testen wurden Immunpräzipitationen (IP) von überexprimiertem HA-getagten Wildtyp-HSP90 α (HA-HSP90 WT) und mutierten HSP90 α (HA-HSP90 Y197F) in DG75- und Daudi-Zellen durchgeführt und die Interaktion von SYK mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle wurden auch SYK-IPs mit anschließender Detektion von HA-HSP90 WT und HA-HSP90 Y197F durchgeführt.

In Abbildung 56 (siehe nächste Seite) sind die Ergebnisse der durchgeführten IPs zu sehen.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Funktionalität der überexprimierten HA-getagten HSP90 α -Proteine (Wildtyp als auch mutierte Form) als solche durch den *tag* nicht beeinträchtigt wird. Beide Varianten zeigten eine Interaktion mit dem Klientprotein AKT, so dass davon auszugehen ist, dass diese Phosphorylierungsstelle keine Rolle bei der Bindung von AKT spielt. Bei der Betrachtung des Interaktionspartners SYK hingegen ist festzustellen, dass diese essentiell für die Bindung von SYK an HSP90 α ist. Es konnte keine Interaktion von SYK mit HA-HSP90 Y197F nachgewiesen werden.

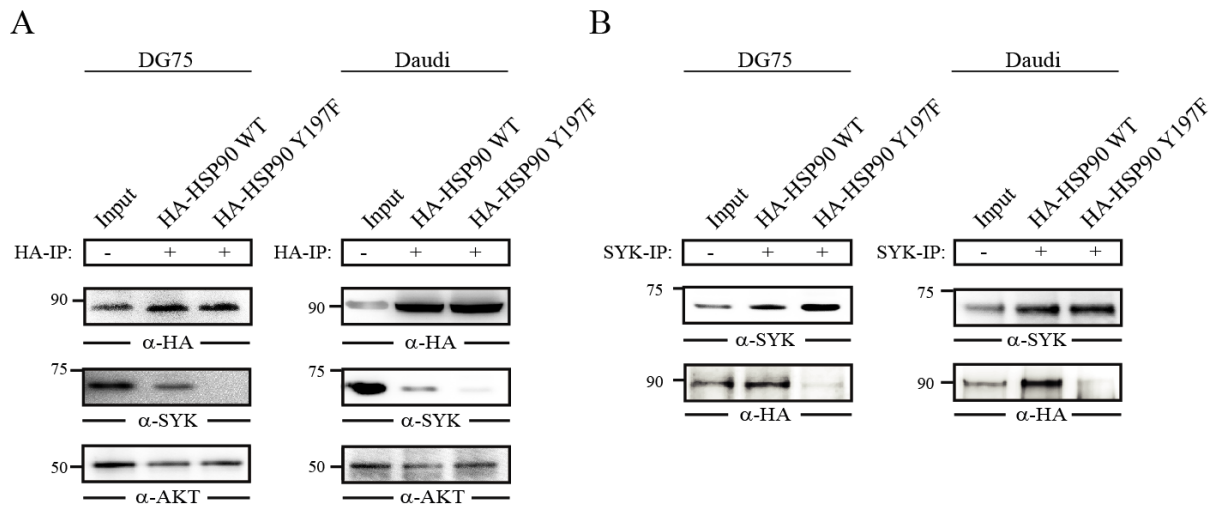


Abbildung 56: Die Interaktion von SYK mit HSP90 ist von der Phosphorylierung an Tyrosin 197 (Y197) abhängig

Immunpräzipitationen (IPs) der HA-markierten Proteine HSP90 (HA-HSP90 WT) und von an Position 197 mutiertem HSP90 (HA-HSP90 Y197F) (A) und IPs von SYK (B). Die IPs wurden mit Lysaten von DG75- und Daudi-Zellen durchgeführt, in denen HA-HSP90 WT oder HA-HSP90 Y197F überexprimiert wurden. Es erfolgte eine immunologische Detektion von SYK, AKT und HA. Input-Kontrollen dienen der Einschätzung der Effizienz der IP. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

4.6 Überexpression einer konstitutiv aktivierten Form von SYK führt zur Resistenz von Lymphomzellen gegenüber HSP90-Inhibition

4.6.1 Überexpression von TEL-SYK versetzt DG75 in einen Zustand vergleichbar nach SYK-Aktivierung durch Stimulation des BZR

Zum mechanistischen Nachweis, dass SYK die Zielstruktur der nach Inhibition von HSP90 auftretenden Effekte auf das zelluläre Überleben sowie der tonische BZR-Signalleitung ist, haben wir uns des Fusionsproteins TEL-SYK bedient.

Eine *in-frame*-Translokation des SYK-Gens in das TEL-Gen führt zur Prozessierung des Fusionsproteins TEL-SYK (siehe Abbildung 57, nächste Seite), das konstitutiv Tyrosinphosphoryliert und mit einer konstitutiv aktiven Form der Kinase SYK vergleichbar ist, die unter anderem den PI3K/AKT- und MAPK-Signalweg in einer murinen pro-B-Zelllinie (BaF3) aktiviert.^{265,266}

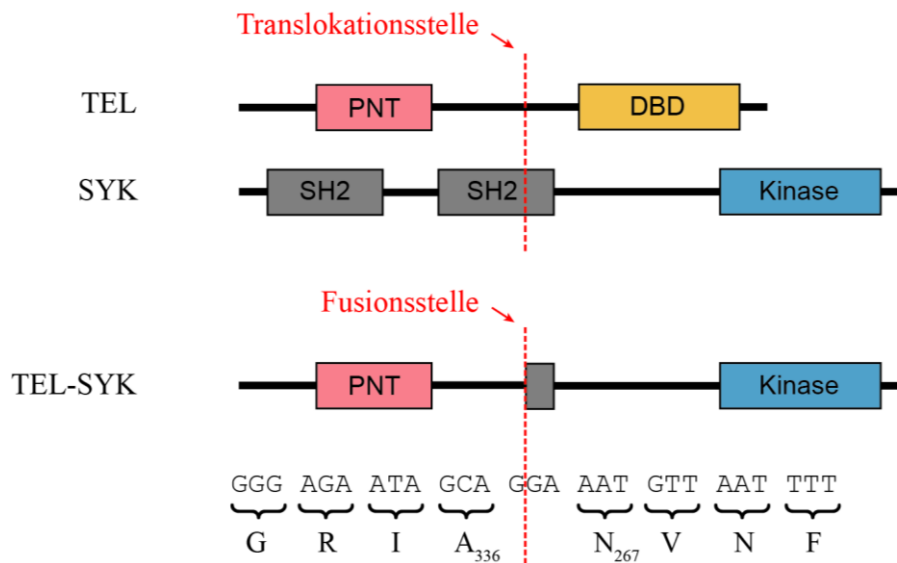


Abbildung 57: TEL-SYK-Fusionsprotein

Schematische Darstellung des nach Translokation entstehenden TEL-SYK-Fusionsproteins und die jeweiligen Ausgangsproteine SYK inklusive seiner SH2- und Kinase-Domäne und TEL inklusive der PNT-Domäne und der DNA-Bindedomäne (DBD). Die Stelle, an der die Translokation bzw. Fusion in den jeweiligen Proteinen stattfindet, ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Die betreffenden Nukleotide und die Aminosäuresequenz (inklusive der Position im jeweiligen Protein vor der Translokation) sind dargestellt. Die Abbildung ist modifiziert nach Kuno und Kollegen²⁶⁵.

Um die Effekte von TEL-SYK in Burkitt-Lymphom-Zellen zu untersuchen, wurde TEL-SYK in DG75- und Daudi-Zellen überexprimiert. Zum Nachweis der Überexpression des rekombinanten Proteins wurden zunächst Western Blots durchgeführt (siehe Abbildung 58). Hierfür wurde ein SYK-Antikörper verwendet, der sowohl endogenes SYK (~ 72 kDa) als auch das schwerere überexprimierte Fusionsprotein TEL-SYK (~ 78 kDa) detektiert. In beiden transfizierten Zelllinien konnte eine Überexpression von TEL-SYK aufgrund der Detektion eines zweiten Signals in Form einer zusätzlichen Bande nachgewiesen werden.

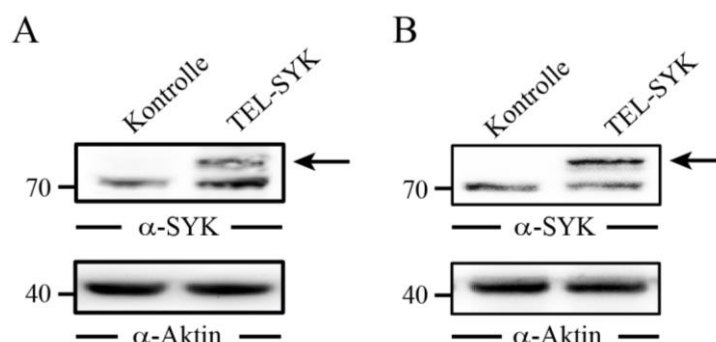


Abbildung 58: Überexpression von TEL-SYK

Immunologische Detektion von SYK bzw. TEL-SYK in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), in denen TEL-SYK überexprimiert wurde (TEL-SYK). Als Kontrolle der Überexpression wurden Zellen verwendet, die mit einem Leervektor transduziert wurden. Die Bande korrespondierend zu exprimiertem TEL-SYK-Protein ist gekennzeichnet (siehe Pfeil). Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Die Funktionalität des überexprimierten TEL-SYK-Proteins wurde durch massenspektrometrische Analysen in DG75-Zellen überprüft. Hierfür wurde die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen nach TEL-SYK-Überexpression mit denen nach Aktivierung des BZR-Signalwegs verglichen. Die schematische Darstellung der SILAC-Markierung und Probenprozessierung ist in Abbildung 59 dargestellt.

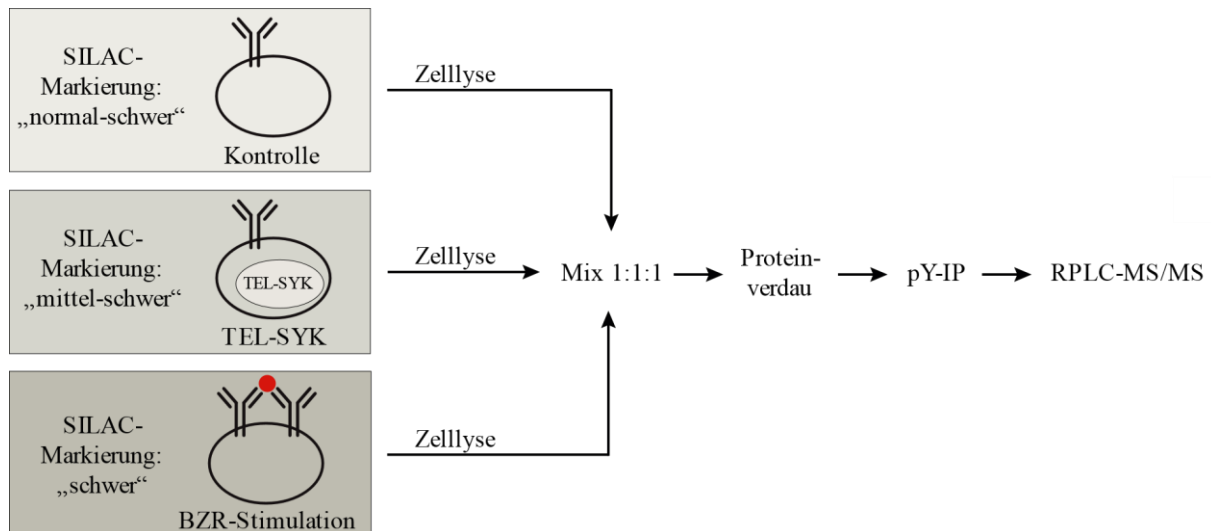


Abbildung 59: Darstellung der Probenprozessierung zur Analyse des pYomes in DG75-Zellen nach TEL-SYK-Überexpression bzw. nach BZR-Stimulation

Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse ist in Abbildung 60 (siehe nächste Seite) in Form eines Scatter Blots zu sehen. Dabei wurden die Phosphoproteine in verschiedene Cluster (Cluster 1 - 5) hinsichtlich der Regulation ihrer Phosphorylierungsstelle eingeteilt.

Proteine des Clusters 1 weisen in beiden Konditionen eine Dephosphorylierung um den Faktor zwei auf. In Cluster 2 und 4 sind Proteine zu finden, die jeweils in nur einer Kondition eine Veränderung der Phosphorylierung um den Faktor zwei erfahren. Proteine, bei denen keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung in beiden Konditionen nachweisbar ist, wurden in Cluster 3 eingruppiert. Proteine des Clusters 4 weisen hingegen unter beiden Konditionen einen Anstieg ihrer Phosphorylierung um mindestens einen Faktor zwei auf. Hierunter sind neben der Ubiquitinligase CBL auch typische Effektoren des BZR-Signalwegs wie zum Beispiel SYK, BTK und PLC γ 2 zu finden. Der Rangkorrelationskoeffizient r (nach Spearman) der regulierten Phosphorylierungsstellen der jeweiligen Proteine in den beiden Konditionen liegt bei $r = 0,674$.

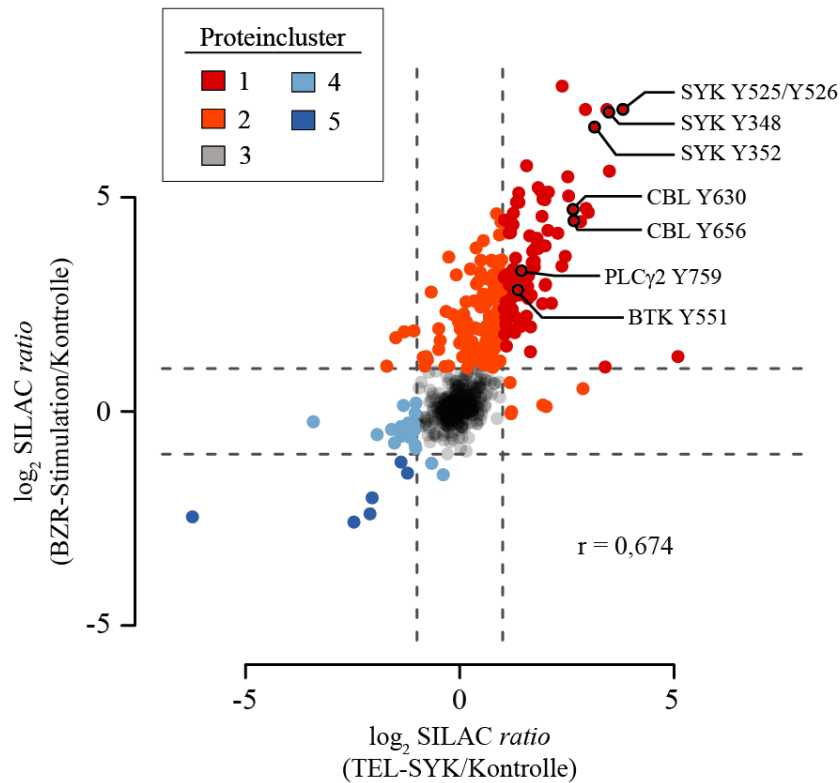


Abbildung 60: TEL-SYK Überexpression versetzt DG75 in einen Zustand vergleichbar nach BZR-Aktivierung

Analyse von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in DG75 nach TEL-SYK-Überexpression („TEL-SYK“) bzw. nach Stimulation des BZR („BZR-Stimulation“). Als Kontrolle dienten unbehandelte DG75-Zellen. Die eingezeichneten Hilfslinien, die die jeweiligen Achsen bei -1 und 1 schneiden, gruppieren die Phosphoproteine in verschiedene Cluster (näheres siehe Text). Einzelne Phosphoproteine des BZR-Signalwegs und der Rangkorrelationskoeffizient r (nach Spearman) sind angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Eine Signalwegsanalyse bestätigt die Funktionalität von TEL-SYK (siehe Abbildung 61, nächste Seite). Die Überexpression des Fusionsproteins aktiviert alle Signalwege, die auch nach Stimulation der B-Zelle über den BZR aktiviert werden. Darüber hinaus erfolgt auch eine Aktivierung von Signalwegen der Interleukine, die beim BZR-Signalweg in ausgereiften B-Zellen eine eher untergeordnete Rolle spielen.

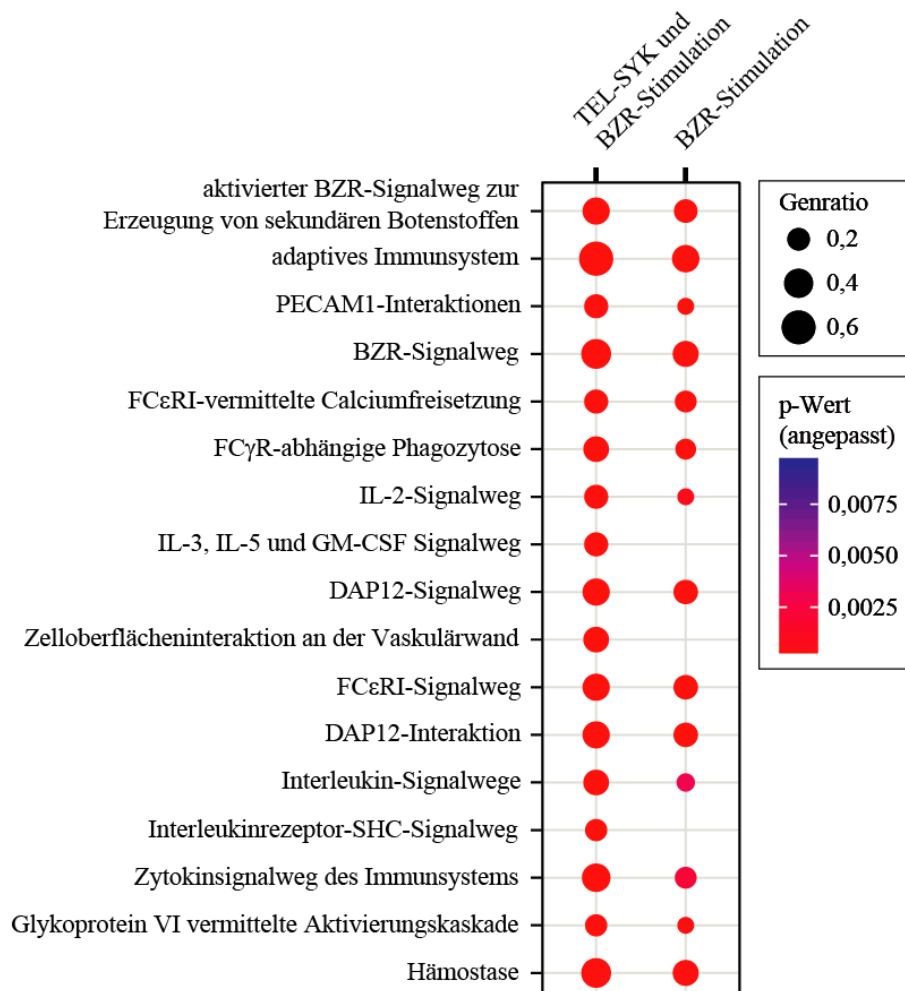


Abbildung 61: Vergleich regulierter Signalwege nach BZR-Stimulation und TEL-SYK-Überexpression
 Signalwegsanalysen basierend auf regulierten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen nach TEL-SYK-Überexpression und BZR-Aktivierung (linke Spalte) oder nur nach BZR-Stimulation (rechte Spalte). Der Durchmesser der Kreise (Genratio) ist ein Maß für die Stärke der Regulation von Phosphoproteinen des betreffenden Signalwegs. Die Farbe der Kreise spiegelt die Signifikanz durch Darstellung der p-Werte wider, die nach der Benjamini-Hochberg-Prozedur für multiple Vergleiche angepasst wurden. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

4.6.2 TEL-SYK-Protein zeigt im Vergleich zu SYK eine stabile Expression nach HSP90-Inhibition

Nach Überprüfung der Funktionalität und des Wirkungsspektrums des überexprimierten TEL-SYK-Fusionsproteins in DG75-Zellen (siehe Abbildung 61) wurde der Einfluss des HSP90-Inhibitors AT13387 auf die mit TEL-SYK überexprimierten Zellen (Daudi und DG75) untersucht.

Hierfür wurden die TEL-SYK-überexprimierenden DG75- und Daudi-Zellen für 24 h mit AT13387 behandelt bzw. mit DMSO inkubiert, lysiert und mittels Western Blot auf die jeweilige Proteinexpression untersucht (siehe Abbildung 62, nächste Seite). Hierbei zeigt sich, dass TEL-SYK im Gegensatz zu SYK auch nach HSP90-Inhibition stabil in den Zellen exprimiert wird.

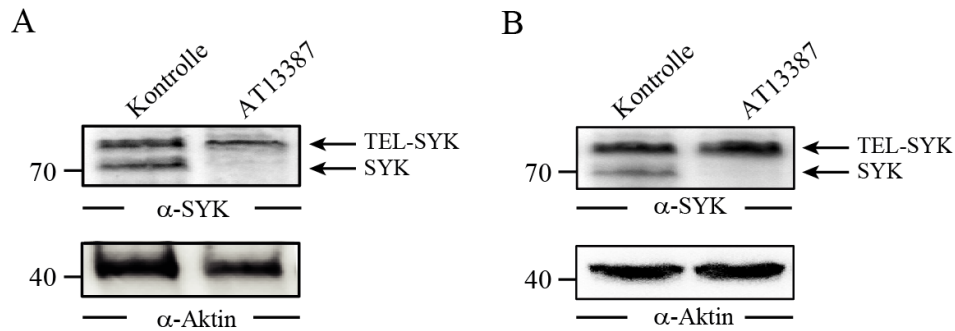


Abbildung 62: TEL-SYK ist resistent gegenüber HSP90-Inhibition

Immunologische Detektion von SYK bzw. TEL-SYK in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), in denen TEL-SYK überexprimiert wurde (TEL-SYK) und 24 h mit HSP90-Inhibitor AT13387 (500 nM) behandelt wurden. Als Kontrolle der Inhibitorbehandlung wurden Zellen verwendet, die mit DMSO inkubiert wurden. Die Banden, korrespondierend zu überexprimiertem TEL-SYK- und endogenem SYK-Protein sind gekennzeichnet (siehe Pfeile). Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

4.6.3 TEL-SYK überexprimierende Zellen sind resistent gegenüber HSP90-Inhibition durch AT13387

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welchen Einfluss die nach HSP90-Inhibition unveränderte stabile TEL-SYK-Expression auf die Proliferation und Viabilität der Zellen nimmt.

Die Proliferation wurde über einen XTT-Assay bestimmt. Hierfür wurden die Zellen ausgesät, mit dem HSP90-Inhibitor AT13387 (500 nM) inkubiert und die Umsatzrate von XTT nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen. In Abbildung 63 (siehe nächste Seite) ist die auf den Leerwert normalisierte Absorption als Maß für den Umsatz von XTT von Daudi- und DG75-Zellen gegen den Zeitraum der Inkubation aufgetragen.

Wildtypzellen, die mit AT13387 behandelt wurden zeigen nach dreitägiger Inkubation mit dem HSP90-Inhibitor eine stark verringerte Proliferation gegenüber Kontrollzellen, die mit DMSO inkubiert wurden. Eine gleichzeitige Überexpression von TEL-SYK in den mit AT13387 behandelten Zellen hebt hingegen den Viabilitätseffekt fast vollständig auf. Zellen mit TEL-SYK-Überexpression zeigen eine mit unbehandelten Zellen vergleichbare Proliferation. Dieser Effekt ist sowohl in den DG75- als auch in Daudi-Zellen zu beobachten.

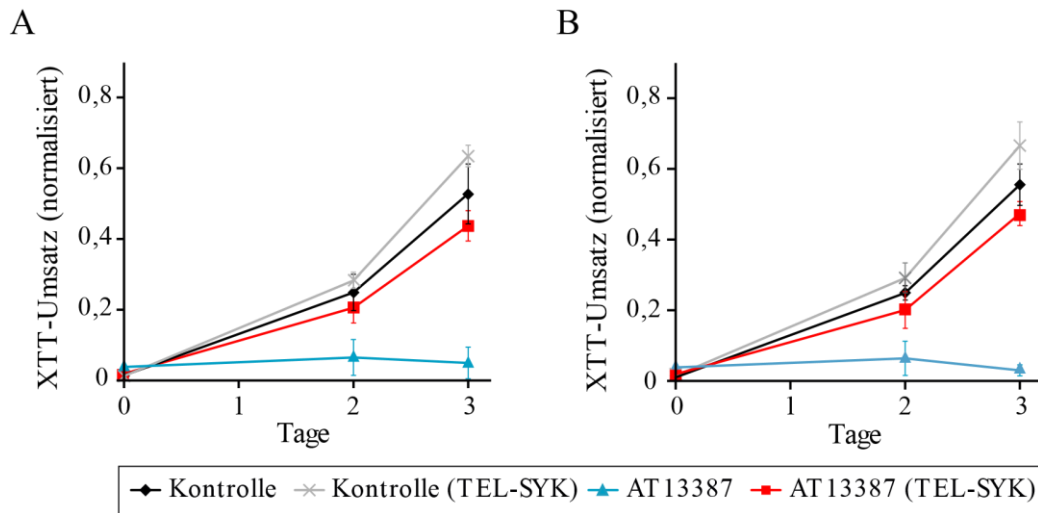


Abbildung 63: TEL-SYK-Überexpression vermittelt Resistenz gegenüber HSP90-Inhibition

Bestimmung der Proliferation (XTT-Assay) von DG75- (A) und Daudi-Zellen (B) mit TEL-SYK-Überexpression in Abhängigkeit der HSP90-Inhibition durch AT13387 (500 nM). Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienen als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung, Zellen mit leerem Überexpressionsplasmid als Kontrolle der TEL-SYK-Überexpression. (n = 3) Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Die Ergebnisse eines Apoptose-Assays (siehe Abbildung 64) bestätigen die in Abbildung 63 dargestellten Ergebnisse.

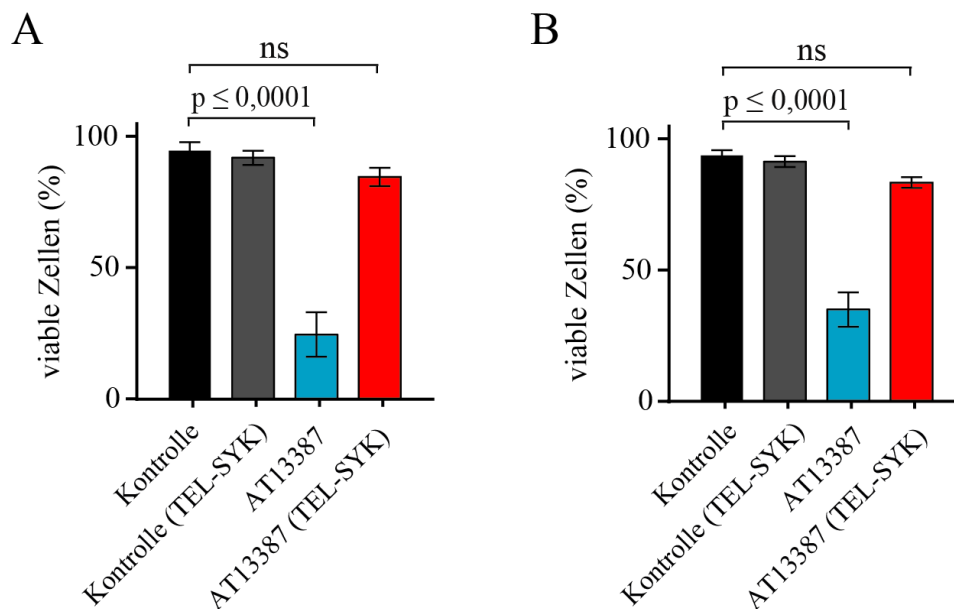


Abbildung 64: TEL-SYK-Überexpression schützt vor Apoptose nach HSP90-Inhibition

Apoptose-Assay mit den Zellen aus Abbildung 63 nach HSP90-Inhibition. Darstellung Annexin- und 7-AAD-negativer (viable) Zellen. Signifikanzen in Form eines p-Wertes wurden über einen 2-faktoriellen ANOVA-Signifikanztest ermittelt und sind angegeben. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit „ns“ beschriftet. (n = 3) Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Zellen, die nach Inkubation mit dem HSP90-Inhibitor AT13387 behandelt wurden, zeigen eine Reduktion an Zellen, die Annexin- und 7-AAD-negativ sind (viable Zellen). Die Überexpression von TEL-SYK hebt das Level an viablen Zellen wieder auf den Stand von unbehandelten Zellen. Somit führt die Expression einer HSP90-resistenten Variante von SYK in DG75- und Daudi-Zellen zu einer Resistenz hinsichtlich der Proliferation und Viabilität der Zellen gegenüber den beiden HSP90-Inhibitoren. Diese Daten weisen darauf hin, dass SYK Zielstruktur der HSP90-Inhibitoren ist und die Viabilität der Zellen nicht durch den Verlust anderer Klientproteine wie zum Beispiel der hier gezeigten Kinasen BTK und LYN, beeinflusst wird.

4.7 SYK wird nach HSP90-Inhibition aktiv über das Lysosom abgebaut

4.7.1 Proteinstabilität von SYK

Bereits in mehreren hier beschriebenen Experimenten bzw. in der von Walter und Kollegen²⁴³ veröffentlichten Arbeit konnte eine Abnahme von SYK nach HSP90-Inhibition gezeigt werden. Ob es sich hierbei um eine erhöhte Proteindegradierungsrate oder um eine reduzierte Proteinsynthese handelt, wurde bisher nicht beschrieben und sollte im Folgenden noch zusätzlich näher untersucht werden.

Cycloheximid ist ein Translationshemmer, der die Proteinbiosynthese durch Blockade des Elongationsschrittes an den Ribosomen hemmt. Durch Blockierung der ribosomalen Aktivität kann die Stabilität von Proteinen bestimmt werden. Hierüber lässt sich klären, ob die Reduzierung von SYK nach HSP90-Inhibition über eine Hemmung der Proteinbiosynthese erfolgen kann oder ob das SYK-Protein über den Zeitraum der HSP90-Inkubation so stabil ist, dass eine Reduktion der Proteinexpression über diesen Regulationsmechanismus ausgeschlossen werden kann.

Um dies zu testen, wurden DG75- und Daudi-Zellen mit steigenden Konzentrationen an Cycloheximid über einen Zeitraum behandelt, bei dem eine Reduktion von SYK nach HSP90-Inhibition bereits beschrieben wurde (48 h). Mittels Western Blot (siehe Abbildung 65, nächste Seite) wurde die Proteinexpression von SYK und p53 in beiden Zelllinien untersucht. Letzteres dient als Positivkontrolle für die Funktionalität von Cycloheximid, da p53 ein Protein ist, dessen Halbwertszeit deutlich unter 48 h liegt.

Es zeigt sich, dass die Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid funktioniert. Das Protein p53 ist nach Cycloheximidinkubation deutlich reduziert und wurde bereits abgebaut. Die SYK-Expression hingegen ist über einen Zeitraum von über 48 h stabil.

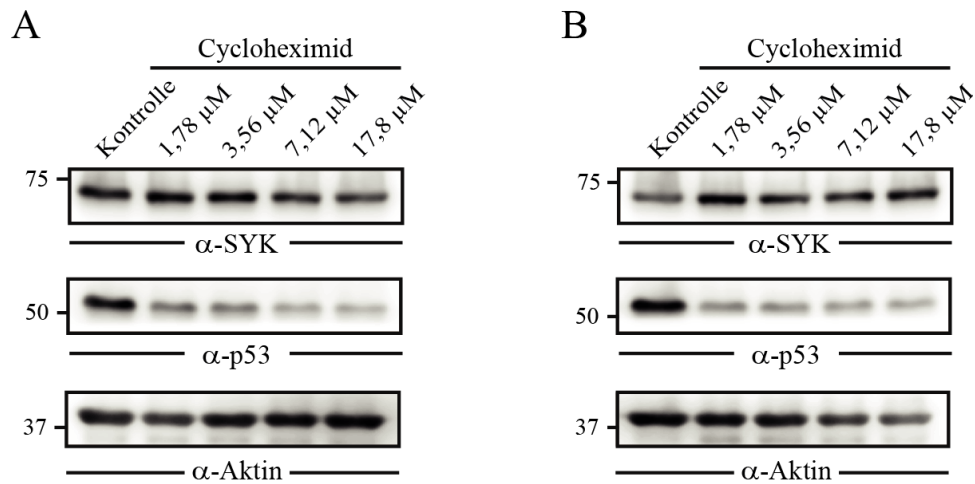


Abbildung 65: Proteininstabilität von SYK

Immunologische Detektion von SYK und p53 in DG75- (A) und Daudi-Zellen (B), die 48 h mit den angegebenen Konzentrationen des ribosomalen Inhibitors Cycloheximid behandelt wurden. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienen als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

4.7.2 Hemmung des Lysosoms, nicht aber des Proteasoms verhindert eine SYK-Degradierung nach HSP90-Inhibition

Wie in Abbildung 65 gezeigt, ist SYK im unstimulierten Zustand über einen Zeitraum von über 48 h in DG75- und Daudi-Zellen stabil. Die Reduktion der Expression von SYK in beiden Zelllinien nach Inkubation mit den hier verwendeten HSP90-Inhibitoren muss daher durch aktiven Abbau des Proteins erfolgen, der über das Proteasom oder Lysosom vermittelt werden kann.

Um zu klären über welchen Weg SYK abgebaut wird, wurden selektive Inhibitoren zur Hemmung der jeweiligen Abbauege eingesetzt.

Für die Hemmung des lysosomalen Abbaueges wurde Bafilomycin A1 verwendet. Es inhibiert die in der Lysosomenmembran lokalisierten V-Typ-ATPasen, die unter Hydrolyse von ATP einen Protonengradienten aufbauen und so für die Steuerung des pH-Wertes in den Lysosomen verantwortlich sind. Dieser ist essentiell für die enzymatische Aktivität von Proteasen. Des Weiteren blockiert Bafilomycin A1 die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen.

Um die minimale Arbeitskonzentration für Bafilomycin zu bestimmen, wurden DG75-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Die Funktionalität von Bafilomycin A1 wird durch die Proteinexpression des autophagosomalen Markers LC3B untersucht.²⁶⁷ Im Rahmen des lysosomalen Abbaus wird die zytosolische Isoform 1 von LC3B (LC3B-1) durch Konjugation mit Phosphatidylethanolamin in die Isoform 2 von LC3B (LC3B-2) umgewandelt und an die Membran von Autophagosomen rekrutiert. Nach Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen wird LC3B-2 durch lysosomale Hydrolasen degradiert.

Wird die Fusion durch Bafilomycin A1 inhibiert, führt dies zu einer Akkumulation von LC3B-2 und dient so als Maß für die Hemmung des lysosomalen Abbaueweges.

In Abbildung 66 ist die Expression von LC3B nach dreistündiger Inhibitorinkubation zu sehen. Bereits mit der geringsten hier verwendeten Konzentration von 25 nM Bafilomycin A1 ist eine Akkumulation von LC3B-2 zu erkennen, die nach Erhöhung der Konzentration nicht weiter ansteigt. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche 25 nM als minimale Arbeitskonzentration für Bafilomycin A1 festgelegt.

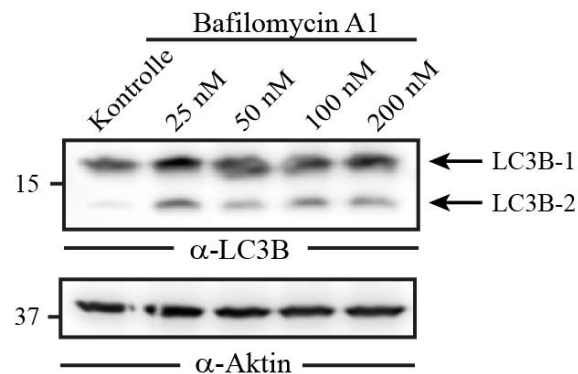


Abbildung 66: Akkumulation von LC3B-2 nach Blockierung des lysosomalen Abbaueweges

Immunologische Detektion der Isoformen von LC3B (siehe Kennzeichnung) nach Inkubation von DG75-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von Bafilomycin A1 für 3 h. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienen als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Für die Hemmung des Proteasoms wurde der Inhibitor Bortezomib verwendet. Dieser hemmt die 20S-Untereinheit des 26S-Proteasoms, die proteolytische Aktivität zeigt. Eine Hemmung der 20S-Untereinheit hat eine Akkumulation von Proteinen wie zum Beispiel p53 zur Folge, die normalerweise über das 26S-Proteasom abgebaut werden. Da unter steigenden Konzentrationen von Bortezomib zunächst in DG75-Zellen keine Akkumulation von p53 nachweisbar war (Daten nicht gezeigt) und somit die Funktionalität des Inhibitors nicht überprüft werden konnte, wurden DG75-Zellen mit einem Translationshemmer (hier: Cycloheximid) vorbehandelt. Wird p53 über das Proteasom abgebaut, so verschwindet nach erfolgreicher Translationsinhibition das Protein aus der Zelle. Wird sowohl die Translation als auch der proteasomale Abbau durch Bortezomib gehemmt, verbleibt p53 in der Zelle und ist weiterhin nachweisbar.

In Abbildung 67 ist ein Western Blot mit Lysaten zu sehen, der die Funktionalität von Bortezomib bestätigt. Hierfür wurden DG75-Zellen mit 1 μ M Cycloheximid und mit steigenden Konzentrationen an Bortezomib für 4 h inkubiert und anschließend lysiert. Es ist erkennbar, dass die Expression von p53 nach Cycloheximidinkubation reduziert wurde und diese Reduktion durch gleichzeitige Inkubation mit steigenden Konzentrationen an Bortezomib sukzessiv wieder aufgehoben werden konnte.

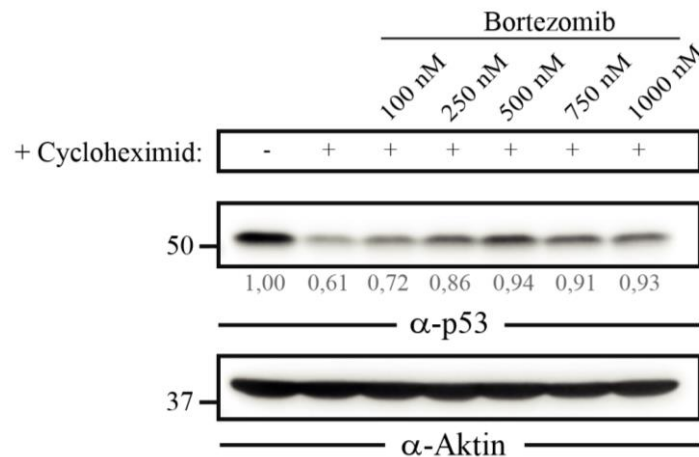


Abbildung 67: Hemmung des Proteasoms durch Bortezomib

Immunologische Detektion von p53 nach Inkubation von DG75-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an Proteasom-Inhibitor Bortezomib und gleichzeitiger Inkubation mit dem Ribosom-Inhibitor Cycloheximid für 4 h. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienen als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Zellen, die nur mit Cycloheximid inkubiert wurden, dienen als Kontrolle der Bortezomib-Behandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Die Werte zeigen die relativen Expressionen, normalisiert auf Aktin und der Kontrolle, deren Wert auf 1 gesetzt wurde.

Da SYK prinzipiell über das Lysosom und über das Proteasom abgebaut werden kann, wurden im Folgenden jeweils diese Abbauwege in Kombination mit der Inhibition von HSP90 untersucht.

Hierfür wurden DG75- und Daudi-Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren für 24 h bzw. 16 h behandelt, bevor sie zur Analyse der Proteinexpression lysiert wurden. Die Ergebnisse in Form eines Western Blots sind in Abbildung 68 (siehe nächste Seite) gezeigt.

In beiden Zelllinien ist eine Reduktion von SYK nach HSP90-Inhibition mit AT13387 zu erkennen, die mit gleichzeitiger Behandlung mit BafilomycinA1, die durch den Anstieg von LC3B visualisiert wurde, nicht aber mit Bortezomib unterbleibt. Die Einzelbehandlungen der jeweiligen Inhibitoren des Proteinabbaus zeigen keine Regulation gegenüber der Kontrolle.

Die Versuche in beiden Zelllinien zeigen, dass SYK nach HSP90-Inhibition über das Lysosom, nicht aber über das Proteasom abgebaut wird.

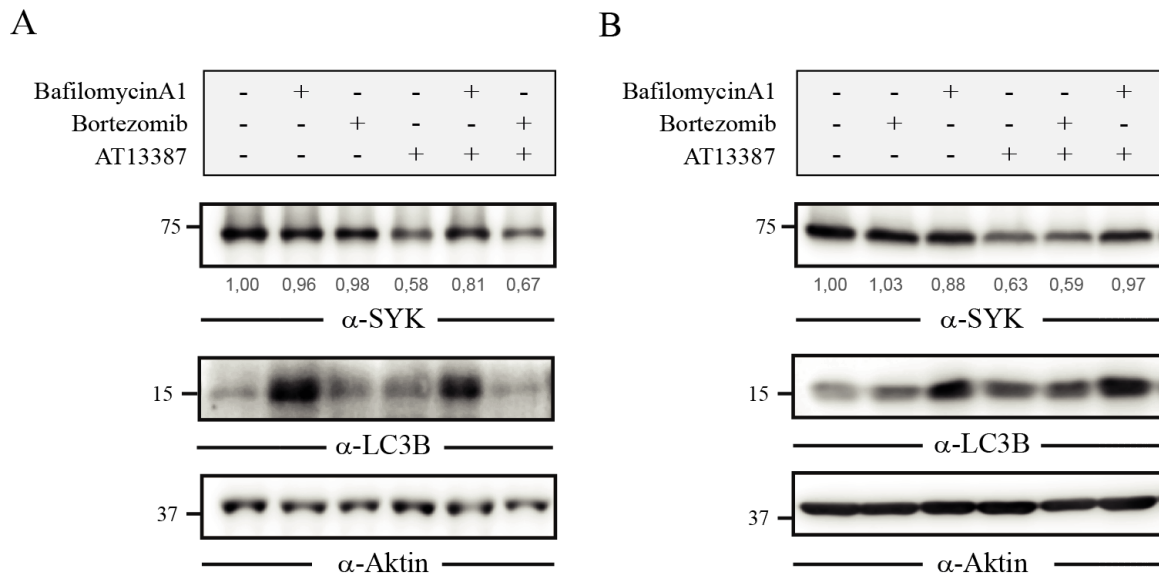


Abbildung 68: SYK wird nach HSP90-Inhibition über das Lysosom abgebaut

Immunologische Detektion von SYK und LC3B nach Inkubation von DG75- (A) bzw. Daudi-Zellen (B) mit den angegebenen Inhibitoren (25 nM BafilomycinA1, 1 μ M Bortezomib bzw. 500 nM AT13387) für 24 h bzw. 16 h. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle der Inhibitorbehandlung (jeweils 1. Spur). Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Die Werte zeigen relative Expressionen, normalisiert auf Aktin und der Kontrolle (jeweils 1. Spur), deren Wert auf 1 gesetzt wurde.

4.8 Untersuchung des tonischen Antigenrezeptorsignalweges in B-ALL-Zelllinien

4.8.1 Reduktion des prä-BZR auf der Membranoberfläche nach Knockdown der Rezeptorteilkomponente CD79a in RCH-ACV-Zellen

Im Gegensatz zu B-Zellen, die über ein tonisches BZR-Signal verfügen, sind prä-B-Zellen bisher noch nicht hinreichend hinsichtlich der Existenz eines ähnlichen Signals untersucht worden. Aus diesem Grund sollte zunächst eine Reduktion des prä-B-Zellrezeptors (prä-BZR) auf den jeweiligen Zellen erzielt werden, um mögliche Effekte auf nachgeschaltete Signalwege zu untersuchen und so potentielle therapeutische Zielstrukturen in der prä-BZR-Signalleitung zu identifizieren.

Die Reduktion des auf der Oberfläche exprimierten prä-BZR erfolgt über den Knockdown des membranständigen Proteins CD79a, das den Rezeptor stabilisiert und essentiell für die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche ist. Ein Verlust von CD79a führt demnach zu einer Reduktion des prä-BZR, die mittels einer Färbung mit einem APC-gekoppelten anti-CD179a Antikörper am Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurde der anti-CD179a Antikörper validiert und Kontrollfärbungen durchgeführt. Hierfür wurden je 1×10^6 Zellen zweier CD179a-positiven prä-B-Zelllinien (RCH-ACV und SMS-SB) und einer CD179a-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie (DG75) nach Fc-Rezeptorblock mit dem CD179a-Antikörper gefärbt. Als Färbekontrolle diente jeweils eine Färbung mit einer APC-gekoppelten IgG-Isotypkontrolle. In Abbildung 69 sind Histogramme der Färbungen zu sehen, die die Funktionalität des Antikörpers belegen.

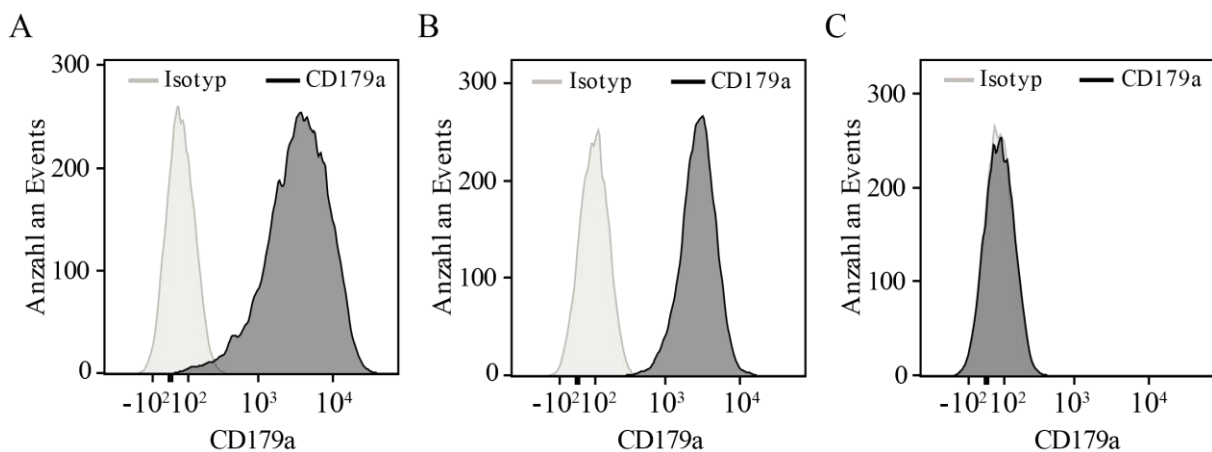


Abbildung 69: Validierung der Spezifität des Anti-CD179a-Antikörpers

Analyse der CD179a-Expression auf der Zelloberfläche durch Färbung der CD179a-positiven RCH-ACV- (A) und SMS-SB-Zellen (B) und der CD179a-negativen DG75-Zellen (C) mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer APC-gekoppelten Isotypkontrolle gefärbt. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit FlowJo ausgewertet und dargestellt.

In den CD179a-positiven RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen ist ein CD179a-Signal zu erkennen, das sich vom Signal der Isotypkontrolle abhebt. In DG75-Zellen ist hingegen erwartungsgemäß keine Expression des CD179a-Proteins nachweisbar. Beide Kurven sind nahezu deckungsgleich.

Nach erfolgreicher Funktionalitätsüberprüfung des CD179a-Antikörpers wurde der Knockdown von CD79a in RCH-ACV-Zellen durchgeführt. Dies erfolgte durch lentivirale Transduktion des induzierbaren Expressionsplasmids LT3-GECIR, das drei unterschiedliche shRNAs, gerichtet gegen die mRNA von CD79a und eine shRNA, die gegen eine nicht in der Zelle exprimierte cDNA (Kontrollsequenz) gerichtet ist, exprimiert. Da die erzielte Transduktionseffizienz nicht ausreichte um Effekte auf die Proteinexpression zu erzielen, wurden die transduzierten Zellen mit Hilfe des in dem Expressionsplasmid codierten fluoreszierenden Reporters mCherry mittels Durchflusszytometrie angereichert.

Mit den angereicherten Zellen wurde 72 h nach Induktion der shRNA-Expression ein Western Blot durchgeführt und die Expression von CD79a untersucht (siehe Abbildung 70).

Alle drei verwendeten shRNA-Sequenzen gegen CD79a zeigen einen effizienten Knockdown des Proteins CD79a gegenüber der Kontroll-shRNA.

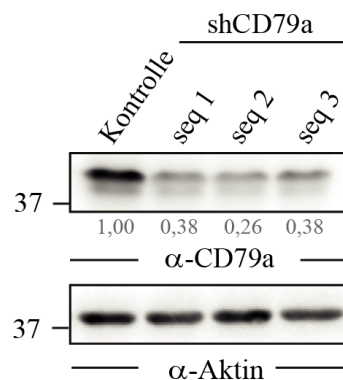


Abbildung 70: Knockdown von CD79a in RCH-ACV

Immunologische Detektion von CD79a in RCH-ACV-Zellen 72 h nach Induktion der Expression der Kontrollsequenz „Ren“ oder eine von drei CD79a-shRNAs (seq 1 - 3). Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der Zellen integriert wurde. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte mit 3 µg/ml Doxycyclin. Als Beladungskontrolle diente Aktin. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms ImageJ. Die relative CD79a-Expression der Kontroll-shRNA wurde dabei auf 1 gesetzt.

Um die Oberflächenexpression des prä-BZR in den oben beschriebenen CD79a-Knockdown-Zellen zu testen, wurden diese 72 h nach Induktion der shRNA-Expression nach erfolgreichem Fc-Rezeptorblock mit dem oben beschriebenen CD179a-Antikörper gefärbt und die Oberflächenexpression des prä-BZR am Durchflusszytometer untersucht (siehe Abbildung 71, nächste Seite). Als Färbekontrolle dient ein APC-gekoppelter IgG Antikörper (Isotypkontrolle).

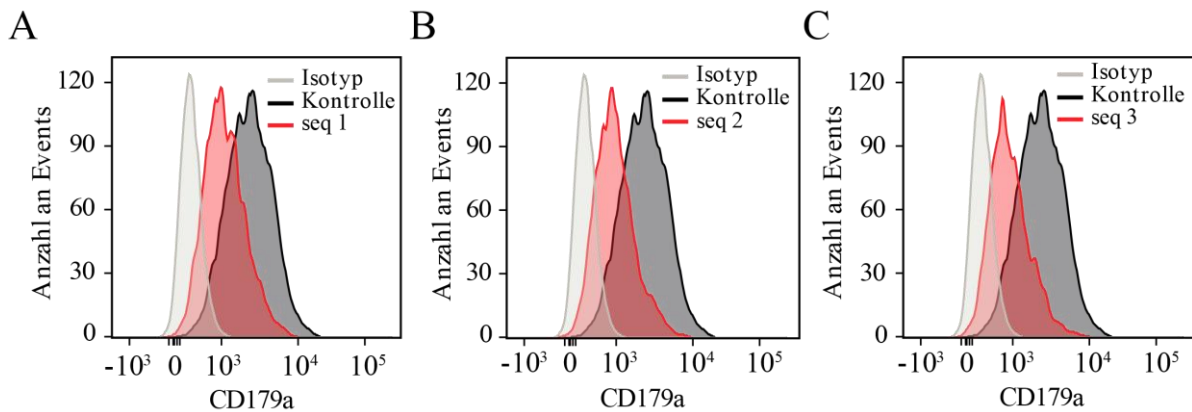


Abbildung 71: prä-BZR-Oberflächenexpression nach induziertem CD79a-Knockdown in RCH-ACV-Zellen

Analyse der CD179a-Expression auf der Zelloberfläche von RCH-ACV-Zellen 72 h nach Induktion der Expression der Kontrollsequenz „Ren“ (Kontrolle) oder eine von drei CD79a-shRNAs (seq 1 - 3) mit 3 µg/ml Doxycyclin. Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der Zellen integriert wurde. Als Färbekontrolle wurde eine APC-gekoppelte Isotypkontrolle verwendet. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer, die Datenauswertung mit FlowJo.

Es zeigt sich, dass alle drei verwendeten CD79a-Knockdownsequenzen erwartungsgemäß eine Reduktion des prä-BZRs auf der Zelloberfläche hervorrufen. Das jeweilige Maximum des Histogramms (Peak) der gefärbten Zellen mit CD79a-Knockdown ist im Vergleich zu den Kontrollzellen nach links verschoben und liegt nun zwischen dem Peak der Isotypkontrolle und der gefärbten Kontrollzellen. Eine Restexpression des prä-BZRs ist 72 h nach Induktion des CD79a-Knockdowns noch vorhanden.

4.8.2 Effekte auf die Zellproliferation nach Verlust des prä-BZRs

Um die Effekte des CD79a-Knockdowns auf die Proliferation von RCH-ACV-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst ein sog. Kompetitions-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die in Abbildung 70 beschriebenen RCH-ACV-Zellen, die zur Expression einer Kontroll-shRNA (Kontrollzellen) oder einer shRNA-Sequenz, die gegen die mRNA von CD79a gerichtet ist mit Lentiviren transduziert worden sind mit nicht-transduzierten RCH-ACV-Zellen (Wildtyp) im Verhältnis von 1 : 1 gemischt. Nach Zugabe des Induktors Doxycyclin (hier: 3 µg/ml) exprimieren transduzierte Zellen (mCherry+) neben der jeweiligen shRNA auch den Fluoreszenzmarker GFP. Über diesen kann der Anteil an transduzierten und induzierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp und nicht-induzierten Zellen durch Messungen am Durchflusszytometer über einen Zeitraum von mehreren Tagen verfolgt werden.

In Abbildung 72 (siehe nächste Seite) sind die jeweiligen Mittelwerte von drei Durchläufen des Kompetitions-Assays zu sehen, bei dem die Proliferation der Zellen über einen Zeitraum von zehn Tagen verfolgt wurde. Es zeigt sich, dass die Expression von GFP in den mit dem Wildtyp gemischten CD79a-Knockdown-Zellen gegenüber den Kontrollzellen abnimmt. Der Effekt ist

bei allen drei Knockdownsequenzen vergleichbar und erreicht in dem getesteten Zeitraum einen relativen Wert von $\leq 0,5$.

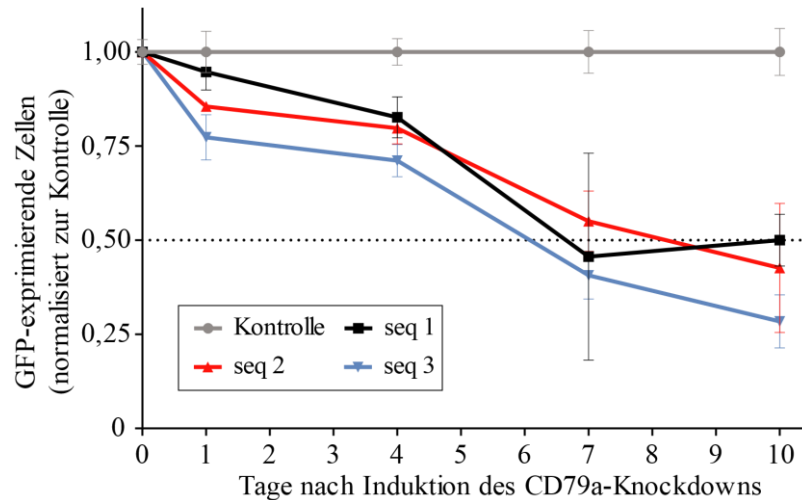


Abbildung 72: Kompetitiver Assay mit RCH-ACV-Zellen nach Induktion des CD79a-Knockdowns

Proliferation von RCH-ACV-Zellen im kompetitiven Assay nach Induktion des CD79a-Knockdowns durch Expression von 3 unterschiedlichen CD79a-shRNAs (seq 1 - 3). Als Kontrollzellen diente Zellen, die nach Induktion die Kontroll-shRNA „Ren“ exprimierten. Als shRNA-Expressionsplasmid wurde der Vektor LT3-GECIR verwendet, der mittels lentiviraler Transduktion stabil in das Genom der jeweiligen Zellen integriert wurde. Die Induktion der jeweiligen shRNA erfolgte über die Gesamtdauer des Experimentes (10 Tage) mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin. Der Anteil an shRNA- bzw. Kontrollsequenz-exprimierender Zellen (GFP-positive Zellen) an der Gesamtpopulation wurde an den angegebenen Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und auf den jeweiligen Anteil der Zellen der Kontrolle am jeweiligen Messtag normalisiert. Die Kontrolle wurde dabei auf 1 gesetzt. (n = 3)

4.8.3 Deregulation des PI3K/AKT-Signalwegs nach CD79a-Knockdown

Um nähere Hinweise auf potenziell deregulierte Signalwege in den RCH-ACV-Zellen nach CD79a-Knockdown zu erhalten, wurden in diesen Zellen deregulierte Tyrosin-phosphorylierte Proteine mittels Massenspektrometrie untersucht. Eine schematische Darstellung der Probenprozessierung der SILAC-markierten RCH-ACV-Zellen ist in Abbildung 73 zu sehen.

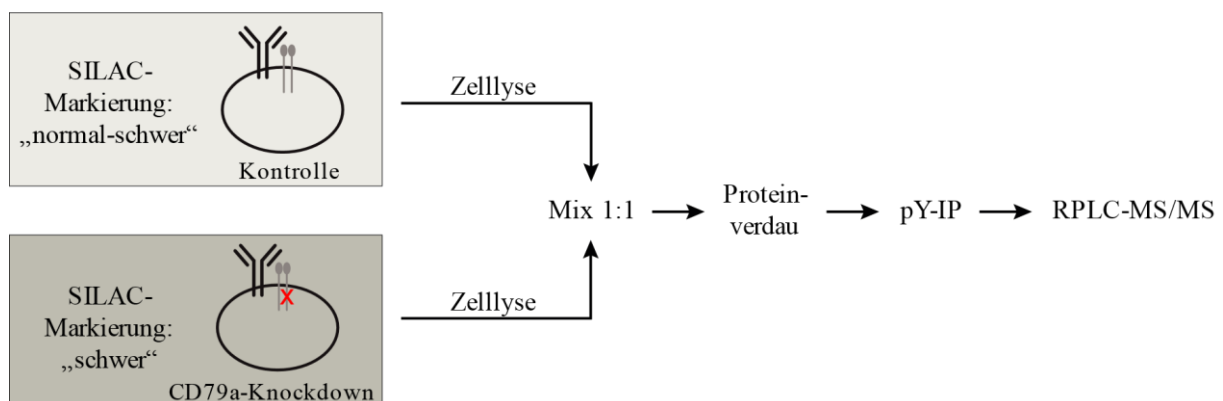


Abbildung 73: Schematische Darstellung der Probenprozessierung zur Analyse des pYomes in RCH-ACV-Zellen nach CD79a-Knockdown

Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Für die pYome-Analyse wurden RCH-ACV-Zellen verwendet, die in Abbildung 70 bereits charakterisiert wurden. Um frühe Effekte zu detektieren, erfolgte die Lyse von vorher SILAC-markierten Zellen 48 h nach Induktion des Knockdowns mit Doxycyclin (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Da shRNA-Sequenz 3 („seq 3“) gegen CD79a im kompetitiven Assay im Vergleich zu den anderen beiden shRNA-Sequenzen den stärksten Effekt aufwies (siehe Abbildung 72), wurde diese für die folgende Analyse ausgewählt und verwendet.

Abbildung 74 zeigt identifizierte Tyrosin-phosphorylierte Proteine in RCH-ACV-Zellen nach CD79a-Knockdown. Proteine, die eine signifikante Regulation der jeweiligen Phosphorylierung aufweisen, sind markiert.

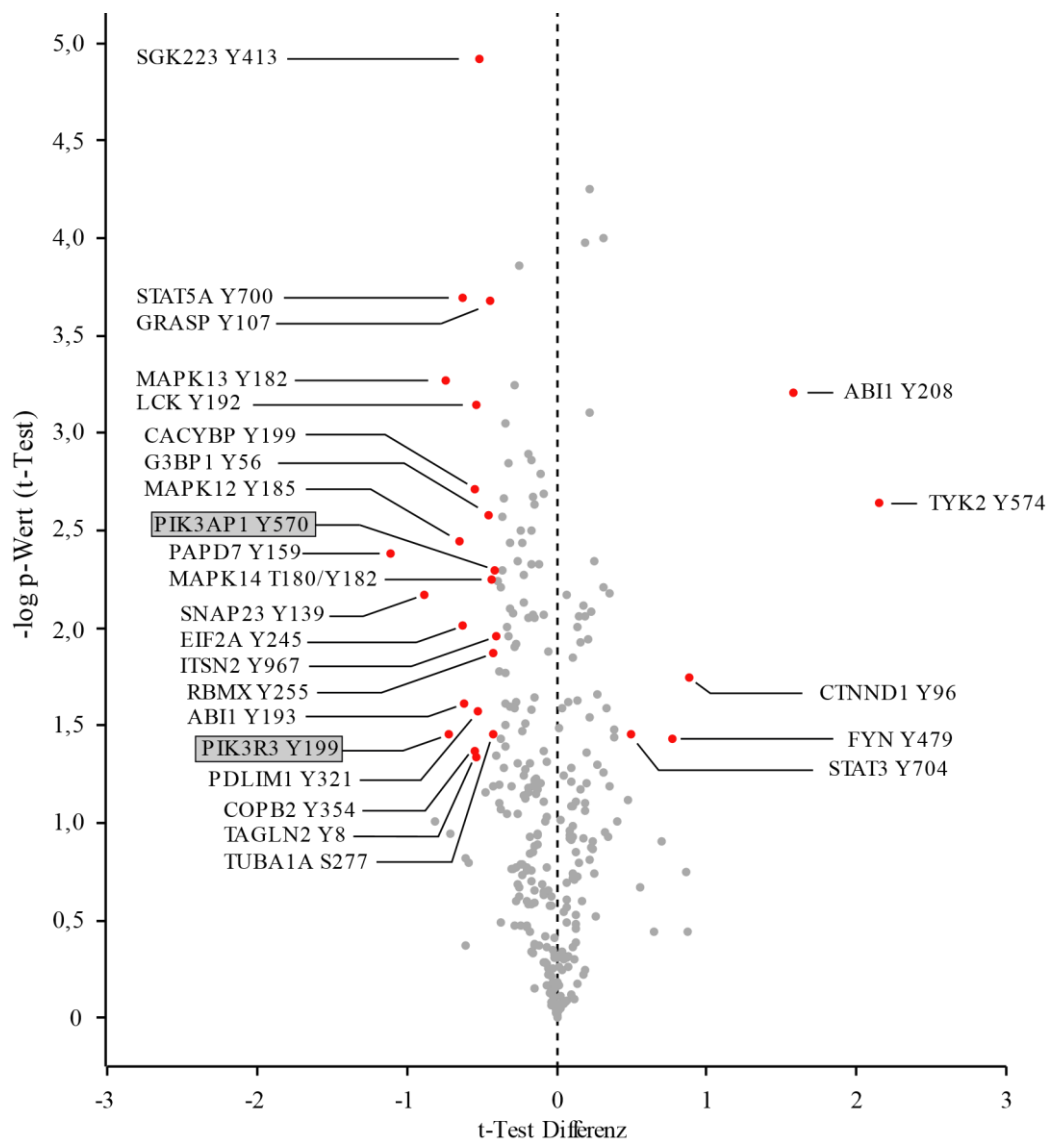


Abbildung 74: Regulierte Phosphoproteine nach CD79a-Knockdown in RCH-ACV-Zellen

Scatter Plot von angereicherten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in RCH-ACV-Zellen 48 h nach Induktion des CD79a-Knockdowns durch Expression von shRNA gegen CD79a („seq 3“). Als Kontroll-shRNA wurde „Ren“ verwendet. Die Darstellung der massenspektrometrischen Daten erfolgte mit Perseus. Ein Signifikanztest wurde durch einen einseitigen t-Test mit kombiniertem Ausreißertest („Outlier A“) in Perseus durchgeführt. Signifikant regulierte Phosphoproteine sind farblich markiert und mit der jeweiligen Aminosäureposition der Phosphorylierung beschriftet. (n = 2)

Neben einer Reihe von bisher noch nicht mit dem (prä-)BZR-Signalweg verknüpfen Proteinen konnte durch Identifikation der regulatorischen Untereinheit γ der PI3K (PI3KR3) der Hinweis auf einen deregulierten PI3K/AKT-Signalweg gefunden werden.

Mit der Identifikation von PIK3AP1 (*PI3K adapter protein 1*), auch unter dem Namen BCAP (*B cell adapter protein*) bekannt, ist eine weitere Assoziation mit dem PI3K/AKT-Signalweg möglich. Im Zuge der Aktivierung des BZR-Signalweges wird BCAP phosphoryliert und dient als solches als Adapterprotein für die PI3K, die an die Zellmembran lokalisiert und dort aktiviert wird.⁹⁶ In Folge der verminderten Phosphorylierung von BCAP wird die Translokation, sowie die Aktivierung der PI3K gehemmt und führt zu einem proliferativen Nachteil von RCH-ACV-Zellen nach CD79a-Knockdown.

4.8.4 Inhibition der Kinase SYK in der B-ALL

4.8.4.1 Inhibition von SYK durch PRT062607 führt zur Apoptose in RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen

Die Kinase SYK ist Hauptmediator im BZR-Signalweg. Die Rolle von SYK im prä-BZR-Signalweg ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Durch Inhibition von SYK können Rückschlüsse auf SYK-regulierte Signalwege zum Beispiel durch massenspektrometrische Analysen geschlossen werden. Für die Inhibition von SYK wurde auf den Inhibitor PRT062607 zurückgegriffen, der sich gegenüber dem SYK-Inhibitor R406 in Burkitt-Lymphom-Zellen aufgrund seiner höheren Spezifität bewährt hat (siehe Abbildung 17).

Zunächst sollte geklärt werden, ob die Inhibition von SYK durch PRT062607 einen Einfluss auf die Viabilität der RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen besitzt.

Hierfür wurden RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PRT062607 über einen Zeitraum von einer Woche inkubiert und anschließend die Apoptoserate über einen Annexin-basierten Apoptose-Assay bestimmt.

In Abbildung 75 (siehe nächste Seite) sind die Ergebnisse des Apoptose-Assays in den beiden Zelllinien dargestellt. Hierbei ist der Anteil an viablen Zellen in Abhängigkeit zur Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Beide Zelllinien zeigen einen dosisabhängigen Effekt auf die Viabilität der Zellen. Mit zunehmender Inhibitorkonzentration steigt die Apoptoserate. Der Kurvenverlauf der Regressionskurve zeigt einen sigmoidalen Charakter wie er bei Inhibitortitrationen typisch ist. Der berechnete IC₅₀-Wert des SYK-Inhibitors PRT062607 lag in den RCH-ACH- bzw. SMS-SB-Zellen bei 107 nM bzw. 419 nM.

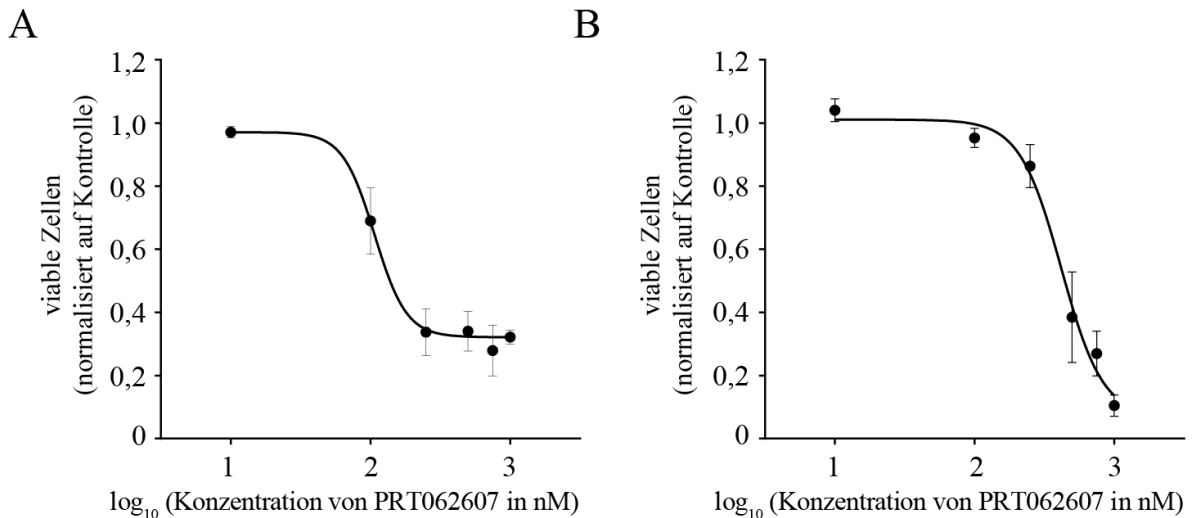


Abbildung 75: Inhibition von SYK durch PRT062607 führt zur Apoptose in RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen

Apoptose-Assay mit RCH-ACV- (A) und SMS-SB-Zellen (B), die 7 Tage mit dem SYK-Inhibitor PRT062607 titriert wurden. Die Abbildungen zeigen den relativen Anteil Annexin- und 7-AAD-negativer (viabler) Zellen nach SYK-Inhibition im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit DMSO inkubiert wurden. Der Apoptose-Assay wurde mit FlowJo ausgewertet, die Regressionskurven („*nonlinear regression*“) aus den Werten der jeweiligen Inhibitor-Konzentration mit der Software GraphPad Prism dargestellt. (n = 3)

Der Apoptose-Assay in (A) erfolgte in Zusammenarbeit mit Khoulood Koudri.

4.8.4.2 Apoptotische Effekte nach SYK-Inhibition werden in B-ALL-Zellen über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt

Wie in Abbildung 75 gezeigt, gehen RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen nach Inhibition der Kinase SYK in Apoptose. Im Folgenden sollte daher geklärt werden, über welchen Signalweg dieser Effekt vermittelt wird.

Da der PI3K/AKT-Signalweg als tonischer Signalweg im Burkitt Lymphom eine wesentliche Rolle bei der Viabilität der Zellen spielt, wurde selbiger zunächst auch in den B-ALL-Zelllinien untersucht.

Hierfür wurden die zwei prä-B-Zelllinien (RCH-ACV und SMS-SB) mit unterschiedlichen Konzentrationen an PRT062607 für 1 h inkubiert und danach lysiert. Anschließend erfolgte eine Analyse der Proteinexpression von AKT bzw. pAKT mittels Western Blot (siehe Abbildung 76, nächste Seite).

Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von AKT mit zunehmender Inhibitor-Konzentration abnimmt und bei hohen Inhibitor-Konzentrationen nicht mehr nachweisbar ist.

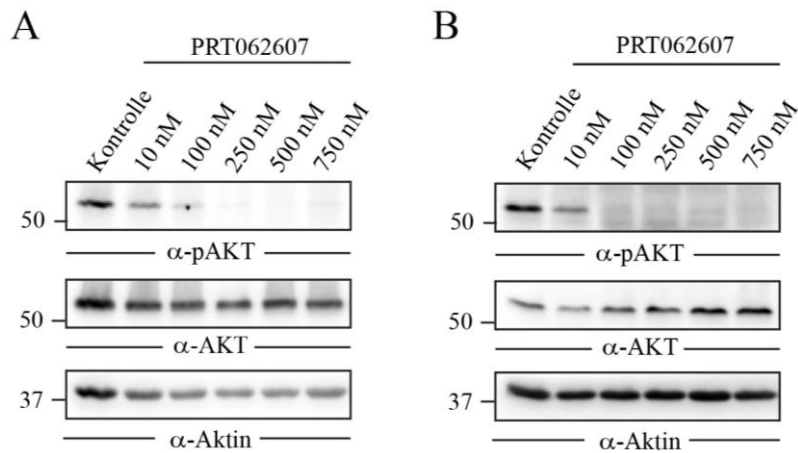


Abbildung 76: PRT062607 hemmt die basale Phosphorylierung von AKT in RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen

Immunologische Detektion von pAKT (Ser473) und AKT in RCH-ACV- (A) und SMS-SB-Zellen (B), die mit den angegebenen Konzentrationen des SYK-Inhibitors PRT062607 für 1 h behandelt wurden. Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Kontrolle für die Inhibitorbehandlung. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Der molekulare Größenstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

Um den Einfluss von PRT062607 auf den PI3K-Signalweg näher zu charakterisieren, wurden massenspektrometrische Analysen von angereicherten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen nach Inhibition von SYK durch PRT062607 durchgeführt. Abbildung 77 zeigt die schematische Darstellung der Probenprozessierung für diesen Ansatz inklusive der SILAC-Markierung der Zellen.

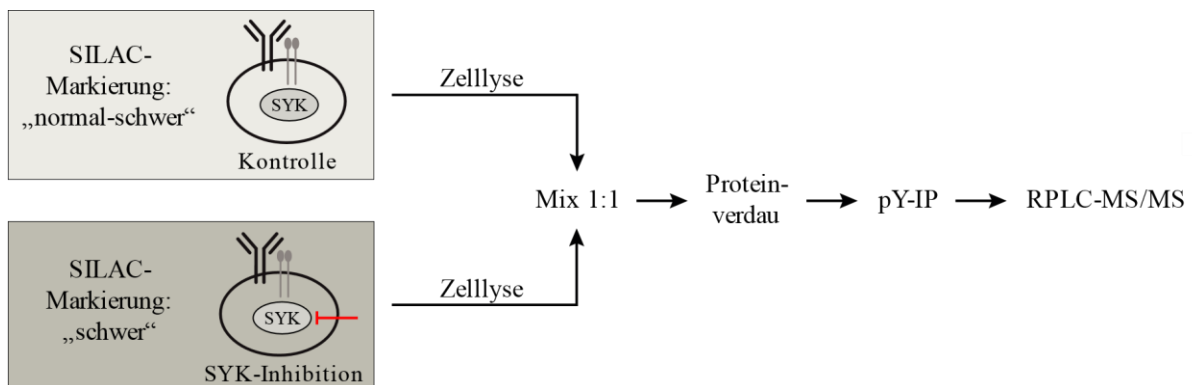


Abbildung 77: Schematische Darstellung der Probenprozessierung zur Analyse des pYomes in RCH-ACV-Zellen nach Inhibition von SYK

Die Abbildung ist modifiziert nach Walter und Kollegen²⁴³, Copyright erhalten von *Blood Journal*.

Abbildung 78 zeigt identifizierte angereicherte Tyrosin-phosphorylierte Proteine in RCH-ACV- bzw. SMS-SB-Zellen nach Inhibition von SYK.

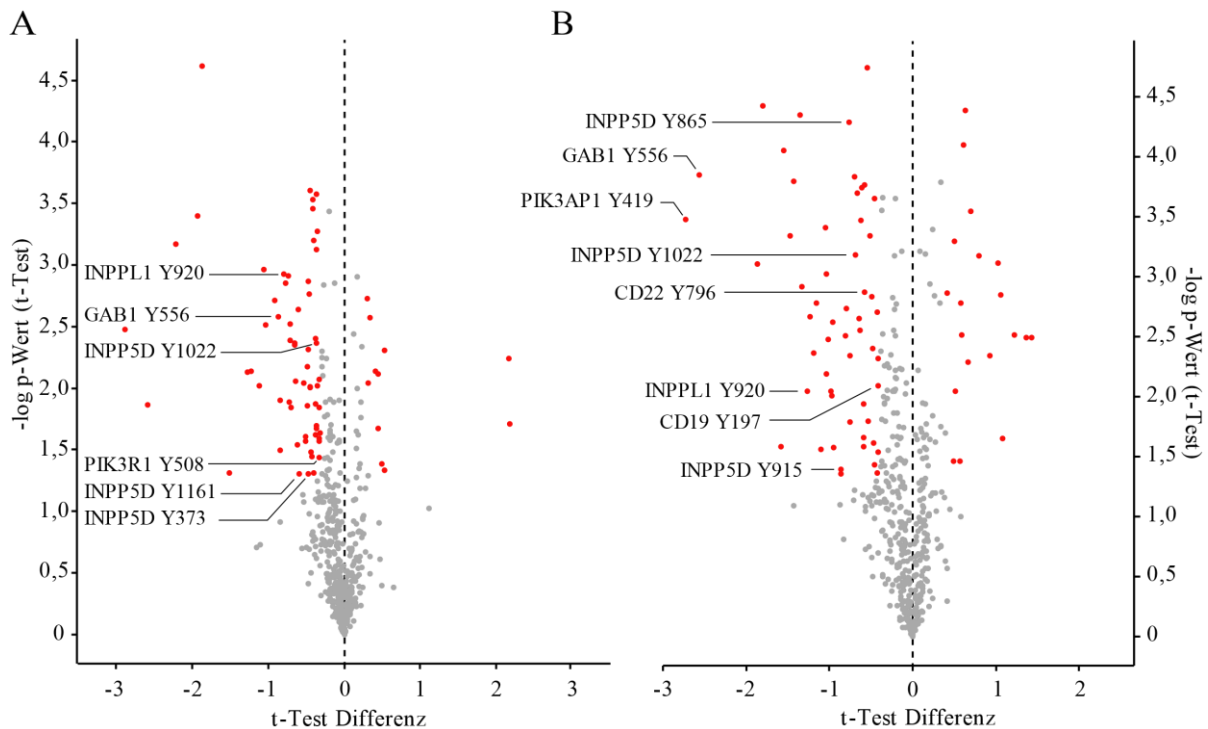


Abbildung 78: Regulierte Phosphoproteine nach SYK-Inhibition in RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen

Scatter Plot von angereicherten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in RCH-ACV- (A) und SMS-SB-Zellen (B) nach Inhibition von SYK durch PRT062607 (250 nM) für 1 h. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit DMSO inkubiert wurden. Die Darstellung der massenspektrometrischen Daten erfolgte mit Perseus. Ein Signifikanztest wurde durch einen einseitigen t-Test mit kombiniertem Ausreißertest („Outlier A“) in Perseus durchgeführt. Signifikant regulierte Phosphoproteine sind farblich markiert und ausgewählte Phosphoproteine mit der jeweiligen Aminosäureposition der Phosphorylierung beschriftet. (n = 2)

In beiden Zelllinien sind Hinweise auf die Beteiligung des PI3K/AKT-Signalweges zu erkennen. So zeigt sich in RCH-ACV-Zellen eine signifikante Regulation der Phosphorylierung in der regulatorischen Untereinheit α der PI3K (PIK3R1) und in dem von SYK phosphorylierten GAB1-Protein. Letzteres erfährt auch in den SMS-SB-Zellen eine Regulation in seiner Phosphorylierung. GAB1 fungiert nach Phosphorylierung als Adapter für die PI3K und kann so den BZR-Signalweg verstärken.⁹⁴

In beiden Zellen sind außerdem mehrere Phosphorylierungsstellen von INPP5D, auch SHIP1 genannt und eine Phosphorylierungsstelle von INPP5D, auch SHIP2 genannt, reguliert. SHIP ist eine Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-5-phosphatase, die das 5'-Phosphat von PIP3, das als Adapterprotein für AKT fungiert, abspaltet. Infolgedessen wird AKT nicht mehr an die Plasmamembran rekrutiert, um dort von PDK1 durch Phosphorylierung aktiviert werden zu können. So wirkt SHIP durch Inhibition der AKT-Aktivierung als negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalweges.²⁶⁸

In den SMS-SB-Zellen kann des Weiteren, wie in den RCH-ACV-Zellen nach CD79a-Knockdown, ein Bezug zum PI3K/AKT-Signalweg über das Adapterprotein PIK3AP1, auch BCAP genannt, hergestellt werden. Zudem zeigt sich eine reduzierte Phosphorylierung in CD19, das die (prä-)BZR-Signaltransduktion über AKT durch Rekrutierung der PI3K an die Zellmembran ermöglicht.²⁶⁹ Ähnliches ist auch für CD22 beschrieben, dessen Phosphorylierung in den SMS-SB-Zellen nach SYK-Inhibition reduziert ist. Es konnte gezeigt werden, dass CD22 im Zuge der Aktivierung der BZR-Signaltransduktion phosphoryliert wird und als solches ebenfalls als Adapter für die PI3K fungiert.²⁷⁰

5. Diskussion

5.1 Inhibition des tonischen BZR-Signalwegs mit therapeutischem Potenzial

Von ausgereiften B-Zellen, von denen die Zellen des Burkitt Lymphoms abstammen, ist bekannt, dass sie von einem tonischen BZR-Signalweg abhängen, der über den BZR und weiterführend über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt wird. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass es weiterhin Bestrebungen gibt, diesen essentiellen Signalweg als therapeutischen Ansatzpunkt zu nutzen. Dies ist im Falle des BZR-Signalweges mit Hilfe von Inhibitoren möglich, die die einzelnen im BZR-Signalweg hintereinander geschalteten Kinasen spezifisch hemmen können. Im Folgenden wird die Inhibition einzelner Effektorinasen des BZR-Signalweges und deren daraus resultierendes therapeutisches Potenzial diskutiert.

5.1.2 Inhibition der SRC-Kinasen

Die Kinase LYN gehört zur Familie der SRC-Kinasen und ist eine der proximal agierenden Kinasen des BZRs, die ITAMs und SYK phosphorylieren kann und bei der Initiierung und Regulation des BZR-Signalwegs eine wesentliche Rolle spielt.²⁷¹ Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Knockdown von LYN in DG75-Zellen zeigte jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation der Zellen wie er nach Inhibition von HSP90 auftritt, die letztlich zur Apoptose der Zellen führt. Dies ist konsistent mit Ergebnissen in der Literatur. So konnte gezeigt werden, dass die Kinase SYK die Funktion von LYN hinsichtlich der Phosphorylierung der ITAMs prinzipiell übernehmen kann.³⁴ Des Weiteren zeigen Charakterisierungen von B-Lymphozyten in einer LYN-defizienten-Maus, dass die Initiierung des BZR-Signalwegs im Vergleich zu Zellen mit LYN-Expression zwar zeitlich verzögert, aber generell möglich ist.²⁷² Aufgrund der Redundanz der einzelnen Kinasen der SRC-Familie kann der Weg nur über eine gleichzeitige Inhibition mehrerer Mitglieder dieser Familie gehen. In vielen Zelllinien des B-Zell-Lymphoms zeigen SRC-Kinasen im Gegensatz zu B-Zellen eine Hyperaktivität, die zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen führt.²⁷³ Die Inhibition der SRC-Kinasen durch Dasatinib führte hier zu einer verminderten Proliferation und erhöhter Apoptose. Cozzi und Kollegen²⁷⁴ konnten vergleichbare Effekte in den zwei Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji nach Inhibition der SRC-Kinasen beobachten. Bislang gibt es jedoch keine Studie, die SRC-Kinasen-Inhibitoren am Patienten mit Burkitt Lymphom hinsichtlich eines therapeutischen Nutzens untersucht haben.

5.1.3 Inhibition der Kinase SYK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die dem BZR proximal gelegene Kinase SYK gezielt durch PRT062607 (Cerdulatinib) inhibiert. SYK verknüpft den BZR mit intrazellulären Signalwegen und ist somit essentiell für die Weiterleitung des BZR-Signals. So zeigen Knockdownexperimente in Burkitt-Lymphom-Zelllinien, dass die Viabilität der Zellen nach Verlust der Kinase stark verringert und mit der Viabilität der Zellen nach einem CD79a-Knockdown, der zum Verlust des BZR auf der Zelloberfläche führt vergleichbar ist.²⁷⁵

Die Rolle von SYK ist weniger als Strukturprotein zu sehen, sondern ist auf ihre Kinasefunktion, also in der Phosphorylierung von Effektorproteinen zu reduzieren. Es gibt mehrere Inhibitoren, die die Kinasefunktion von SYK inhibieren und die in verschiedenen klinischen Studien Verwendung fanden.²⁷⁶ Im Rahmen dieser Arbeit fiel die Wahl auf PRT062607 als potenten SYK-Inhibitor, da antiproliferative Effekte des Inhibitors in Kombination einer Initiation der Apoptose durch aktivierte Caspase-3 im Burkitt Lymphom und im diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) bereits beschrieben sind.^{277,278}

Um die Wirkung des SYK-Inhibitors PRT062607 zu testen, wurde dieser in Daudi-Zellen titriert und die Phosphorylierung der BZR-Effektorkinase AKT untersucht. Es konnte ein dosisabhängiger Effekt des Inhibitors im Western Blot nachgewiesen und die Funktionalität des Inhibitors bestätigt werden. Aus diesen Daten wurde auch die Arbeitskonzentration von 250 nM für PRT062607 für alle Experimente festgelegt, die auch in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ramos zu einer vollständigen Inhibition der BZR-Signaltransduktion durch Inhibition der Phosphorylierung von ERK und AKT führte.²⁷⁹ Im humanen Serum konnte *in vivo* bereits gezeigt werden, dass der IC50-Wert von PRT062607 ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich liegt und solche Dosen im Serum nach oraler Applikation beim Menschen als tolerabel angesehen werden können.^{280,281}

Zwar zeigte der SYK-Inhibitor PRT062607 bei einer Konzentration von $c = 250$ nM im Western Blot ein reduziertes Phosphorylierungsmuster (sowohl basal, als auch nach Stimulation des BZR-Signalweges), jedoch konnte in einem durchgeführten Annexin-basierten Apoptose-Assay keine signifikant erhöhte Apoptoserate der Zellen nach 7-tägiger Inkubation mit PRT062607 in Konzentrationen von $c \leq 1$ μ M festgestellt werden. Trotz Assoziation der regulierten Phosphoproteine nach SYK-Inhibition mit dem PI3K/AKT-Signalweg, zeigten insbesondere die identifizierten regulatorischen Untereinheiten der PI3K (PIK3R1 und PIK3R3) keine signifikante Regulation.

Obwohl es sich bei der Erhöhung von Phosphatidylserin (PS) auf der Membranoberfläche im Zuge der Initiation der Apoptose um einen universellen Mechanismus handelt, der laut Martin und Kollegen²⁸² unabhängig des pro-apoptotischen Stimulus ist, wird auch in der Literatur die Apoptose von Burkitt-Lymphom-Zellen nach SYK-Inhibition nicht über den klassischen Annexin-basierten Apoptose-Assay beschrieben, der PS auf der Zelloberfläche nachweist. So ordneten Tauzin und Kollegen²⁸³ dem SYK-Inhibitor R406 in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji mittels einer Propidiumiodid-Färbung ein apoptotisches Potenzial zu, das ab einer

Konzentration von 3 μM auftrat. Roders und Kollegen²⁸⁴ beobachteten hingegen eine Änderung der Zellmorphologie in BL41 nach SYK-Inhibition durch BAY61-3606 und erklärten dies mit einer erhöhten Apoptoserate hervorgerufen durch Reduktion des STAT3-regulierten Mcl-1-Proteins.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass DG75- und Daudi-Zellen nach Inhibition von SYK durch PRT062607 in Konzentrationen von $c \leq 1 \mu\text{M}$ eine Reduzierung ihrer Viabilität erfahren, ist davon auszugehen, dass die Zellen auch nach einer Erhöhung der InhibitorKonzentration über einen Wert von 1 μM einen vergleichbaren apoptotischen Phänotyp zeigen, der mittels Annexin-basiertem Apoptose-Assay nachgewiesen werden kann. Dieser könnte jedoch nicht mehr nur allein auf die Inhibition der Kinase SYK zurückzuführen sein. Coffey und Kollegen²⁷⁷ konnten in einem Kinaseassay zeigen, dass PRT062607 im Vergleich zu SYK eine höhere Affinität zu anderen Kinasen wie zum Beispiel zu den Janus-Kinasen (JAK1, JAK2 und JAK3) aufweist, die unter Umständen zu einem apoptotischen Effekt des Inhibitors bei höheren Konzentrationen beitragen. So zeigt zum Beispiel eine konditionale JAK1-Knockout-Maus eine reduzierte Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT6, die u. a. Zellproliferation und Apoptose regulieren können.^{285–287}

5.1.4 Inhibition von BTK

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von BTK durch zum Beispiel Ibrutinib in der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und in gewissen Subtypen des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) einen therapeutischen Nutzen besitzt.^{288,289}

Demnach sprechen Patienten mit DLBCL eines ABC-Subtyps im Gegensatz zum GCB-Subtyp besser auf eine Ibrutinib-Behandlung an. Zwar zeigen beide Subtypen eine Abhängigkeit vom BZR, Mutationen in Effektorproteinen des BZR-Signalwegs (zum Beispiel CD79, CARD11 und/oder MYD88) aktivieren im ABC-Subtyp jedoch einen Signalweg über NF- κB , der über BTK vermittelt wird.^{290–294} Im Burkitt Lymphom ist diese Signalkaskade jedoch für die Viabilität der Zellen nicht relevant.^{295,296} Knockout-Experimente, wie sie zum Beispiel von Nyhoff und Kollegen²⁹⁷ durchgeführt worden sind, zeigen, dass BTK in ausgereiften B-Zellen, nicht aber während der Entwicklung derselben verzichtbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies auch über Inhibitionsversuche von BTK in DG75-Zellen gezeigt werden. Hier hemmte Ibrutinib effektiv die Kinaseaktivität von BTK bei Konzentrationen im niedrigen Nanomolarbereich und reduzierte die Phosphorylierung der von Park und Kollegen²⁹⁸ beschriebenen Autophosphorylierungsstelle an Tyrosin 223. Ein Effekt auf die ATP-Produktion konnte im Inhibitorscreen aber erst bei Konzentrationen von über 1000 nM beobachtet werden, der vermutlich nicht auf die primäre Wirkung von Ibrutinib, der Inhibition von BTK, zurückzuführen ist.

Da in einem durchgeführten, aber bislang noch unpublizierten CRISPR-Screen (Daten von James Phelan) ebenso gezeigt werden konnte, dass der Verlust von BTK in Burkitt-Lymphom-Zellen keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat, kann zusammengefasst werden, dass BTK im Burkitt Lymphom als therapeutische Zielstruktur ungeeignet ist.

5.1.5 Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges

Der PI3K/AKT-Signalweg ist von enormer Bedeutung für Tumorzellen. Über diesen Signalweg können essentielle zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und -entwicklung, Viabilität und Metabolismus reguliert werden.²⁹⁹ Eine Chemoresistenz von Tumorzellen ist oft mit der Überexpression und Aktivierung von AKT verknüpft.³⁰⁰ Aus diesem Grund stellt dieser Signalweg generell eine geeignete Zielstruktur für die Behandlung von Tumorzellen dar.³⁰¹ Im Burkitt Lymphom wird das tonische BZR-Signal über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt. Schmitz und Kollegen²⁷⁵ konnten folglich eine verminderte Viabilität der Zellen nach Inhibition der PI3K durch BKM120 beobachten.

5.2 Das tonische BZR-Signal im Burkitt Lymphom ist abhängig von funktionellen HSP90s

Erste Hinweise, dass HSP90 mit dem BZR-Signalweg eng verknüpft ist, konnten durch die Analysen des BZR-Signalweges mittels Massenspektrometrie gewonnen werden. Hier zeigte sich, dass die Phosphorylierung von HSP90AB1 an Tyrosin Y596 nach Aktivierung des BZR-Signalweges erhöht wurde. Für das Klientprotein p60^{v-tsc} konnte bereits gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von HSP90 negativ mit der Proteinbindung korrelieren kann.³⁰² Analog hierzu führt eine Dephosphorylierung von HSP90 durch das Co-Chaperon PP5/Ppt1 zu einer Förderung der Chaperonfunktion.^{303,304} Es ist vorstellbar, dass HSP90 in nicht-aktivierten B-Zellen mit Proteinen des BZR-Signalweges interagiert, so zum Beispiel beschrieben für BTK, LYN und AKT^{261,305} und diese Interaktion im Zuge der Aktivierung des BZR-Signalwegs aufgrund einer HSP90-Phosphorylierung aufgelöst werden könnte. So würden wichtige Effektoren des BZR-Signalwegs für die Signaltransduktion zur Verfügung gestellt werden. Massenspektrometrische Analysen mit Zellen, in denen die Kinase-Aktivität von SYK mit PRT062607 inhibiert wurde, zeigten eine verminderte Phosphorylierung von HSP90, so dass die Möglichkeit besteht, dass SYK mit der Phosphorylierung von HSP90 in Zusammenhang steht.

Die direkte Abhängigkeit der Burkitt-Lymphom-Zellen von HSP90 konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Inhibitionsversuche mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 gezeigt werden, die nach Inhibition von HSP90 in Apoptose gingen. Eine Analyse von Signalwegen, in denen regulierte Phosphoproteine nach HSP90-Inhibition inkludiert sind, identifizierte den BZR-Signalweg an vierter Position nach Signalwegen, die die Phagozytose und das Immunsystem betreffen.

5.3 HSP90-Inhibition beeinflusst den tonischen BZR-Signalweg über SYK

Dass die Effekte nach HSP90-Inhibition intrinsisch auftreten, konnte über einen Ausschluss der Beteiligung des BZR an den Effekten gezeigt werden. So zeigte der BZR nach HSP90-Inhibition keine Reduktion auf der Zelloberfläche. In der Tat war die Tendenz einer Erhöhung der Oberflächenexpression zu erkennen. Dies könnte über einen Kompensationsmechanismus der Zellen zu erklären sein. Dieser könnte einerseits eine Abschwächung des tonischen Signals nach HSP90-Inhibition durch erhöhte BZR-Expression auszugleichen versuchen oder andererseits Folge einer Störung der Internalisierung des Rezeptors sein, der an der Oberfläche akkumuliert. Nach Ausschluss der Kinasen LYN und BTK als möglicher Hauptmediator der Effekte nach HSP90-Inhibition richtete sich der Fokus auf die Kinase SYK.

In ausgereiften B-Zelllinien ist SYK essentiell für die Viabilität der Zellen. Der Knockdown von SYK wirkt toxisch.²⁷⁵ Die Effekte nach Inhibition von HSP90 in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien DG75 und Daudi sind vergleichbar mit einem SYK-Knockdown, da die Behandlung der Zellen mit den HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 zu einer Reduktion der Kinase führt und die Zellen in Apoptose gehen. Des Weiteren zeigt der SYK-Inhibitor PRT062607 vergleichbare Effekte auf die BZR-Signalwegseffektoren BLNK, ERK und AKT wie nach Inhibition von HSP90 durch AT13387 und STA-9090. Ebenso zeigt sich der physiologische Calciumflux nach BZR-Stimulation in DG75- und Daudi-Zellen nach HSP90- und SYK-Inhibition im gleichen Maße verändert, so dass nach Ausschluss der Kinasen LYN und BTK überwiegend die Kinase SYK als Mediator für die von HSP90-vermittelten Effekte angesehen werden kann.

5.4 Inhibition von Hitzeschock-Proteinen als Therapieform

Da HSPs nicht nur in Tumorzellen für die Homöostase der Zellen essentiell sind, sondern auch in nicht entarteten Zellen, stellte sich die Frage, inwieweit HSP90 eine mögliche therapeutische Zielstruktur darstellt um den BZR-Signalweg zu manipulieren. Erste Erkenntnisse lieferten Versuche von Blagosklonny und Kollegen³⁰⁶, die durch Verwendung des HSP90-Inhibitors Geldanamycin zeigen konnten, dass die Expression von mutiertem p53, nicht aber von Wildtyp-p53 von funktionellen HSP90-Proteinen abhängt. Es scheint, als würde der HSP90-Inhibitor eine stärkere Affinität zu HSP90-Komplexen aufweisen, die mit mutierten Proteinen assoziiert sind.

Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 selektiv gegen Tumorzellen wirken. Ein Phänomen, das bereits in der Literatur beschrieben ist.^{307,308} Demnach liegt HSP90 in Tumorzellen als Multichaperonkomplex mit hoher ATPase-Aktivität vor, wohingegen HSP90 in nicht-entarteten Zellen in einem eher ruhenden Zustand vorliegt.³⁰⁸ HSP90-Inhibitoren sind nicht nur spezifisch für Tumorzellen, sondern werden bevorzugt in Tumorgewebe aufgenommen und verschwinden aus dem Serum.³⁰⁹ Letzteres stellt durchaus ein Problem bei

der Auswahl der richtigen Dosierung der Inhibitoren in klinischen Studien dar, die sekundär über Marker wie CDK4, Raf-1, und/oder Hsp70 bestimmt werden (müssen).^{310,311}

Unabhängig des Dosierungsproblems zeigen bereits durchgeführte klinische Studien bei der Behandlung von soliden Tumoren eine hemmende Wirkung der HSP90-Inhibitoren auf das Tumorwachstum.^{312,313}

Trotz der Effektivität und Wirksamkeit der HSP90-Inhibitoren gibt es therapeutische Schwierigkeiten, die erstmals bei dem in Bakterien *Streptomyces hygroscopicus* natürlich vorkommenden HSP90-Inhibitor Geldanamycin und in abgeschwächter Form bei den Geldanamycinanaloga 17-AAG und 17-DMAG in Form von Hepatotoxizität auftraten.^{314,315} Die Weiterentwicklung von HSP90-Inhibitoren, bei denen auf den für die Toxizität verantwortlich gemachte Benzoquinon-Rest verzichtet wurde, löste diese Art von Probleme.³¹⁶

Weiterhin zu lösen ist jedoch die Problematik der Induktion der Hitzeschock-Reaktion, die bei den meisten HSP90-Inhibitoren auftritt, die wie zum Beispiel Geldanamycin die N-terminale ATP-Bindetasche vollständig blockieren.²⁰⁹ Durch Bindung der jeweiligen Inhibitoren kommt es so zu einem Verlust des transienten Komplexes von HSP90 mit Hitzeschockfaktor 1 (HSF1).³¹⁷ In Folge dessen trimerisiert freies HSF1 und wandert in phosphorylierter Form in den Zellkern.³¹⁸ Dort löst es durch Binden an sog. Hitzeschock-Bindeelemente die Transkription von einer Reihe von Hitzeschock-Proteinen aus, die der initialen Inhibition der Chaperonfunktion durch Inhibitoren entgegenwirkt, diese abschwächen oder sogar ganz aufheben kann.³¹⁹ In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Zhao und Kollegen³²⁰ mit X66 einen N-terminal wirkenden HSP90-Inhibitor beschrieben, der antitumorigene Effekte aufweist ohne eine Hitzeschockreaktion auszulösen. So wurde gezeigt, dass X66, im Gegensatz zu Geldanamycin, die ATP-Bindetasche nur teilweise besetzt und es dadurch womöglich zu keiner Dissoziation des HSP90-HSF1-Komplex kommt. Vergleichbare Effekte sind auch für sog. SMX-Inhibitoren beschrieben, die im Bereich der mittleren Domäne von HSP90 binden und C-terminal zu einer allosterischen Inhibition der Chaperonfunktion führen ohne eine Hitzeschock-Reaktion auszulösen.^{321,322}

Die Entwicklung von HSP90-Inhibitoren ist weit vorangeschritten. So wurden ca. 20 verschiedene Inhibitoren gegen HSP90 in klinischen Studien getestet, aber trotz des großen Potenzials noch keiner davon zugelassen (Stand 2016).³²³ Soll sich dies ändern, müssen HSP90-Inhibitoren entwickelt werden, die den therapeutischen Nutzen weiter erhöhen und im Gegenzug die potentielle Toxizität erniedrigen.

5.5 SYK ist ein Klientprotein von HSP90

Die Inhibition von HSP90 führt zu einer Reduktion der Kinase SYK in DG75- und Daudi-Zellen. Bis dato war jedoch noch ungeklärt über welchen Mechanismus dies erfolgt. Von HSP90-Klientproteinen ist beschrieben, dass diese nach HSP90-Inhibition destabilisiert und abgebaut werden.³²⁴ Mittels Immunpräzipitation war es möglich die Interaktion von SYK mit HSP90 zu zeigen und SYK als Klientprotein von HSP90 zu identifizieren.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Bindung von SYK an HSP90 α von der Phosphorylierung an Tyrosin 197 (Y197) des Chaperons abhängig ist. Nach Mutation von Y197 zu Phenylalanin war eine Interaktion zu SYK nicht mehr nachweisbar. Die Interaktion von HSP90 zu AKT war von dieser Mutation unberührt. Beebe und Kollegen³²⁵ konnten bereits zeigen, dass posttranslationale Modifikationen, so auch an Y197 in HSP90 α , die Affinität zu HSP90-Inhibitoren verändern. Des Weiteren ist beschrieben, dass eine Regulation des Chaperonzykluses durch die Phosphorylierung an Y197 stattfindet, die zu einer Dissoziation von CDC37 führt.³²⁶ Inwieweit eine Phosphorylierungsstelle jedoch die Selektivität für die Erkennung von Klientproteinen beeinflusst, ist spekulativ. Zwar lieferten Taipale und Kollegen²¹⁹ Hinweise auf eine Beteiligung von Co-Chaperone wie CDC37 bei der Erkennung von Kinasen, doch ist der Mechanismus der Klientspezifität aufgrund der Vielzahl an verschiedenen beschriebenen Klientproteinen von HSP90 noch unklar. Hinweise auf eine Beteiligung der elektrischen Ladung von Proteinen konnten durch Versuche mit ErbB2 erhalten werden, die zeigen, dass eine Mutation und damit einhergehende lokale Ladungsveränderung zum Interaktionsverlust mit HSP90 führt.³²⁷ Ist die Erkennung von SYK durch HSP90 ebenfalls über elektrische Eigenschaften verknüpft, könnte eine Veränderung der elektrischen Ladung durch posttranskriptionelle Modifikationen, beispielsweise über Phosphorylierungen am HSP90-Protein, prinzipiell zu einem Verlust der Interaktion führen bzw. diese erst gar nicht ermöglichen.

5.6 TEL-SYK-Überexpression entkoppelt Burkitt-Lymphom-Zellen von ihrer HSP90-Abhängigkeit

Wie oben beschrieben, wird die Aufrechterhaltung des tonischen BZR-Signals über funktionales HSP90 gewährleistet. Inhibition von HSP90 führt über den Verlust von SYK zu einem Erliegen des Signals und führt zur Apoptose der Zellen. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, würde die Expression einer SYK-Mutante, die unabhängig von HSP90 interagiert die HSP90-Effekte wieder aufheben.

TEL-SYK ist ein Fusionsprotein, das in Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) auftreten kann und nach Translokation des N-terminalen Bereichs des TEL-Gens mit dem C-terminalen Bereich des SYK-Gens entsteht.²⁶⁵ Aufgrund der Fusion von TEL und SYK oligomerisiert die Kinase SYK über die PNT-Domäne von TEL und zeigt eine erhöhte Kinase-Aktivität, die einerseits über das Fehlen des autoinhibierenden N-Terminus der Kinase, als auch über die Oligomerisierung der Kinase erklärbar ist. Vergleichbare Effekte sind auch für die

Fusionsproteine TEL-ABL und TEL-JAK2 beschrieben.^{328,329} Nach Überexpression des TEL-SYK-Fusionsproteins in DG75-Zellen konnte mittels massenspektrometrischen Analysen die Aktivierung der Kinase bestätigt werden. Der Vergleich der regulierten Phosphoproteine des hervorgerufenen aktivierten Zustands mit den auftretenden Phosphoproteinen nach einer BZR-Stimulation zeigte ähnlich regulierte Signalwege. Zudem gelang der Nachweis der aktivierten Kinase in beiden Konditionen in Form der Phosphorylierung an den aktivierenden Phosphorylierungsstellen von SYK.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor AT13387 in TEL-SYK überexprimierenden Zellen zu einem Verlust an physiologischem SYK führt, die Expression von TEL-SYK jedoch weiterhin stabil bleibt. Dieses Phänomen, auf das in Kapitel 5.7 näher eingegangen wird, sorgte in einem durchgeführten Viabilitäts-Assay dafür, dass TEL-SYK überexprimierende Zellen trotz HSP90-Inhibition eine mit Kontrollzellen vergleichbare Viabilität aufwiesen.

Dieses Experiment bestätigt nochmals die Abhängigkeit der Zellen von SYK bzw. deren jeweilige Unabhängigkeit von den Kinasen BTK und LYN und validiert die Ergebnisse, dass SYK Hauptmediator der von den HSP90-Inhibitoren vermittelten Effekte ist. Kanie und Kollegen²⁶⁶ konnten zeigen, dass TEL-SYK neben dem MAPK- und dem JAK2-unabhängigen STAT5-Signalweg zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges führt. Vor dem Hintergrund, dass eben jener PI3K/AKT-Signalweg nach Rekonstitution in BZR-Knockout-Zellen diese vor Apoptose schützen kann,¹³⁸ ist es gut nachvollziehbar, dass auch Zellen, die TEL-SYK exprimieren, trotz HSP90-Inhibitor vor Apoptose geschützt waren.

5.7 Lysosomaler Abbau von SYK nach HSP90-Inhibition

Die HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090 führen nach Inkubation in DG75- und Daudi-Zellen zu einem Verlust der Kinase SYK. Da im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von SYK mit HSP90 identifiziert wurde, sollte im Folgenden der Mechanismus der Degradierung näher untersucht werden.

Der Verlust von Proteinen kann prinzipiell durch eine reduzierte Genexpression, eine posttranskriptionelle Regulation, eine erhöhte Proteindegradierungsrate oder durch eine Kombination der aufgeführten Mechanismen erfolgen.

Die Blockade der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid für einen Zeitraum von 48 h führte zu keiner Abnahme der Kinase SYK. Dies legt den Schluss nahe, dass die Kinase im physiologischen Zustand eine Proteininstabilität von über 48 h aufweist. Der Verlust des Proteins nach HSP90-Inhibition, der bereits nach 24 h beobachtet werden konnte, kann daher nicht durch posttranskriptionelle Regulation oder durch eine reduzierte Genexpression erklärt werden.

Der Zelle stehen grundsätzlich drei Proteinabbauwege zur Verfügung. Neben dem proteasomalen und lysosomalen Abbau von Proteinen können diese auch über nicht-lysosomale

Cystein-Proteasen im Cytosol wie zum Beispiel Calpain erfolgen, das über Calcium aktiviert wird.³³⁰ Eine Beteiligung eines Calpain-vermittelten Abbaus ist zum Beispiel für die Kinase ZAP-70 in T-Lymphozyten beschrieben.³³¹ Für die Kinase SYK, die wie ZAP-70 der gleichen Familie an Kinasen zuzuordnen ist, ist dieser eher unspezifische Abbauweg bisher nicht beschrieben und wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Insbesondere auch, da Rao und Kollegen³³² zeigen konnten, dass SYK nach BZR-Stimulation ubiquitiniert und für den proteasomalen Abbau markiert wird. Des Weiteren konnten Paolini und Kollegen³³³ in natürlichen Killerzellen eine Beteiligung des Lysosoms beim Abbau von SYK zeigen und beschrieben dies über einen Vorgang bei dem nicht-ubiquitiniertes SYK nach Ubiquitinierung des aktivierten CD16-Rezeptors passiv (komplexiert mit dem Rezeptor) in das Lysosom gelangt und dort abgebaut wird.

Aus diesem Grund wurde auch im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des proteasomalen und des lysosomalen Abbauweges auf die Degradierung von SYK nach HSP90-Inhibition näher untersucht.

Nur nach Hemmung des Lysosoms, nicht aber des Proteasoms, war trotz Inhibition von HSP90 eine stabile Proteinexpression von SYK nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass der Abbau von SYK nach Inhibition von HSP90 nicht über das Proteasom erfolgen kann. Eine Erklärung hierfür wurde von Imai und Kollegen³³⁴ gebracht, die zeigen konnten, dass das Proteasom selbst abhängig von HSP90 ist. Nach HSP90-Inhibition dissoziiert das Proteasom und ist nicht mehr funktionell. Nach Inhibition von HSP90 und der damit verbundenen Inaktivität des Proteasoms kann der Abbau von SYK daher nur über das Lysosom erfolgen.

Die Determination des Proteinabbauweges kann prinzipiell über Ubiquitinmodifikationen vermittelt werden. So ist beschrieben, dass Polyubiquitinketten, die über Lysin 48 (K48) miteinander verknüpft sind, den Abbau über das Proteasom zur Folge haben. Ubiquitinverknüpfungen über Lysin 63 (K63) und Monoubiquitinierungen (mUb) fördern hingegen den Abbau über den lysosomalen Abbauweg.³³⁵

Es ist vorstellbar, dass die Art der Ubiquitinverknüpfung (K48, K63 oder mUb) von der jeweiligen Lokalisation der Ubiquitinierungsstelle im Protein abhängt und bestimmte Lysine so nur auf eine Art mit Ubiquitin verknüpft werden (können). In der Tat weist SYK bis dato vier *in vitro* beschriebene Ubiquitinierungsstellen an den Lysin K60, K509, K5017 und K587 auf (Quelle: <https://www.phosphosite.org>, Stand Juli 2018). Dabei könnte insbesondere K60, das in der N-terminalen SH2-Domäne von SYK lokalisiert ist, im Gegensatz zu den anderen Lysin eine essentielle Rolle bei der lysosomalen Degradierung der Kinase spielen. So wäre auch zu erklären, aus welchem Grund das Fusionsprotein TEL-SYK resistent gegenüber HSP90-Inhibition ist. Aufgrund des Translokationsereignisses geht der N-terminale Teil von SYK und damit auch die N-terminale SH2-Domäne inklusive der Ubiquitinierungsstelle K60 verloren, die für den lysosomalen Abbau essentiell sein könnte.

Andererseits geht im Zuge der Translokation auch die Phosphorylierungsstelle an Tyrosin 323 (Y323) in SYK verloren. Es ist beschrieben, dass eben dieses Phosphotyrosin die Bindung zwischen SYK und der Ubiquitinligase Cbl vermittelt um SYK zu ubiquitinieren.^{336,337} Geht man davon aus, dass nur Cbl die Fähigkeit besitzt SYK zu ubiquitinieren, könnte TEL-SYK ohne Cbl-Bindestelle nicht ubiquitiniert und somit auch nicht abgebaut werden.

5.8 Analysen des prä-BZR-Signalweges in B-ALL-Zelllinien

Ihren Ursprung hat die B-ALL in B-Zellen einer frühen Entwicklungsphase, in der die Viabilität der Zellen von einem noch exprimierten IL7-Rezeptor und/oder von einem bereits funktionalen prä-BZR abhängt. Demnach kann die B-ALL in zwei Subgruppen hinsichtlich ihrer prä-BZR-Funktion eingeteilt werden. So weisen etwa 14 % der B-ALL-Patienten ein tonisches Signal auf, das über einen funktionalen prä-BZR vermittelt wird (prä-BZR-ALL⁺).³³⁸ Patienten der prä-BZR-ALL⁺ reagieren sensitiv auf Inhibition von SYK, BTK und SRC-Kinasen.^{338,339}

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den Zelllinien RCH-ACV und SMS-SB zwei prä-B-Zelllinien gewählt, die über einen funktionalen prä-BZR verfügen und sensitiv gegenüber einer Inhibition von BTK durch Ibrutinib sind.³⁴⁰ Ergänzend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der Kinase SYK durch PRT062607 zur Apoptose der Zellen führt, die über den Verlust von aktiviertem AKT erklärbar ist. Köhrer und Kollegen³⁴¹ konnten einen apoptotischen Effekt auch mit den SYK-Inhibitoren PRT06018 und R406 zeigen. Zudem stellten sie fest, dass der Verlust der Viabilität der Zellen über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt wird. Die Behandlung der Zellen mit einem PI3K-Inhibitor führte zur Apoptose. Da der PI3K/AKT-Signalweg auch beim tonischen BZR-Signalweg im Burkitt Lymphom eine essentielle Rolle spielt, ist dies ein Hinweis auf ähnlich regulierte tonische Signalwege beider Entitäten.

Nicht nur die Inhibition von SYK führt zur Apoptose der B-ALL-Zelllinien. Ähnliche Effekte sind auch nach Knockout von Proteinen des prä-BZRs beobachtbar. So führt der Knockout der μ -Kette des prä-BZRs in B-ALL-Zelllinien zu einem proliferativen Nachteil gegenüber Kontrollzellen.³⁴¹ War die μ -Kette bereits in murinen embryonalen Stammzellen deletiert, so wiesen die ausgewachsenen Mäuse keine reifen B-Zellen auf.¹⁴ Selbiges konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. So führte ein induzierbarer CD79a-Knockdown in RCH-ACV-Zellen zu einer reduzierten Oberflächenexpression des prä-BZRs, die im Kompetitions-Assay einen proliferativen Nachteil der Knockdown-Zellen gegenüber den Kontrollzellen verursachten. Durch massenspektrometrische Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit zudem ein Bezug zu einem deregulierten PI3K/AKT-Signalweg hergestellt werden, über den ein möglicher apoptotischer Effekt erklärbar ist.

So bleibt festzuhalten, dass auch B-ALL-Zellen über einen tonischen Signalweg verfügen, von dem die Viabilität der Zellen abhängig ist und welcher geeignet ist um neue Zielstrukturen für therapeutische Ansätze zu identifizieren.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der tonische BZR-Signalweg im Burkitt Lymphom näher untersucht werden. Ziel war die Identifizierung von Zielstrukturen, die für die Zellen essentiell für die Aufrechterhaltung des tonischen Signalwegs sind und gleichzeitig die Viabilität der Zellen fördern. Durch die Identifizierung noch unbekannter Zielstrukturen wäre man in der Lage, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln oder bereits bestehende zu optimieren. Des Weiteren sollte die Signaltransduktion in der B-ALL, die über einen Vorläufer des BZR, dem prä-BZR vermittelt wird, hinsichtlich eines tonischen Überlebenssignals untersucht werden.

Durch massenspektrometrische Analysen der tonischen BZR-Signaltransduktion im Burkitt Lymphom, die für die Viabilität der Zellen essentiell ist und die Ergebnisse eines Inhibitorscreens konnte HSP90 als potenzielle neue Zielstruktur im Burkitt Lymphom identifiziert werden.

So konnte gezeigt werden, dass Burkitt-Lymphom-Zellen nach Inhibition der Chaperonfunktion von HSP90 durch zwei auf dem Markt bereits verfügbare Inhibitoren einen Zellzyklusarrest erfahren, der letztlich zur Apoptose der Zellen führt. Dieser Effekt wurde auf einen Verlust des (tonischen) BZR-Signals zurückgeführt, der überwiegend durch den aktiven lysosomalen Abbau von SYK nach HSP90-Inhibition zustande kommt. Demnach führte die Überexpression einer HSP90-resistenten Variante von SYK (TEL-SYK) zu einer Aufhebung der apoptotischen Effekte nach HSP90-Inhibition. Zudem wurde SYK als Interaktionspartner von HSP90 (HSP90-Klientprotein) im Burkitt Lymphom und die für die Interaktion essentielle Phosphorylierungsstelle (pY197 in HSP90 α bzw. pY192 in HSP90 β) identifiziert bzw. validiert.

Das therapeutische Potenzial der HSP90-Inhibitoren im Burkitt Lymphom offenbarte sich ferner durch den Vergleich der Wirkungseffektivität in gesunden B-Zellen mit der in Tumorzellen. So zeigten HSP90-Inhibitoren eine erhöhte Affinität zu Tumorzellen. Bei verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren, die bereits eine apoptotische Wirkung in Tumorzellen hervorriefen, waren gesunde B-Zellen resistent.

In der B-ALL konnte durch den Knockdown von CD79a und der Inhibition von SYK eine tonische Antigenrezeptor-Signalleitung identifiziert werden, die wie im Burkitt Lymphom über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt wird. Durch die Kombination der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse und weiterführende Analysen (wie zum Beispiel durch Inhibitor- oder CRISPR/Cas-Screens) kann so eine Identifizierung von potenziellen Zielstrukturen mit therapeutischem Nutzen in der B-ALL erfolgen.

7. Literaturverzeichnis

1. Seyffert, W. *Lehrbuch der Genetik*. (Spektrum Akademischer Verlag; 2003).
2. Monroe, J. G. & Dorshkind, K. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. *Adv. Immunol.* **95**, 1–50 (2007).
3. Smith, L. G., Weissman, I. L. & Heimfeld, S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2788–92 (1991).
4. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242–5 (1996).
5. Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, R. C. & Okano, H. Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* **20**, 87–93 (2004).
6. Morrison, S. J. & Weissman, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**, 661–73 (1994).
7. Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E. & Weissman, I. L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**, 1929–39 (1997).
8. Christensen, J. L. & Weissman, I. L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14541–6 (2001).
9. Kiel, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–21 (2005).
10. Yang, L. *et al.* Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* **105**, 2717–23 (2005).
11. Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Baltimore, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035–48 (1989).
12. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517–23 (1990).
13. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751–758 (1996).
14. Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R. & Rajewsky, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* **350**, 423–6 (1991).
15. Kitamura, D. *et al.* A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* **69**, 823–31 (1992).
16. Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. & Schiff, C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13014–9 (2002).
17. Ubelhart, R. *et al.* N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nat. Immunol.* **11**, 759–65 (2010).
18. Ramadani, F. *et al.* The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci. Signal.* **3**, ra60 (2010).
19. Nahar, R. *et al.* Pre-B cell receptor-mediated activation of BCL6 induces pre-B cell

- quiescence through transcriptional repression of MYC. *Blood* **118**, 4174–8 (2011).
20. ten Boekel, E., Melchers, F. & Rolink, A. G. Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity* **8**, 199–207 (1998).
 21. Norvell, A. & Monroe, J. G. Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM- and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes. *J. Immunol.* **156**, 1328–32 (1996).
 22. Wardemann, H. *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**, 1374–7 (2003).
 23. Luning Prak, E. T., Monestier, M. & Eisenberg, R. A. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1217**, 96–121 (2011).
 24. Quách, T. D. *et al.* Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naïve B cells expressing low levels of surface IgM. *J. Immunol.* **186**, 4640–8 (2011).
 25. Yang, J. & Reth, M. Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells. *Nature* **467**, 465–9 (2010).
 26. Geisberger, R., Lamers, M. & Achatz, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* **118**, 429–37 (2006).
 27. Lutz, C. *et al.* IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* **393**, 797–801 (1998).
 28. Nitschke, L., Kosco, M. H., Köhler, G. & Lamers, M. C. Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1887–91 (1993).
 29. Roes, J. & Rajewsky, K. Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J. Exp. Med.* **177**, 45–55 (1993).
 30. Ten Hacken, E. *et al.* Functional Differences between IgM and IgD Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Immunol.* **197**, 2522–31 (2016).
 31. Hendriks, R. W., Yuvaraj, S. & Kil, L. P. Targeting Bruton’s tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 219–32 (2014).
 32. Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H. & Reth, M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. 1990. *J. Immunol.* **183**, 1505–7 (2009).
 33. Sitia, R., Neuberger, M. S. & Milstein, C. Regulation of membrane IgM expression in secretory B cells: translational and post-translational events. *EMBO J.* **6**, 3969–77 (1987).
 34. Rolli, V. *et al.* Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Molecu* Rolli, V., Gall, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W. W. A., Zürn, C., Reth, M. (2002). *Amplif. B cell antigen Recept. Signal. by a Syk/ITAM Posit. Feed. loop. Mol. Cell*, 10(5), 1057–69. Retrieved from <http://www.n> **10**, 1057–69 (2002).
 35. Johnson, S. A. *et al.* Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J. Immunol.* **155**, 4596–603 (1995).
 36. Clark, M. R. *et al.* The B cell antigen receptor complex: association of Ig-alpha and Ig-beta with distinct cytoplasmic effectors. *Science* **258**, 123–6 (1992).
 37. Schmitz, R., Baumann, G. & Gram, H. Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases

- Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display. *J. Mol. Biol.* **260**, 664–77 (1996).
38. Luisiri, P., Lee, Y. J., Eisfelder, B. J. & Clark, M. R. Cooperativity and segregation of function within the Ig-alpha/beta heterodimer of the B cell antigen receptor complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 5158–63 (1996).
 39. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–34 (2010).
 40. Schamel, W. W. & Reth, M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5–14 (2000).
 41. Yang, J. & Reth, M. The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett.* **584**, 4872–7 (2010).
 42. Treanor, B. *et al.* The Membrane Skeleton Controls Diffusion Dynamics and Signaling through the B Cell Receptor. *Immunity* **32**, 187–199 (2010).
 43. Kläsener, K., Maity, P. C., Hobeika, E., Yang, J. & Reth, M. B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk. *Elife* (2014). doi:10.7554/eLife.02069
 44. Metzger, H. Effect of antigen binding on the properties of antibody. *Adv. Immunol.* **18**, 169–207 (1974).
 45. Tolar, P., Sohn, H. W. & Pierce, S. K. The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Immunol.* **6**, 1168–76 (2005).
 46. Infantino, S. *et al.* Arginine methylation of the B cell antigen receptor promotes differentiation. *J. Exp. Med.* **207**, 711–719 (2010).
 47. Fleire, S. J. *et al.* B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* **312**, 738–41 (2006).
 48. Cohen, H. J. Human lymphocyte surface immunoglobulin capping. Normal characteristics and anomalous behavior of chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **55**, 84–93 (1975).
 49. Malhotra, S., Kovats, S., Zhang, W. & Coggeshall, K. M. B cell antigen receptor endocytosis and antigen presentation to T cells require Vav and dynamin. *J. Biol. Chem.* **284**, 24088–97 (2009).
 50. Sharma, S., Orłowski, G. & Song, W. Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *J. Immunol.* **182**, 329–39 (2009).
 51. Stoddart, A. *et al.* Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* **17**, 451–62 (2002).
 52. Chaturvedi, A., Martz, R., Dorward, D., Waisberg, M. & Pierce, S. K. Endocytosed BCRs sequentially regulate MAPK and Akt signaling pathways from intracellular compartments. *Nat. Immunol.* **12**, 1119–26 (2011).
 53. Patterson, S. J. *et al.* Cutting edge: PHLPP regulates the development, function, and molecular signaling pathways of regulatory T cells. *J. Immunol.* **186**, 5533–7 (2011).
 54. Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* **18**, 13–24 (2005).

55. Rowley, R., Burkhardt, A., Chao, H., Matsueda, G. & Bolen, J. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 11590–11594 (1995).
56. Kulathu, Y., Grothe, G. & Reth, M. Autoinhibition and adapter function of Syk. *Immunol. Rev.* **232**, 286–99 (2009).
57. Mócsai, A., Ruland, J. & Tybulewicz, V. L. J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 387–402 (2010).
58. Wienands, J. *et al.* SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J. Exp. Med.* **188**, 791–5 (1998).
59. Engels, N., Wollscheid, B. & Wienands, J. Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2126–34 (2001).
60. Kabak, S. *et al.* The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2524–35 (2002).
61. Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T. & Chan, A. C. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**, 93–103 (1998).
62. Rawlings, D. J. *et al.* Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* **271**, 822–5 (1996).
63. Várnai, P., Rother, K. I. & Balla, T. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 10983–9 (1999).
64. Salim, K. *et al.* Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241–50 (1996).
65. Alexandropoulos, K., Cheng, G. & Baltimore, D. Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3110–4 (1995).
66. Cheng, G., Ye, Z. S. & Baltimore, D. Binding of Bruton's tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a Src homology 3 domain-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8152–5 (1994).
67. Yang, W., Malek, S. N. & Desiderio, S. An SH3-binding site conserved in Bruton's tyrosine kinase and related tyrosine kinases mediates specific protein interactions in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 20832–40 (1995).
68. Khan, W. N., Sideras, P., Rosen, F. S. & Alt, F. W. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function in mice and man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **764**, 27–38 (1995).
69. Saito, K., Scharenberg, A. M. & Kinet, J. P. Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *J. Biol. Chem.* **276**, 16201–6 (2001).
70. Rawlings, D. J. *et al.* Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* **261**, 358–61 (1993).
71. Tsukada, S. *et al.* Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* **72**, 279–90 (1993).
72. Vorechovský, I. *et al.* DNA-based mutation analysis of Bruton's tyrosine kinase gene in

- patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 51–8 (1995).
73. Takata, M. & Kurosaki, T. A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. *J. Exp. Med.* **184**, 31–40 (1996).
 74. Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T. & Chan, A. C. BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J.* **21**, 6461–72 (2002).
 75. Hashimoto, S. *et al.* Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood* **94**, 2357–64 (1999).
 76. Ishiai, M. *et al.* BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells. *Immunity* **10**, 117–25 (1999).
 77. Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. & Kurosaki, T. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* **16**, 3078–88 (1997).
 78. Scharenberg, A. M. & Kinet, J. P. PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* **94**, 5–8 (1998).
 79. Patterson, R. L., van Rossum, D. B. & Gill, D. L. Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* **98**, 487–99 (1999).
 80. Dolmetsch, R. E., Xu, K. & Lewis, R. S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**, 933–6 (1998).
 81. Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. & Healy, J. I. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855–8 (1997).
 82. Timmerman, L. A., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Northrop, J. P. & Crabtree, G. R. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* **383**, 837–40 (1996).
 83. Parekh, D. B., Ziegler, W. & Parker, P. J. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 496–503 (2000).
 84. Huang, K. P. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci.* **12**, 425–32 (1989).
 85. Ueda, Y. *et al.* Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J. Biol. Chem.* **271**, 23512–9 (1996).
 86. Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. & Rennert, P. NF-kappaB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. *EMBO Rep.* **4**, 31–6 (2003).
 87. Gold, M. R., Chan, V. W., Turck, C. W. & DeFranco, A. L. Membrane Ig cross-linking regulates phosphatidylinositol 3-kinase in B lymphocytes. *J. Immunol.* **148**, 2012–22 (1992).
 88. Okkenhaug, K., Ali, K. & Vanhaesebroeck, B. Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K. *Trends Immunol.* **28**, 80–7 (2007).
 89. Buhl, A. M. & Cambier, J. C. Phosphorylation of CD19 Y484 and Y515, and linked activation of phosphatidylinositol 3-kinase, are required for B cell antigen receptor-mediated activation of Bruton's tyrosine kinase. *J. Immunol.* **162**, 4438–46 (1999).
 90. Fujimoto, M., Poe, J. C., Inaoki, M. & Tedder, T. F. CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Semin. Immunol.* **10**, 267–77 (1998).

91. Tuveson, D. A., Carter, R. H., Soltoff, S. P. & Fearon, D. T. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* **260**, 986–9 (1993).
92. Fruman, D. A. *et al.* Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* **283**, 393–7 (1999).
93. Suzuki, H. *et al.* Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* **283**, 390–2 (1999).
94. Ingham, R. J., Holgado-Madruga, M., Siu, C., Wong, A. J. & Gold, M. R. The Gab1 protein is a docking site for multiple proteins involved in signaling by the B cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 30630–7 (1998).
95. Kim, T. J., Kim, Y. T. & Pillai, S. Association of activated phosphatidylinositol 3-kinase with p120cbl in antigen receptor-ligated B cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 27504–9 (1995).
96. Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K. & Kurosaki, T. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* **13**, 817–27 (2000).
97. Aiba, Y., Kameyama, M., Yamazaki, T., Tedder, T. F. & Kurosaki, T. Regulation of B-cell development by BCAP and CD19 through their binding to phosphoinositide 3-kinase. *Blood* **111**, 1497–503 (2008).
98. Pleiman, C. M., Hertz, W. M. & Cambier, J. C. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* **263**, 1609–12 (1994).
99. Delgado, P. *et al.* Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat. Immunol.* **10**, 880–8 (2009).
100. Cambier, J. C. & Johnson, S. A. Differential binding activity of ARH1/TAM motifs. *Immunol. Lett.* **44**, 77–80 (1995).
101. Andjelković, M. *et al.* Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**, 31515–24 (1997).
102. Astoul, E., Watton, S. & Cantrell, D. The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement. *J. Cell Biol.* **145**, 1511–20 (1999).
103. Jacinto, E. *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125–37 (2006).
104. Guertin, D. A. *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev. Cell* **11**, 859–71 (2006).
105. Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* **7**, 261–9 (1997).
106. Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541–51 (1996).
107. Filippa, N., Sable, C. L., Hemmings, B. A. & Van Obberghen, E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5712–21 (2000).
108. Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R. & Hawkins, P. T. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* **8**, 684–91 (1998).

109. Meier, R., Alessi, D. R., Cron, P., Andjelković, M. & Hemmings, B. A. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J. Biol. Chem.* **272**, 30491–7 (1997).
110. Du, K. & Montminy, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* **273**, 32377–9 (1998).
111. Brennan, P. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* **7**, 679–89 (1997).
112. Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D. & Weiss, A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* **9**, 601–4 (1999).
113. Brownawell, A. M., Kops, G. J., Macara, I. G. & Burgering, B. M. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3534–46 (2001).
114. Burgering, B. M. T. & Kops, G. J. P. L. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 352–60 (2002).
115. Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911–2 (2002).
116. Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. & Seger, R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1619–33 (2011).
117. Tordai, A. *et al.* Cross-linking of surface IgM stimulates the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 7538–43 (1994).
118. Frearson, J. A. & Alexander, D. R. The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction. *Bioessays* **19**, 417–27 (1997).
119. Wienands, J., Larbolette, O. & Reth, M. Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7865–70 (1996).
120. Tamir, I., Dal Porto, J. M. & Cambier, J. C. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 307–15 (2000).
121. Pani, G., Kozłowski, M., Cambier, J. C., Mills, G. B. & Siminovitch, K. A. Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. *J. Exp. Med.* **181**, 2077–84 (1995).
122. Mizuno, K. *et al.* Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase-1 dephosphorylates B cell linker protein/SH2 domain leukocyte protein of 65 kDa and selectively regulates c-Jun NH2-terminal kinase activation in B cells. *J. Immunol.* **165**, 1344–51 (2000).
123. Cunnick, J. M., Dorsey, J. F., Mei, L. & Wu, J. Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 887–94 (1998).
124. Meng, T.-C., Fukada, T. & Tonks, N. K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell* **9**, 387–99 (2002).
125. Tedder, T. F., Tuscano, J., Sato, S. & Kehrl, J. H. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 481–504 (1997).
126. Schulte, R. J., Campbell, M. A., Fischer, W. H. & Sefton, B. M. Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation. *Science* **258**, 1001–4 (1992).

127. Blasioli, J., Paust, S. & Thomas, M. L. Definition of the Sites of Interaction between the Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 and CD22. *J. Biol. Chem.* **274**, 2303–2307 (1999).
128. Lankester, A. C., van Schijndel, G. M. W. & van Lier, R. A. W. Hematopoietic Cell Phosphatase Is Recruited to CD22 following B Cell Antigen Receptor Ligation. *J. Biol. Chem.* **270**, 20305–20308 (1995).
129. Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 13375–8 (1998).
130. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–74 (2007).
131. Lam, K. P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073–1083 (1997).
132. Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N. & Rajewsky, K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* **117**, 787–800 (2004).
133. Batten, M. *et al.* BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 1453–66 (2000).
134. Thompson, J. S. *et al.* BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J. Exp. Med.* **192**, 129–35 (2000).
135. Sasaki, Y. *et al.* Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. *Immunity* **24**, 729–39 (2006).
136. Schulze-Luehrmann, J. & Ghosh, S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* **25**, 701–15 (2006).
137. Stadanlick, J. E. *et al.* Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLyS signaling. *Nat. Immunol.* **9**, 1379–87 (2008).
138. Srinivasan, L. *et al.* PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival. *Cell* **139**, 573–586 (2009).
139. Yamaguchi, H. & Wang, H. G. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* **20**, 7779–86 (2001).
140. Pui, C. H. Childhood leukemias. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1618–30 (1995).
141. Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., Aster, J. & Gilliland, D. G. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet. Cytogenet.* **130**, 93–104 (2001).
142. Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–64 (2007).
143. Cobaleda, C., Jochum, W. & Busslinger, M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* **449**, 473–7 (2007).
144. Pui, C.-H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Formos. Med. Assoc.* **109**, 777–87 (2010).
145. Pui, C.-H., Robison, L. L. & Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)* **371**, 1030–43 (2008).

146. Larson, S. & Stock, W. Progress in the treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 400–7 (2008).
147. Fielding, A. K. *et al.* Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* **109**, 944–950 (2006).
148. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–405 (2016).
149. Forghieri, F., Luppi, M. & Potenza, L. Philadelphia chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology* **20**, 618–9 (2015).
150. Rowe, J. M. *et al.* Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* **106**, 3760–7 (2005).
151. Secker-Walker, L. M., Craig, J. M., Hawkins, J. M. & Hoffbrand, A. V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia* **5**, 196–9 (1991).
152. Faderl, S. *et al.* Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **36**, 263–73 (2000).
153. Larson, R. A. *et al.* A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood* **85**, 2025–37 (1995).
154. Preti, H. A. *et al.* Philadelphia-chromosome-positive adult acute lymphocytic leukemia: characteristics, treatment results, and prognosis in 41 patients. *Am. J. Med.* **97**, 60–5 (1994).
155. Jones, L. K. & Saha, V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br. J. Haematol.* **130**, 489–500 (2005).
156. Dombret, H. *et al.* Outcome of treatment in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia--results of the prospective multicenter LALA-94 trial. *Blood* **100**, 2357–66 (2002).
157. Ribera, J.-M. *et al.* Concurrent intensive chemotherapy and imatinib before and after stem cell transplantation in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Final results of the CSTIBES02 trial. *Haematologica* **95**, 87–95 (2010).
158. Küppers, R. & Hansmann, M.-L. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 511–7 (2005).
159. Rosenwald, A. & Ott, G. Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* **19**, iv67-iv69 (2008).
160. BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br. J. Surg.* **46**, 218–23 (1958).
161. Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G. & Staudt, L. M. Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, (2014).
162. Grogg, K. L., Miller, R. F. & Dogan, A. HIV infection and lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1365–1372 (2006).
163. Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K. & Klein, G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int. J. cancer* **17**, 47–56 (1976).
164. Dalla-Favera, R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome

- 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7824–7 (1982).
165. Taub, R. *et al.* Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7837–41 (1982).
166. Adams, J. M. *et al.* The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**, 533–8
167. Evan, G. I. *et al.* Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119–28 (1992).
168. Sakamuro, D. *et al.* c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**, 2411–8 (1995).
169. Meyer, N., Kim, S. S. & Penn, L. Z. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 275–87 (2006).
170. Bhatia, K. G., Gutiérrez, M. I., Huppi, K., Siwarski, D. & Magrath, I. T. The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res.* **52**, 4273–6 (1992).
171. Gaidano, G. *et al.* p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5413–7 (1991).
172. Cherney, B. W. *et al.* Role of the p53 tumor suppressor gene in the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Res.* **57**, 2508–15 (1997).
173. Vousden, K. H., Crook, T. & Farrell, P. J. Biological activities of p53 mutants in Burkitt's lymphoma cells. *J. Gen. Virol.* **74** (Pt 5), 803–10 (1993).
174. Farrell, P. J., Allan, G. J., Shanahan, F., Vousden, K. H. & Crook, T. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J.* **10**, 2879–87 (1991).
175. Wiman, K. G., Magnusson, K. P., Ramqvist, T. & Klein, G. Mutant p53 detected in a majority of Burkitt lymphoma cell lines by monoclonal antibody PAb240. *Oncogene* **6**, 1633–9 (1991).
176. Bellan, C., Stefano, L., Giulia, D. F., Rogena, E. A. & Lorenzo, L. Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma: a practical approach. *Hematol. Oncol.* **27**, 182–5 (2009).
177. Hoelzer, D. *et al.* Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood* **124**, 3870–9 (2014).
178. Magrath, I. *et al.* Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J. Clin. Oncol.* **14**, 925–34 (1996).
179. Sweetenham, J. W. *et al.* Adult Burkitt's and Burkitt-like non-Hodgkin's lymphoma--outcome for patients treated with high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation in first remission or at relapse: results from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **14**, 2465–72 (1996).
180. Kelly, J. L. *et al.* Outcomes of patients with Burkitt lymphoma older than age 40 treated with intensive chemotherapeutic regimens. *Clin. Lymphoma Myeloma* **9**, 307–10 (2009).
181. Tolani, B., Gopalakrishnan, R., Punj, V., Matta, H. & Chaudhary, P. M. Targeting Myc in KSHV-associated primary effusion lymphoma with BET bromodomain inhibitors.

- Oncogene* **33**, 2928–37 (2014).
182. Mertz, J. A. *et al.* Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16669–74 (2011).
 183. Tan, Y. *et al.* Co-targeting of Akt and Myc inhibits viability of lymphoma cells from Lck-Dlx5 mice. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 580–8 (2015).
 184. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **18**, 571–573 (1962).
 185. Muralidharan, S. & Mandrekar, P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 1167–84 (2013).
 186. Udono, H., Ichiyangi, T., Mizukami, S. & Imai, T. Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells. *Int. J. Hyperthermia* **25**, 617–25 (2009).
 187. Afzal, E., Ebrahimi, M., Najafi, S. M. A., Daryadel, A. & Baharvand, H. Potential role of heat shock proteins in neural differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells (P19). *Cell Biol. Int.* **35**, 713–20 (2011).
 188. Wiesgigl, M. & Clos, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3307–16 (2001).
 189. Christians, E. S., Zhou, Q., Renard, J. & Benjamin, I. J. Heat shock proteins in mammalian development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 283–90 (2003).
 190. Kampinga, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* **14**, 105–11 (2009).
 191. Jäättelä, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* **31**, 261–71 (1999).
 192. Ellis, R. J. Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv. Exp. Med. Biol.* **594**, 1–13 (2007).
 193. Zou, Z. *et al.* Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **135**, 333–9 (2008).
 194. Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. & Kelly, J. W. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **319**, 916–9 (2008).
 195. McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D. & Frydman, J. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat. Cell Biol.* **7**, 736–741 (2005).
 196. Shamovsky, I. & Nudler, E. New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 855–61 (2008).
 197. Lis, J. & Wu, C. Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* **74**, 1–4 (1993).
 198. Brown, C. R., Martin, R. L., Hansen, W. J., Beckmann, R. P. & Welch, W. J. The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *J. Cell Biol.* **120**, 1101–12 (1993).
 199. Somji, S., Todd, J. H., Sens, M. A., Garrett, S. H. & Sens, D. A. Expression of the constitutive and inducible forms of heat shock protein 70 in human proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite, and CdCl₂. *Environ. Health Perspect.* **107**, 887–93 (1999).

200. D'Souza, S. M. & Brown, I. R. Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress Chaperones* **3**, 188–99 (1998).
201. Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z. & Nardai, G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **79**, 129–68 (1998).
202. Chen, B., Piel, W. H., Gui, L., Bruford, E. & Monteiro, A. The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics* **86**, 627–637 (2005).
203. Pearl, L. H. & Prodromou, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 271–94 (2006).
204. Akner, G., Mossberg, K., Sundqvist, K. G., Gustafsson, J. A. & Wikström, A. C. Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **58**, 356–64 (1992).
205. Langer, T., Rosmus, S. & Fasold, H. Intracellular localization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90alpha) determined by expression of a EGFP-HSP90alpha-fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. *Cell Biol. Int.* **27**, 47–52 (2003).
206. Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Yahara, I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1459–64 (1994).
207. Young, J. C., Obermann, W. M. & Hartl, F. U. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem.* **273**, 18007–10 (1998).
208. Hainzl, O., Lapina, M. C., Buchner, J. & Richter, K. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* **284**, 22559–67 (2009).
209. Stebbins, C. E. *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**, 239–50 (1997).
210. Sullivan, W. *et al.* Nucleotides and two functional states of hsp90. *J. Biol. Chem.* **272**, 8007–12 (1997).
211. Csermely, P. *et al.* ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J. Biol. Chem.* **268**, 1901–7 (1993).
212. Krukenberg, K. A., Southworth, D. R., Street, T. O. & Agard, D. A. pH-dependent conformational changes in bacterial Hsp90 reveal a Grp94-like conformation at pH 6 that is highly active in suppression of citrate synthase aggregation. *J. Mol. Biol.* **390**, 278–91 (2009).
213. McLaughlin, S. H. *et al.* The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *J. Mol. Biol.* **356**, 746–58 (2006).
214. Mollapour, M. *et al.* Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function. *Mol. Cell* **37**, 333–43 (2010).
215. Scroggins, B. T. *et al.* An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol. Cell* **25**, 151–9 (2007).
216. Mollapour, M. & Neckers, L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 648–655 (2012).

217. Rüdiger, S., Buchberger, A. & Bukau, B. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 342–9 (1997).
218. Citri, A. *et al.* Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.* **281**, 14361–9 (2006).
219. Taipale, M. *et al.* Quantitative analysis of Hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* **150**, 987–1001 (2012).
220. Xu, W. *et al.* Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12847–52 (2002).
221. Ehrlich, E. S. *et al.* Regulation of Hsp90 client proteins by a Cullin5-RING E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20330–5 (2009).
222. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
223. Brandt, G. E. L. & Blagg, B. S. J. Alternate strategies of Hsp90 modulation for the treatment of cancer and other diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 1447–61 (2009).
224. Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M.-T. & Poulsen, H. S. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell. Signal.* **19**, 2013–23 (2007).
225. Fernández-Medarde, A. & Santos, E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* **2**, 344–58 (2011).
226. Williams, A. B. & Schumacher, B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, (2016).
227. Masciari, S. *et al.* Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Genet. Med.* **13**, 651–7 (2011).
228. Yurgelun, M. B. *et al.* Germline TP53 Mutations in Patients With Early-Onset Colorectal Cancer in the Colon Cancer Family Registry. *JAMA Oncol.* **1**, 214–21 (2015).
229. Wiech, M. *et al.* Molecular mechanism of mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. *PLoS One* **7**, e51426 (2012).
230. O’Callaghan-Sunol, C., Gabai, V. L. & Sherman, M. Y. Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence. *Cancer Res.* **67**, 11779–88 (2007).
231. Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C. & Garrido, C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* **1**, 53–60
232. Beere, H. M. *et al.* Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**, 469–75 (2000).
233. Okui, T. *et al.* Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* **31**, 1197–204 (2011).
234. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–13 (1996).
235. Tsutsumi, S., Beebe, K. & Neckers, L. Impact of heat-shock protein 90 on cancer metastasis. *Future Oncol.* **5**, 679–88 (2009).
236. Gong, J. *et al.* Targeting the hsp70 gene delays mammary tumor initiation and inhibits tumor cell metastasis. *Oncogene* **34**, 5460–71 (2015).
237. Pavan, S. *et al.* HSP27 is required for invasion and metastasis triggered by hepatocyte growth factor. *Int. J. cancer* **134**, 1289–99 (2014).
238. Shiota, M. *et al.* Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res.* **73**, 3109–19 (2013).

239. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367–1372 (2008).
240. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–40 (2016).
241. Fellmann, C. *et al.* An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep* **5**, 1704–1713 (2013).
242. Puissant, A. *et al.* SYK Is a Critical Regulator of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **25**, 226–242 (2014).
243. Walter, R. *et al.* HSP90 promotes Burkitt lymphoma cell survival by maintaining tonic B-cell receptor signaling. *Blood* **129**, 598–608 (2017).
244. Lössner, C., Warnken, U., Pscherer, A. & Schnölzer, M. Preventing arginine-to-proline conversion in a cell-line-independent manner during cell cultivation under stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) conditions. *Anal. Biochem.* **412**, 123–5 (2011).
245. Scudiero, D. A. *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827–33 (1988).
246. Mann, M. *et al.* Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **20**, 261–8 (2002).
247. Rush, J. *et al.* Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 94–101 (2005).
248. Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**, 663–70 (2003).
249. Cox, J. *et al.* Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **10**, 1794–805 (2011).
250. Graham, F. L. & van der Eb, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456–67 (1973).
251. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
252. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
253. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4 (1979).
254. Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. & Beaumelle, B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* **13**, 355–63 (2012).
255. Hadzopoulou-Cladaras, M. *et al.* The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J. Virol.* **63**, 1265–74 (1989).
256. Nakatani, K., Horie, S., Goto, Y., Kobori, A. & Hagihara, S. Evaluation of mismatch-binding ligands as inhibitors for Rev-RRE interaction. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 5384–8 (2006).
257. Daugherty, M. D., D’Orso, I. & Frankel, A. D. A solution to limited genomic capacity:

- using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA. *Mol. Cell* **31**, 824–34 (2008).
258. Yee, J. K., Friedmann, T. & Burns, J. C. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43 Pt A**, 99–112 (1994).
259. Corso, J. *et al.* Elucidation of tonic and activated B-cell receptor signaling in Burkitt's lymphoma provides insights into regulation of cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 5688–5693 (2016).
260. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153 (2014).
261. Basso, A. D. *et al.* Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* **277**, 39858–66 (2002).
262. Yu, G. & He, Q.-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol. Biosyst.* **12**, 477–479 (2016).
263. Primo, D. *et al.* A novel ex vivo high-throughput assay reveals antiproliferative effects of idelalisib and ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **9**, (2018).
264. Advani, R. H. *et al.* Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* **31**, 88–94 (2013).
265. Kuno, Y. *et al.* Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). *Blood* **97**, 1050–1055 (2001).
266. Kanie, T., Abe, A., Matsuda, T. & Kuno, Y. TEL-Syk fusion constitutively activates PI3-K/Akt, MAPK and JAK2-independent STAT5 signal pathways. *Leukemia* **18**, 548–55 (2004).
267. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **445**, 77–88 (2008).
268. Kerr, W. G. Inhibitor and activator: dual functions for SHIP in immunity and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1217**, 1–17 (2011).
269. Xu, Y., Fairfax, K., Light, A., Huntington, N. D. & Tarlinton, D. M. CD19 differentially regulates BCR signalling through the recruitment of PI3K. *Autoimmunity* **47**, 430–7 (2014).
270. Tuscano, J. M., Engel, P., Tedder, T. F., Agarwal, A. & Kehrl, J. H. Involvement of p72syk kinase, p53/561yn kinase and phosphatidyl inositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1246–1252 (1996).
271. Kurosaki, T. *et al.* Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **179**, 1725–9 (1994).
272. Chan, V. W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A. L. & Lowell, C. A. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* **7**, 69–81 (1997).
273. Ke, J. *et al.* Anomalous constitutive Src kinase activity promotes B lymphoma survival

- and growth. *Mol. Cancer* **8**, 132 (2009).
274. Cozzi, M. *et al.* Antitumor activity of new pyrazolo[3,4- d]pyrimidine SRC kinase inhibitors in Burkitt lymphoma cell lines and its enhancement by WEE1 inhibition. *Cell Cycle* **11**, 1029–1039 (2012).
275. Schmitz, R. *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* **490**, 116–120 (2012).
276. Liu, D. & Mamorska-Dyga, A. Syk inhibitors in clinical development for hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 145 (2017).
277. Coffey, G. *et al.* The novel kinase inhibitor PRT062070 (Cerdulatinib) demonstrates efficacy in models of autoimmunity and B-cell cancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **351**, 538–48 (2014).
278. Ma, J. *et al.* Cerdulatinib, a novel dual SYK/JAK kinase inhibitor, has broad anti-tumor activity in both ABC and GCB types of diffuse large B cell lymphoma. *Oncotarget* **6**, 43881–96 (2015).
279. Spurgeon, S. E. *et al.* The selective SYK inhibitor P505-15 (PRT062607) inhibits B cell signaling and function in vitro and in vivo and augments the activity of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344**, 378–87 (2013).
280. Coffey, G. *et al.* Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**, 350–9 (2012).
281. Coffey, G. *et al.* PRT062607 Achieves Complete Inhibition of the Spleen Tyrosine Kinase at Tolerated Exposures Following Oral Dosing in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **57**, 194–210 (2017).
282. Martin, S. J. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**, 1545–56 (1995).
283. Tauzin, S., Ding, H., Burdevet, D., Borisch, B. & Hoessli, D. C. Membrane-associated signaling in human B-lymphoma lines. *Exp. Cell Res.* **317**, 151–62 (2011).
284. Roders, N. *et al.* SYK Inhibition Induces Apoptosis in Germinal Center-Like B Cells by Modulating the Antiapoptotic Protein Myeloid Cell Leukemia-1, Affecting B-Cell Activation and Antibody Production. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
285. Sakamoto, K., Wehde, B. L., Rädler, P. D., Triplett, A. A. & Wagner, K.-U. Generation of Janus kinase 1 (JAK1) conditional knockout mice. *Genesis* **54**, 582–588 (2016).
286. Ihle, J. N. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**, 331–4 (1996).
287. Leonard, W. J. & O’Shea, J. J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 293–322 (1998).
288. Wilson, W. H. *et al.* Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* **21**, 922–6 (2015).
289. Byrd, J. C. *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **369**, 32–42 (2013).
290. Havranek, O. *et al.* Tonic B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **130**, 995–1006 (2017).
291. Young, R. M. *et al.* Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 13447–54 (2015).

292. Davis, R. E. *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**, 88–92 (2010).
293. Lenz, G. *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science (80-.)*. **319**, 1676–1679 (2008).
294. Ngo, V. N. *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* **470**, 115–9 (2011).
295. Dave, S. S. *et al.* Molecular diagnosis of Burkitt’s lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2431–42 (2006).
296. Klapproth, K., Sander, S., Marinkovic, D., Baumann, B. & Wirth, T. The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood* **114**, 2448–2458 (2009).
297. Nyhoff, L. E. *et al.* Bruton’s Tyrosine Kinase Is Not Essential for B Cell Survival beyond Early Developmental Stages. *J. Immunol.* **200**, 2352–2361 (2018).
298. Park, H. *et al.* Regulation of Btk Function by a Major Autophosphorylation Site Within the SH3 Domain. *Immunity* **4**, 515–525 (1996).
299. Bellacosa, A., Testa, J. R., Moore, R. & Larue, L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 268–75 (2004).
300. West, K. A., Castillo, S. S. & Dennis, P. A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist. Updat.* **5**, 234–48 (2002).
301. Mitsiades, C. S., Mitsiades, N. & Koutsilieris, M. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr. Cancer Drug Targets* **4**, 235–56 (2004).
302. Mimnaugh, E. G., Worland, P. J., Whitesell, L. & Neckers, L. M. Possible Role for Serine/Threonine Phosphorylation in the Regulation of the Heteroprotein Complex between the hsp90 Stress Protein and the pp60v-src Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 28654–28659 (1995).
303. Mollapour, M. *et al.* Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity. *Mol Cell* **41**, 672–681 (2011).
304. Wandinger, S. K., Suhre, M. H., Wegele, H. & Buchner, J. The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J.* **25**, 367–76 (2006).
305. Guo, A. *et al.* HSP90 stabilizes B-cell receptor kinases in a multi-client interactome: PU-H71 induces CLL apoptosis in a cytoprotective microenvironment. *Oncogene* **36**, 3441–3449 (2017).
306. Blagosklonny, M. V., Toretsky, J., Bohen, S. & Neckers, L. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8379–83 (1996).
307. Moulick, K. *et al.* Affinity-based proteomics reveal cancer-specific networks coordinated by Hsp90. *Nat Chem Biol* **7**, 818–826 (2011).
308. Kamal, A. *et al.* A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425**, 407–410 (2003).
309. Cerchietti, L. C. *et al.* A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat Med* **15**, 1369–1376 (2009).

310. Kummar, S. *et al.* Phase I trial of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies. *Eur. J. Cancer* **46**, 340–7 (2010).
311. Ramanathan, R. K. *et al.* Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat-shock protein 90, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1520–6 (2010).
312. Cho, D. C. *et al.* A phase I dose-escalation study of the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) administered twice weekly in patients with solid tumors: Updated report. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3051–3051 (2011).
313. Wang, Y., Trepel, J. B., Neckers, L. M. & Giaccone, G. STA-9090, a small-molecule Hsp90 inhibitor for the potential treatment of cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **11**, 1466–76 (2010).
314. Supko, J. G., Hickman, R. L., Grever, M. R. & Malspeis, L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **36**, 305–15 (1995).
315. Samuni, Y. *et al.* Reactive oxygen species mediate hepatotoxicity induced by the Hsp90 inhibitor geldanamycin and its analogs. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1559–63 (2010).
316. Breinig, M. *et al.* Targeting heat shock protein 90 with non-quinone inhibitors: A novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **50**, 102–112 (2009).
317. Kijima, T. *et al.* HSP90 inhibitors disrupt a transient HSP90-HSF1 interaction and identify a noncanonical model of HSP90-mediated HSF1 regulation. *Sci. Rep.* **8**, 6976 (2018).
318. Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W. S. & Voellmy, R. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* **6**, 4 (2005).
319. Bagatell, R. *et al.* Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3312–8 (2000).
320. Zhao, Z. *et al.* X66, a novel N-terminal heat shock protein 90 inhibitor, exerts antitumor effects without induction of heat shock response. *Oncotarget* **7**, 29648–29663 (2016).
321. McConnell, J. R., Alexander, L. A. & McAlpine, S. R. A heat shock protein 90 inhibitor that modulates the immunophilins and regulates hormone receptors without inducing the heat shock response. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 661–6 (2014).
322. Wang, Y. & McAlpine, S. R. N-terminal and C-terminal modulation of Hsp90 produce dissimilar phenotypes. *Chem. Commun. (Camb)*. **51**, 1410–3 (2015).
323. Shrestha, L., Bolaender, A., Patel, H. J. & Taldone, T. Heat Shock Protein (HSP) Drug Discovery and Development: Targeting Heat Shock Proteins in Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 2753–64 (2016).
324. Tillotson, B. *et al.* Hsp90 (heat shock protein 90) inhibitor occupancy is a direct determinant of client protein degradation and tumor growth arrest in vivo. *J. Biol. Chem.* **285**, 39835–43 (2010).
325. Beebe, K. *et al.* Posttranslational modification and conformational state of heat shock protein 90 differentially affect binding of chemically diverse small molecule inhibitors. *Oncotarget* **4**, 1065–74 (2013).
326. Xu, W. *et al.* Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. *Mol Cell* **47**, 434–443 (2012).

327. Xu, W. *et al.* Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 120–6 (2005).
328. Golub, T. R. *et al.* Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4107–16 (1996).
329. Lacronique, V. *et al.* A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* **278**, 1309–12 (1997).
330. Ono, Y. & Sorimachi, H. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 224–36 (2012).
331. Penna, D. *et al.* Degradation of ZAP-70 following antigenic stimulation in human T lymphocytes: role of calpain proteolytic pathway. *J. Immunol.* **163**, 50–6 (1999).
332. Rao, N. *et al.* The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J.* **20**, 7085–95 (2001).
333. Paolini, R., Molfetta, R., Piccoli, M., Frati, L. & Santoni, A. Ubiquitination and degradation of Syk and ZAP-70 protein tyrosine kinases in human NK cells upon CD16 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9611–6 (2001).
334. Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I. & Tanaka, K. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J.* **22**, 3557–67 (2003).
335. Welchman, R. L., Gordon, C. & Mayer, R. J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 599–609 (2005).
336. Lupher, M. L. *et al.* Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *J. Biol. Chem.* **273**, 35273–81 (1998).
337. Yankee, T. M., Keshvara, L. M., Sawasdikosol, S., Harrison, M. L. & Geahlen, R. L. Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-Cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *J. Immunol.* **163**, 5827–35 (1999).
338. Geng, H. *et al.* Self-enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **27**, 409–25 (2015).
339. Bicocca, V. T. *et al.* Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t(1;19) acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **22**, 656–67 (2012).
340. Kim, E. *et al.* Ibrutinib inhibits pre-BCR+ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood* **129**, 1155–1165 (2017).
341. Köhrer, S. *et al.* Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia* **30**, 1246–54 (2016).

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung von B-Lymphozyten aus hämatologischen Stammzellen.....	10
Abbildung 2: Aufbau des prä-B-Zellrezeptors	11
Abbildung 3: Aufbau des B-Zellrezeptors	12
Abbildung 4: BZR-Signalweg über den IgM-Rezeptor	13
Abbildung 5: Modell für die Aktivierung der autoinhibierten Kinase SYK	16
Abbildung 6: Regulation des Chaperonzyklus von HSP90.....	26
Abbildung 7: Exemplarische Gating-Strategie zur Vermeidung von Dubletten bei der Analyse von Einzelzellen	45
Abbildung 8: Sequenz des synthetischen Oligos zur Klonierung von shRNA in Expressionsplasmide	53
Abbildung 9: Primer zur Amplifikation von shRNA-Konstrukten aus Oligos.....	53
Abbildung 10: Validierung der Spezifität des APC-gekoppelten Anti-IgM-Antikörpers	63
Abbildung 11: shRNA-Expressionsplasmid LT3-GECIR	64
Abbildung 12: Knockdown von CD79a in DG75- und Daudi-Zellen	64
Abbildung 13: BZR-Oberflächenexpression nach induziertem CD79a-Knockdown in DG75- und Daudi-Zellen.....	65
Abbildung 14: IgM-Expression in DG75- und Daudi-Zellen in Abhängigkeit ihrer GFP-Expression nach CD79a-Knockdown	66
Abbildung 15: Kompetitiver Proliferations-Assay mit Daudi- und DG75-Zellen mit induziertem CD79a-Knockdown.....	67
Abbildung 16: Die Reduktion der Zellzahl im kompetitiven Assay korreliert mit der Stärke des CD79a-Knockdowns.....	68
Abbildung 17: Tyrosinphosphorylierungen nach Behandlung von DG75-Zellen mit SYK-Inhibitoren	69
Abbildung 18: Restaktivität der Kinasefunktion von SYK nach Behandlung mit SYK-Inhibitoren	69
Abbildung 19: PRT062607 hemmt die Phosphorylierung von BLNK nach Stimulation des BZRs.....	70
Abbildung 20: PRT062607 hemmt die basale Phosphorylierung von AKT.....	71
Abbildung 21: Reduzierte Tyrosinphosphorylierungen in DG75- und Daudi-Zellen nach SYK-Inhibition.....	72
Abbildung 22: PRT062607 reduziert die Viabilität von DG75- und Daudi-Zellen.....	73
Abbildung 23: PRT062607 zeigt keine apoptotischen Effekte in DG75- und Daudi-Zellen ..	74
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Probenherstellung und -prozessierung für die pYome-Analyse.....	74
Abbildung 25: Tyrosin-phosphorylierte Proteine (pYome) nach Inhibition der Kinase SYK. 75	75
Abbildung 26: Signalwegsanalyse von regulierten Phosphoproteinen in DG75- und Daudi-Zellen nach SYK-Inhibition	75
Abbildung 27: HSP90-Inhibitor AT13387 besitzt ein hohes apoptotisches Potenzial im Inhibitorscreen.....	76
Abbildung 28: Erhöhte Expression von HSP90 in Gewebeproben von Patienten mit Burkitt Lymphom	78

Abbildung 29: Erhöhte Expression von HS90 α und HSP90 β in Burkitt-Lymphom-Zelllinien	79
Abbildung 30: Struktur der HSP90-Inhibitoren AT13387 und STA-9090.....	79
Abbildung 31: Zellzyklusanalyse in Burkitt-Lymphom-Zellen nach HSP90-Inhibition.....	80
Abbildung 32: HSP90-Inhibition führt zur Apoptose in Tumorzellen	81
Abbildung 33: Effektivität von HSP90-Inhibitoren	82
Abbildung 34: Effekt der HSP90-Inhibitoren auf die Proteinexpression von AKT	82
Abbildung 35: Effekte der HSP90-Inhibitoren auf die Phosphorylierung von Proteinen.....	83
Abbildung 36: Schematische Darstellung der Probenherstellung und -prozessierung für die pYome-Analyse.....	84
Abbildung 37: Korrelation der Effekte nach HSP90-Inhibition auf die Regulation Tyrosin-phosphorylierter Proteine	85
Abbildung 38: Analyse Tyrosin-phosphorylierter Proteine nach HSP90-Inhibition.....	85
Abbildung 39: HSP90-Inhibition führt zu einem Verlust von BTK und dessen aktivierter Form pBTK	86
Abbildung 40: Signalwegsanalyse von regulierten Phosphoproteinen nach HSP90-Inhibition	87
Abbildung 41: Analyse des Proteoms nach HSP90-Inhibition	88
Abbildung 42: HSP90-Inhibition führt zu einem Verlust der Kinasen SYK, BTK und LYN. 88	
Abbildung 43: Apoptose-Assay in Burkitt-Lymphom-Zellen nach Inhibition von HSP90.....	89
Abbildung 44: BZR-Expression nach HSP90-Inhibition.....	91
Abbildung 45: Knockdown der Kinase LYN in DG75-Zellen	92
Abbildung 46: Zellproliferation nach Knockdown der Kinase LYN.....	92
Abbildung 47: Viabilität von Zellen nach Ibrutinib-Behandlung	93
Abbildung 48: Effekte des BTK-Inhibitors Ibrutinib in DG75-Zellen	94
Abbildung 49: Verlust der Phosphorylierung von BLNK nach HSP90- bzw. SYK-Inhibition	95
Abbildung 50: Verlust der Phosphorylierung von AKT nach HSP90- bzw. SYK-Inhibition . 96	
Abbildung 51: Verlust der Phosphorylierung von ERK nach HSP90- bzw. SYK-Inhibition . 97	
Abbildung 52: Calciumflux in BZR-aktivierten Zellen nach Inhibition von HSP90 bzw. SYK	98
Abbildung 53: Interaktion von HSP90 und SYK.....	99
Abbildung 54: Identifikation der regulierten Phosphorylierungsstelle im HSP90-Protein nach CD79a-Knockdown.....	100
Abbildung 55: Lokalisation des sequenzierten Peptids in den jeweiligen HSP90-Isoformen 101	
Abbildung 56: Die Interaktion von SYK mit HSP90 ist von der Phosphorylierung an Tyrosin 197 (Y197) abhängig.....	102
Abbildung 57: TEL-SYK-Fusionsprotein	103
Abbildung 58: Überexpression von TEL-SYK.....	103
Abbildung 59: Darstellung der Probenprozessierung zur Analyse des pYomes in DG75-Zellen nach TEL-SYK-Überexpression bzw. nach BZR-Stimulation	104
Abbildung 60: TEL-SYK Überexpression versetzt DG75 in einen Zustand vergleichbar nach BZR-Aktivierung	105
Abbildung 61: Vergleich regulierter Signalwege nach BZR-Stimulation und TEL-SYK-Überexpression.....	106

Abbildung 62: TEL-SYK ist resistent gegenüber HSP90-Inhibition.....	107
Abbildung 63: TEL-SYK-Überexpression vermittelt Resistenz gegenüber HSP90-Inhibition	108
Abbildung 64: TEL-SYK-Überexpression schützt vor Apoptose nach HSP90-Inhibition....	108
Abbildung 65: Proteininstabilität von SYK	110
Abbildung 66: Akkumulation von LC3B-2 nach Blockierung des lysosomalen Abbauweges	111
Abbildung 67: Hemmung des Proteasoms durch Bortezomib	112
Abbildung 68: SYK wird nach HSP90-Inhibition über das Lysosom abgebaut.....	113
Abbildung 69: Validierung der Spezifität des Anti-CD179a-Antikörpers.....	114
Abbildung 70: Knockdown von CD79a in RCH-ACV	115
Abbildung 71: prä-BZR-Oberflächenexpression nach induziertem CD79a-Knockdown in RCH-ACV-Zellen	116
Abbildung 72: Kompetitiver Assay mit RCH-ACV-Zellen nach Induktion des CD79a- Knockdowns.....	117
Abbildung 73: Schematische Darstellung der Probenprozessierung zur Analyse des pYomes in RCH-ACV-Zellen nach CD79a-Knockdown.....	117
Abbildung 74: Regulierte Phosphoproteine nach CD79a-Knockdown in RCH-ACV-Zellen	118
Abbildung 75: Inhibition von SYK durch PRT062607 führt zur Apoptose in RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen	120
Abbildung 76: PRT062607 hemmt die basale Phosphorylierung von AKT in RCH-ACV- und SMS-SB-Zellen	121
Abbildung 77: Schematische Darstellung der Probenprozessierung zur Analyse des pYomes in RCH-ACV-Zellen nach Inhibition von SYK	121
Abbildung 78: Regulierte Phosphoproteine nach SYK-Inhibition in RCH-ACV- und SMS- SB-Zellen	122

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subtypen der B-ALL nach der WHO-Klassifizierung aus dem Jahr 2016.....	21
Tabelle 2: Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der Klonierung von shRNA in LT3-GECIR	35
Tabelle 3: Oligonukleotide zur Klonierung von shRNA in LT3-GECIR	35
Tabelle 4: Oligonukleotide zur Klonierung von Kontroll-shRNA in LT3-GECIR	36
Tabelle 5: Klassifizierung verwendeter Zelllinien	36
Tabelle 6: Konzentrationen der Aminosäuren im SILAC-Medium.....	41
Tabelle 7: Konfigurationen der verwendeten Durchflusszytometer	44
Tabelle 8: Beurteilung des Zellstatus der Zelle aufgrund der Positivität von Annexin und 7- AAD	46
Tabelle 9: Plasmide für die Produktion von Lentiviren in HEK293T	60
Tabelle 10: 3-Stufen-Klassifizierungsmodell zur Einstufung der Proteinexpressionsstärke in Gewebe-schnitten	61