

Aus der Abteilung Klinische Chemie
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Durch Sirolimus induzierte frühe Veränderungen des Proteoms und
Phosphoproteoms in humanen T-Lymphoblasten**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Frank Christian Schultze
aus
Bremen

Göttingen, 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. von Ahsen

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09. März 2011

Abkürzungsverzeichnis	6
1. EINLEITUNG	8
1.1. Immunsuppression.....	8
1.2. Calcineurin-Inhibitoren	9
1.3. mTOR-Inhibitoren	10
1.3.1. mTOR-Signalwege.....	10
1.3.2. Sirolimus	13
1.3.2.1. Wirkungsmechanismus	14
1.3.2.2. Metabolismus.....	15
1.3.2.3. Dosierung.....	16
1.3.2.4. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	17
1.4. Proteomics	18
1.5. Hypothese, Zielsetzung und Aufgabenstellung	19
2 MATERIALIEN UND METHODEN	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Zellkultur und Bedarf	23
2.1.3. Puffer und Lösungen.....	24
2.1.4. Gebrauchswaren.....	25
2.1.5. Geräte	26
2.2. Methoden	28
2.2.1. Kultivierung der CCRF-CEM-Zelllinie.....	28
2.2.2. Proliferationstest	29
2.2.3. Proteinextraktion	30

2.2.4.	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE).....	30
2.2.5.	Phosphoprotein- und Silberfärbung der 2DE-Polyacrylamidgele	32
2.2.6.	Auswertung der Proteinspots in den 2DE-Polyacrylamidgelen	33
2.2.7.	Proteinidentifikation.....	33
2.2.8.	Quantitative Real-Time-PCR.....	35
2.2.9.	Statistik und bioinformatische Auswertung.....	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	BrdU-Proliferationstest.....	38
3.2.	Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung	39
3.3.	Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge	45
3.4.	Mykoplasmentest.....	51
3.5.	Bioinformatische Analyse der identifizierten Proteine	52
4.	DISKUSSION	53
4.1.	Inhibierung der Zellproliferation durch Sirolimus	53
4.2.	Durch Sirolimus signifikant veränderte Proteine	53
4.3.	Bioinformatische Analyse.....	55
4.3.1.	Signifikant veränderte Proteine und YWHAZ	55
4.3.2.	Die Familie der 14-3-3-Proteine	56
4.3.3.	YWHAZ und der mTOR-Signalweg.....	58
4.4.	Funktionen der identifizierten Proteine.....	59
4.5.	Fazit und Ausblick.....	62
5.	ZUSAMMENFASSUNG	63
5.1.	englisch.....	63
5.2.	deutsch	64

6.	ANHANG	65
6.1.	Tabelle 7: Ratio der Intensitäten nach einer Phosphoproteinfärbung	65
6.2.	Tabelle 8: Ratio der Intensitäten nach einer Silberfärbung	66
6.3.	Tabelle 9: Anzahl und Übereinstimmung von Peptiden	67
6.4.	Publikationsliste	75
7.	LITERATURVERZEICHNIS	76
	PUBLIKATION	84

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ALL	Humane akute lymphozytische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCRF-CEM	ALL (humane akute lymphozytische Leukämie)-Zell-Linie
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Kapillarelektrophorese)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
Da	Dalton
ddH ₂ O	Deionisiertes Wasser
2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	Fötale Kälberserum
HCl	Chlorwasserstoff
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LC	Flüssigchromatographie
MW	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

mol/l	Mol pro Liter
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> (Ziel des Rapamycins im Säugetier)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
Nr.	Nummer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q-TOF	<i>Quadropole-Time of Flight</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SELDI	<i>Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation</i>
SRL	Sirolimus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
Vh	Voltstunden

1. EINLEITUNG

Die vorliegende Studie untersucht die frühen Veränderungen innerhalb des Proteoms und Phosphoproteoms von humanen T-Lymphoblasten nach Inhibierung der Zellproliferation durch das Immunsuppressivum Sirolimus (SRL).

1.1. Immunsuppression

Das Immunsystem ist in der Lage, Fremdkörper wie Viren, Bakterien und Parasiten zu erkennen, als Reiz zu erfassen und mit einer spezifischen Antwort zu reagieren. Dabei lösen die Strukturen der körperfremden Substanzen, die Antigene, eine Antwort durch die Zellen des Immunsystems, den Lymphozyten, aus (Koolman und Röhm 1998). Verschiedenen autoimmunologischen Erkrankungen liegt zugrunde, dass körpereigene Strukturen als Antigen durch das Immunsystem wahrgenommen werden und eine Immunantwort auslösen. In diesen Fällen und nach allogenen Organtransplantationen ist es erforderlich, diese Immunantwort zu unterdrücken (Mutschler et al. 2008; Chinen und Buckley 2010). Die immunsuppressive Therapie wurde im Jahre 1948 mit der erstmaligen Cortison-Behandlung einer Patientin mit Rheumatoider Arthritis durch den amerikanischen Arzt Philip Showalter Hench begründet und 1950 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (Lloyd 2002). Seither wurden verschiedene weitere Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung zur Anwendung am Menschen zugelassen. Heute gibt es neben Glucocorticoiden, Alkylanzien, DNA-Synthesehemmern und Antikörpern noch weitere Gruppen von Immunsuppressiva, die sich hinsichtlich ihrer Wirkungsmechanismen unterscheiden und nachfolgend näher beschrieben werden.

1.2. Calcineurin-Inhibitoren

Ciclosporin (Cyclosporin A, Sandimmun[®]) ist ein Stoffwechselprodukt aus norwegischen Schlauchpilzen (*Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum*), das in den 70er Jahren erstmals isoliert werden konnte und zu den Calcineurin-Inhibitoren zählt. Das aus elf Aminosäuren bestehende, wasserunlösliche zyklische Peptid bildet mit dem Enzym Cyclophilin A einen Komplex, der zu einer Hemmung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase, dem Calcineurin, führt (Mutschler et al. 2008). Auf diese Weise wird die Dephosphorylierung des nukleären Transkriptionsfaktors aktivierter T-Zellen (NF-AT) und somit dessen Passage in den Zellkern verhindert, die Transkription zahlreicher Zytokine in aktivierten T-Zellen wie z.B. Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) unterbunden und so die zelluläre Immunabwehr unterdrückt. Als gut verträgliches Immunsuppressivum wurde Cyclosporin A 1978 erstmals in der Transplantationsmedizin eingesetzt und wird bis heute in Kombination mit anderen Immunsuppressiva verwendet. Weitere Anwendungsbereiche sind u.a. die Colitis ulcerosa und die Glomerulonephritis (Armstrong und Oellerich 2001; Furukawa und Todo 2004; Loftus et al. 2004).

Tacrolimus (FK-506, Prograf[®]) ist ein lipophiles makrozyklisches Lacton (Makrolid), das 1987 erstmals aus dem gram-positiven Bakterienstamm *Streptomyces tsukubaensis* isoliert werden konnte und zu der Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren gehört (Mutschler et al. 2008). Tacrolimus bildet einen Komplex mit dem FK-bindenden-Protein-12 (FKBP12), einem im Zytoplasma lokalisierten Immunophilin, und inhibiert so die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (Armstrong und Oellerich 2001). Wie auch beim Cyclosporin A resultiert daraus eine verminderte Synthese von Zytokinen (IL-2, IL-3, Interferon (IFN)- γ , TNF- α u.a.) und des Proto-

Onkogens c-myc in T-Lymphozyten, was deren Proliferation und damit die zelluläre Immunabwehr unterdrückt (James 1996; Miyata et al. 2005; Westhoff und van der Giet 2007). Tacrolimus wird im Bereich der Transplantationsmedizin als Immunsuppressivum verwendet (Loftus et al. 2004). Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen stehen die Neurotoxizität und die Nephrotoxizität mit der Gefahr der Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie im Vordergrund, aber auch ein gehäuftes Auftreten von Malignomen, insbesondere von Lymphomen, wird beobachtet (Arellano et al. 2007).

1.3. mTOR-Inhibitoren

1.3.1. mTOR-Signalwege

Viele bedeutende intrazelluläre Vorgänge werden durch die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) kontrolliert: die Proliferation, die Transkription, die Translation, wie auch das Überleben und Wachstum der Zelle in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen und der Stoffwechsellage. Dies bringt zum Ausdruck, dass der in Abbildung 1 dargestellte mTOR-Signalweg Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks ist und durch Interaktionen mit verschiedenen anderen Signalwegen wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB, AKT)-Signalweg, dem *rat sarcoma* (RAS)-Signalweg, dem T-Zell-Leukämie-1 (TCL1)-Signalweg und dem BCR/ABL-Signalweg verbunden ist (Ponticelli 2004; Dasgupta et al. 2005; Bandhakavi et al. 2008; Teachey et al. 2009).

Der PI3K-Signalweg wird durch die Phosphorylierung von PI3K über Rezeptortyrosinkinasen wie den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) oder den Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptor (PDGF) ausgelöst, woraus die Bildung des Botenstoffs Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) resultiert.

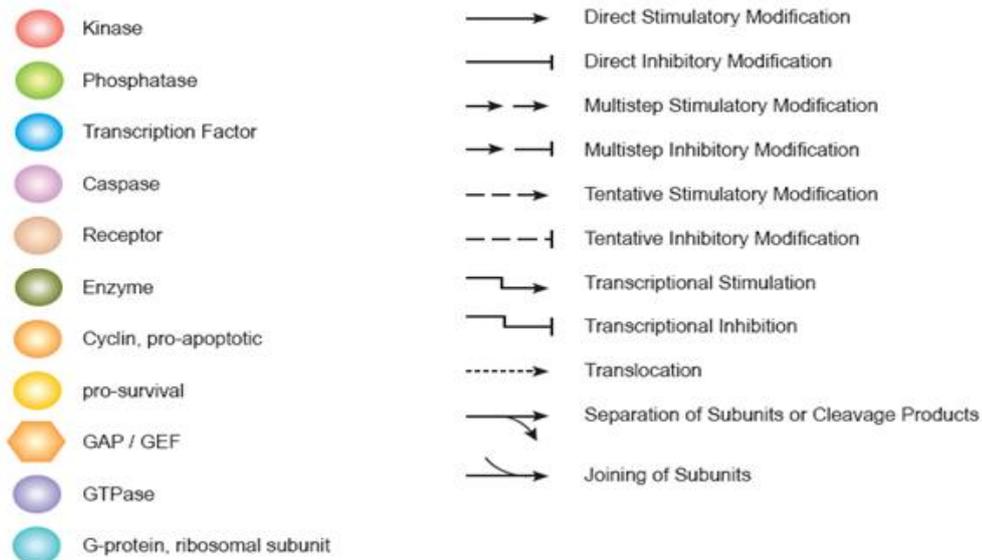
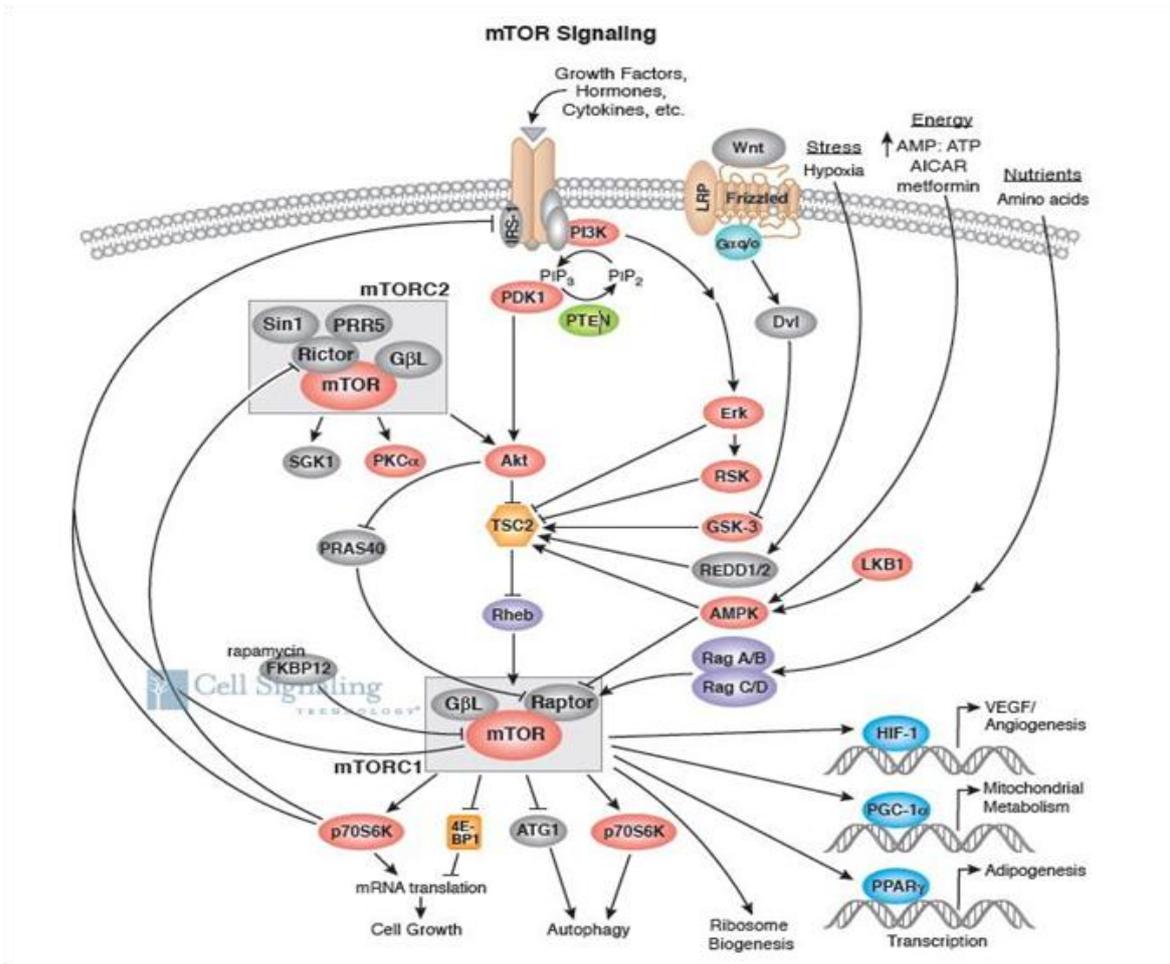


Abbildung 1: Dargestellt sind die beiden mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 sowie deren Funktion in den verschiedenen durch mTOR beeinflussten Signalwegen (Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology® 2010. Verfügbar unter: <http://www.cellsignal.com/pathways/translational-control.jsp>. Zugriff am 18.10.2010. Copyright ©1999-2010 Cell Signaling Technology, Inc.).

Die Bildung des Botenstoffs PIP3, dem eine Schlüsselrolle im PI3K-Signalweg zufällt, führt dazu, dass sich die AKT in Richtung der Zellmembran bewegt, wo eine Phosphorylierung und damit eine Aktivierung der AKT durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK-1) erfolgt. Die Aktivierung von AKT fördert das Überleben und Wachstum der Zelle über nachgeordnete Zielproteine wie mTOR, den nukleären Transkriptionsfaktor-kappa B (NF-kB) und die Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) (Liu et al. 2002).

Neben dem PI3K-Signalweg führen auch Veränderungen des intrazellulären Aminosäuregehalts, des intrazellulären ATP-Gehalts sowie Zellstress zu einer Anpassung der mTOR-Aktivität an die jeweilige Stoffwechselsituation (Hay und Sonenberg 2004).

Nach heutigem Kenntnisstand bildet die Proteinkinase mTOR mit zum Teil verschiedenen Proteinen zwei unterschiedliche Komplexe. Der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) setzt sich aus der Proteinkinase mTOR, Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) und mLST8/G β L (*mammalian lethal with sec thirteen 8/G-protein β -subunit like protein*) zusammen. Wird mTORC1 aktiviert, so kommt es zu:

- einer Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktor-4E-bindenden Proteins-1 (eIF-4E-BP1) und es folgt eine vermehrte Transkription und Translation (Dowling et al. 2009);
- einer Phosphorylierung der S6-Kinase (S6K), die das S6-Protein der 40S-ribosomalen Untereinheit (RPS6) phosphoryliert, was zu gesteigerter Proteinsynthese und Zellwachstum führt (Jacinto und Hall 2003; Morath et al. 2007; Zhao und Gartenhaus 2009);

- einer Aktivierung der p34cdc2-Kinase und somit zu einer Komplexbildung mit Cyclin E, in der Folge kommt es zum Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (Sehgal 2003; Morath et al. 2007).

Der mTOR-Komplex 2 (mTORC2) besteht aus der Proteinkinase mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), GβL, und mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*). mTORC2 phosphoryliert AKT und aktiviert diese dadurch, zudem werden die Proteinkinase C alpha (PKCα) sowie die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase-1 (SGK1) reguliert (Dowling et al. 2009).

1.3.2. Sirolimus

Sirolimus (SRL, Rapamycin, Rapamune®) ist ein Makrolid, das 1970 erstmals aus *Streptomyces hygroscopicus*, einer Art der Gattung *Streptomyces*, isoliert werden konnte und zu der Gruppe der Makrolidantibiotika gehört. *Streptomyces* ist eine Gattung der *Actinobacteria*. Da *Streptomyces hygroscopicus* in Bodenproben der Osterinsel Rapa Nui entdeckt wurde, benannte man die isolierte Substanz zunächst als Rapamycin (Vezina et al. 1975; Panwalkar et al. 2004; Morath et al. 2007).

Nachdem zunächst die fungizide Wirksamkeit dieser Substanz erkannt wurde, stellte sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen auch ihre immunsuppressive und antiproliferative Wirksamkeit dar. Tierexperimentell konnte in den achtziger Jahren eine gute immunsuppressive Wirksamkeit nach Organtransplantationen nachgewiesen werden, so dass SRL 1999 in den USA und 2001 in der Europäischen Union als Arzneimittel unter dem Handelsnamen Rapamune® zur Prophylaxe der Organabstoßung nach einer Organtransplantation zugelassen wurde und bis heute in Kombination mit anderen Immunsuppressiva eingesetzt wird. Durch die fehlende

Nephrotoxizität wird SRL bei gleicher Wirksamkeit häufig als Ersatzpräparat zu den Calcineurin-Inhibitoren verwendet (Paghdal und Schwartz 2007).

Die antiproliferativen Eigenschaften dieser Substanz führten in der Kardiologie zum Einsatz von mit SRL-beschichteten Stents, um eine Hyperplasie der Intima und somit eine Restenose der Koronararterien nach einer Stentimplantation zu verhindern (Rensing et al. 2001; Abizaid 2007; Mutschler et al. 2008). Diese antiproliferative Eigenschaft konnte auch im Rahmen einer 2-jährigen Studie zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) gezeigt werden, in der ein Derivat von SRL, Everolimus, zwar nicht die zunehmende Schädigung, aber die Zunahme des Gesamtvolumens der Niere in Patienten mit ADPKD verlangsamen konnte (Walz et al. 2010).

Zudem werden SRL und dessen Analoga als potentielle Medikamente im Bereich der Krebstherapie angesehen (Panwalkar et al. 2004; Rao et al. 2004). So erhielt ein weiteres Derivat von SRL, Temsirolimus (Torisel[®]), 2007 die Zulassung zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms, nachdem in der ARCC-Studie (*Global Trial for Advanced Renal Cell Carcinoma*) die Überlegenheit von Temsirolimus im Vergleich zu Interferon- α gezeigt werden konnte (Hudes et al. 2007).

Die fungizide, immunsuppressive und antiproliferative Wirksamkeit dieses mTOR-Inhibitors wurde in zahlreichen Studien untersucht (Sehgal 2003; Morath et al. 2007; Christians et al. 2008).

1.3.2.1. Wirkungsmechanismus

Die molekulare Struktur von SRL und Tacrolimus ist ähnlich und beide Immunsuppressiva binden an dasselbe im Zytoplasma lokalisierte Immunophilin

FKBP12 (Armstrong und Oellerich 2001; Morath et al. 2007). Die Wirkung unterscheidet sich jedoch, denn während der FKBP12/Tacrolimus-Komplex die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin inhibiert und so in die frühe Phase der T-Zell-Aktivierung eingreift, lagert sich der FKBP12/SRL-Komplex an die Proteinkinase mTOR an und unterdrückt damit die Aktivität des mTORC1. Hierdurch kommt es zu einer Hemmung der unter 1.3.1. beschriebenen Signaltransduktionswege und zum Arrest des Zellzyklus während des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase. In der Folge kommt es zu einer Abnahme der zellulären Proliferation sowohl in Immunzellen, was zur erwünschten Hemmung der Lymphozytenproliferation führt, aber auch in anderen Zelltypen, was die unerwünschten Arzneimittelwirkungen teilweise erklärt (Morath et al. 2007). Die Aktivität von mTORC2 wird durch SRL nicht gehemmt.

1.3.2.2. Metabolismus

SRL wird hauptsächlich über das Cytochrom-P450-Isoenzym 3A4 (CYP3A4) in Darmwand und Leber metabolisiert (Benet et al. 2004; Oellerich et al. 2004; Paine et al. 2004). Dieses Enzymsystem kann durch bestimmte Stoffe wie zum Beispiel Grapefruitsaft aber auch durch Medikamente in seiner Funktion beeinträchtigt werden (Bailey und Dresser 2004; Nowack 2008). Dabei ist sowohl eine Aktivierung des Enzymsystems und in der Folge ein vermehrter Abbau von SRL mit einem Verlust an Wirksamkeit möglich, als auch eine Blockade des Enzymsystems, was zu einem verminderten Abbau und in der Folge zu einer Akkumulation von SRL mit einer Verstärkung der gewünschten und unerwünschten Arzneimittelwirkungen führt. In Tabelle 1 sind einige der bekannten Stoffe und Medikamente aufgeführt, von denen eine Wirkung auf das Enzymsystem CYP3A4 bekannt ist (Mutschler et al. 2008). SRL ist auch ein Substrat für die im Dünndarm lokalisierte Multisubstanz-

Efflux-Pumpe (P-Glykoprotein, MDR), so dass eine Beeinflussung der Resorption und Elimination durch andere Substanzen auch über diesen Mechanismus möglich ist.

Verstärkte Wirksamkeit durch Inhibition von CYP3A4		Verminderte Wirksamkeit durch Induktion von CYP3A4
Ciclosporin	Amprenavir	Rifampicin
Fluconazol	Indinavir	Johanniskraut
Ketoconazol	Nelfinavir	Carbamazepin
Itraconazol	Ritonavir	Phenobarbital
Voriconazol	Diltiazem	Phenytoin
Clarithromycin	Nicardipin	Efavirenz
Erythromycin	Verapamil	Nevirapin
Telithromycin	Grapefruitsaft	

Tabelle 1: Veränderte Wirksamkeit von Sirolimus durch Inhibition oder Induktion des Cytochrom-P450-Isoenzyms 3A4 (CYP3A4).

1.3.2.3. Dosierung

Die Dosis für eine immunsuppressive Therapie mit SRL wird durch *Drug Monitoring* ermittelt. Hierbei wird durch morgendliche venöse Blutentnahmen vor Einnahme von Medikamenten die SRL-Konzentration im Vollblut bestimmt (Oellerich et al. 2004; Mutschler et al. 2008). Zu Therapiebeginn werden initial einmalig 6 mg SRL *per os* verabreicht, danach einmalig 2 mg pro Tag im Rahmen einer Kombinationstherapie, wobei SRL vier Stunden nach Einnahme des Kombinationspräparats eingenommen werden muss. Als Kombinationspräparate werden neben Ciclosporin auch Mycophenolat Mofetil (MMF, Cellcept[®]) oder Tacrolimus (Prograf[®]) verwendet (Grinyó und Cruzado 2006). Die SRL-Blutkonzentrationen sollten je nach Kombinationspräparat 4-12 ng/ml betragen. Bei der sich anschließenden Erhaltungstherapie wird das Kombinationspräparat stufenweise abgesetzt und gleichzeitig die SRL-Dosis unter *Drug Monitoring* erhöht, bis eine SRL-

Blutkonzentration von 12-20 ng/ml nicht unterschritten wird. Kortikosteroide werden zusätzlich zu der Kombinationstherapie und in der Erhaltungstherapie mit SRL allein verabreicht (Mutschler et al. 2008).

1.3.2.4. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

SRL hemmt effektiv das Immunsystem, wobei es bei Patienten unter einer Therapie mit SRL häufig zu einer Leukopenie mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen, viralen oder mykotischen Infektionen mit zum Teil schweren septischen Verläufen kommen kann. So kommen Infektionen des Harntraktes sehr häufig vor. Die Häufigkeiten der unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Häufigkeit	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
sehr häufig ($\geq 10\%$)	Lymphocele, periphere Ödeme, Diarrhoen, abdominale Beschwerden, Hypokaliämie, Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie (Hyperlipidämie), Arthralgien, Akne
häufig ($\geq 1\% - <10\%$)	abnorme Wundheilungsstörung, Tachykardie, Ödeme, erhöhte Leberwerte, abnormale Leberfunktionstests, Osteonekrosen, Epistaxis, Hautausschlag
gelegentlich ($\geq 0,1\% - <1\%$)	Pankreatitis, Lymphom/lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation, Panzytopenie, erhöhte Anfälligkeit für bösartige Neubildungen vor allem der Haut
selten ($> 0,01\% - <0,1\%$)	tödlich verlaufende Lebernekrosen
sehr selten ($<0,01\%$ und Einzelfälle)	Fälle von interstitieller Lungenerkrankung, einige mit tödlichem Ausgang

Tabelle 2: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Sirolimus und deren Häufigkeit (Quelle: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V. 2004).

Neben einer Leukopenie kommt es auch sehr häufig zu einer Anämie oder Thrombozytopenie, weshalb regelmäßige Blutbildkontrollen bei Patienten unter einer

Therapie mit SRL vorgenommen werden sollten (Mutschler et al. 2008). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine verminderte Wirksamkeit von oralen Kontrazeptiva und Totimpfstoffen. Die Applikation von Lebendimpfstoffen wird nicht empfohlen.

1.4. Proteomics

Proteomics ist eine biochemische Methode zur Untersuchung von Proteinen innerhalb eines biologischen Systems (Lottspeich und Zorbas 1998; Choudhary und Grant 2004). Proteomanalysen verschiedener Gewebe- und Zelllinien oder Körperflüssigkeiten wie Serum, Urin oder Galleflüssigkeit, erfassen neben einer differentiellen Proteinsynthese auch posttranslationale Modifikationen von Proteinen (Clark 2006; Dihazi und Müller 2007). Ein Ziel dieser Analysen ist es, neue und hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität verbesserte Biomarker aufzufinden, um eine frühere Diagnose und verbesserte Prognose bei Erkrankungen zu ermöglichen. Die Beschreibung von Signalwegen und die Identifizierung von Schlüsselproteinen, die möglicherweise als Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie dienen könnten, sind ebenso wie die Untersuchung von Effekten verschiedener Substanzen auf zellulärer und auf Organebene, weitere Ziele dieser Analysen.

Eine Kombination verschiedener Techniken kommt dabei je nach Fragestellung zum Einsatz (Lottspeich und Zorbas 1998; Clark 2006). So werden zur Auftrennung von Proteingemischen neben der zweidimensionalen Gelelektrophorese auch chromatographische Methoden, zur Identifizierung von Proteinen massenspektrometrische Verfahren mit einer Vielzahl von Verfahrensweisen bezüglich der Probenaufbereitung und letztlich auch Methoden der Bioinformatik angewendet und ermöglichen nicht nur die Identifizierung und Charakterisierung von qualitativ und/oder quantitativ veränderten Proteinen, sondern auch aufgrund der Entwicklungen im Bereich der Bioinformatik innerhalb der letzten Jahre, zunehmend

eine Zuordnung von Proteinen zu intrazellulären Signalwegen. Die durch technische Fortschritte möglich gewordene Untersuchung der Zielproteine von Medikamenten ist für die klinischen Untersuchungen des Proteoms von großem Interesse (Robinson et al. 2008). Alternative Untersuchungsmethoden zu der klassischen zweidimensionalen Gelelektrophorese mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung von Proteinspots bilden die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie (CE-MS), die Microarray-Technologie, die Mikroflusstechnologie und die SELDI-TOF/MS (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation-TOF/MS*). Diese verschiedenen Verfahren haben unterschiedliche Vor- und Nachteile und werden je nach Fragestellung angewandt (Thongboonkerd 2008). Ein Beispiel ist die Anwendung von Proteom-Chips zur Identifizierung von möglichen neuen Zielproteinen für die Entwicklung neuer Medikamente innerhalb des mTOR-Signalweges (Huang et al. 2004).

1.5. Hypothese, Zielsetzung und Aufgabenstellung

Der mTOR-Inhibitor SRL, mit den vorbeschriebenen antiproliferativen, immunsuppressiven und fungiziden Eigenschaften, ermöglicht eine Untersuchung der molekularbiologischen Zusammensetzung und Funktion des mTOR-Komplexes. Die genauen Kenntnisse dieser Funktion und der beteiligten Signalwege sind von großem medizinischen Interesse und könnten dabei helfen, die genannten Eigenschaften dieses mTOR-Inhibitors durch die Identifizierung neuer Zielproteine gezielter und dadurch nebenwirkungsärmer zu erreichen.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung des mTOR-Signalwegs und der mTOR-Regulation anhand der CCRF-CEM-Zelllinie. Um die direkten Auswirkungen der mittels SRL erzielten mTOR-Inhibition zu erfassen, wurde eine Kurzzeit-Behandlung von 30 Minuten gewählt. Signifikant veränderte Proteine wurden gesucht, um das

Verständnis bezüglich des mTOR-Komplexes, dessen Regulation und der beteiligten Signalwege zu erreichen.

Deshalb sollten in der vorliegenden Studie

- die verändert phosphorylierten Proteine,
- die quantitativ veränderten Proteine,
- mögliche Interaktionen zwischen den quantitativ/qualitativ veränderten Proteinen,
- mögliche Interaktionen zwischen den veränderten Proteinen und mTOR,

untersucht bzw. dargestellt werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen und erfüllten den Reinheitsgrad pro analysi.

ACN	J. T. Baker, Deventer, Holland
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ameisensäure (<i>Formic acid</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampholyte 3/10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>BioRad Protein Assay</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
BPB	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BrdU	Roche Diagnostics, Penzberg
Butanol	MERCK KGaA, Darmstadt
CaCl ₂	MERCK KGaA, Darmstadt
<i>Cell proliferation ELISA</i>	Roche Diagnostics, Penzberg
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
ddH ₂ O	UMG, Göttingen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Essigsäure 100%	MERCK KGaA, Darmstadt
Ethanol	GeReSo mbH, Einbeck
Formalin	J. T. Baker, Deventer, Holland
Glycerin	MERCK KGaA, Darmstadt

Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>High Pure Template Preparation Kit</i>	Böhringer, Mannheim
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	MERCK KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III)	MERCK KGaA, Darmstadt
KCl	MERCK KGaA, Darmstadt
MgCl ₂	MERCK KGaA, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Niederlande
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Natriumacetat	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
NaCl	MERCK KGaA, Darmstadt
NaOH	MERCK KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	MERCK KGaA, Darmstadt
PBS	GIBCO, Paisley, GB
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Precision Plus Protein All Blue</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein</i>	Invitrogen, Ltd., Paisley, UK
<i>Gel Stain</i>	
HCl	MERCK KGaA, Darmstadt
Silberniträt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
<i>SYBR Green I</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>TaqPolymerase</i>	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thiourea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.2. Zellkultur und Bedarf

Die in dieser Studie verwendete Zelllinie und der Zellkulturbedarf wurden von den nachfolgenden Firmen bezogen. Des Weiteren ist hier die je nach Aufgabenstellung variierende Zusammensetzung des Zellkulturmediums angegeben.

CCRF-CEM-Zellen	DSMZ, Braunschweig
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FCS Gold, Kategorie EU	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Ionomycin	MERCK Chemicals LTD, Beeston, Nottingham, UK
PMA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sirolimus (Rapamycin)	LC Laboratories®, Woburn, MA, USA
Kultivierungsmedium:	90% (v/v) RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10% (v/v) FCS Gold, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Gefriermedium:	70% (v/v) RPMI 1640 mit L-Glutamin, 20% (v/v) FCS Gold, 10% (v/v) DMSO, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Auftaumedium:	80% (v/v) RPMI 1640 mit L-Glutamin, 20% (v/v) FCS Gold, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.1.3. Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, je nach Bedarf mit deionisiertem Wasser (d_dH_2O) oder Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser) hergestellt.

Proteinaufbereitung

Äquilibrationspuffer 1:	6 mol/l Urea; 30% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 0,15 mol/l Tris (pH 8,8); 0,25% (w/v) BPB; 15 mmol/l DTT
Äquilibrationspuffer 2:	6 mol/l Urea; 30% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 0,15 mol/l Tris (pH 8,8); 0,25% (w/v) BPB; 40 g/l Iodoacetamid
BPB-Lösung:	0,25% (w/v) BPB; 1,5 mol/l Tris (pH 8,8)
Lysepuffer:	7 mol/l Urea, 2 mol/l Thiourea; 4% (w/v) CHAPS; 1% (w/v) DTT; 2% (v/v) Ampholyte; 10 mmol/l PMSF; 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1; 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
PBS-Puffer pH 7,4:	137 mmol/l Natriumchlorid; 2,7 mmol/l Kaliumchlorid; 10 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat; 1,76 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat
Rehydrationspuffer:	7 mol/l Urea; 2 mol/l Thiourea; 4% (w/v) CHAPS; 0,2% (w/v) DTT; 1% (v/v) Ampholyte

Elektrophorese

Elektrophoresepuffer (5x):	0,025 mol/l Tris (pH 8,3); 0,192 mol/l Glycin; 0,5% (w/v) SDS
----------------------------	---

Phosphoproteinfärbung

Entfärber:	20% (v/v) ACN; 5% (v/v) Natriumacetat (50 mmol/l, pH 4)
Fixierungslösung:	50% (v/v) Methanol; 12% (v/v) Essigsäure

Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter 595 1/2	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Filterpapier	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Gelgießplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebekulturplatte 96 Loch	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc Intermed, Roskilde, Dänemark
Mikro-Schraubröhre 2 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Parafilm "M"	Parafilm, Chicago, Illinois, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co., Eberstadt
<i>ReadyStrip™ IPG Strip</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reagiergefäß 0,5 ml PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.1.5. Geräte

Zur Durchführung dieser Studie wurden die folgenden Geräte benötigt, die von den jeweils aufgeführten Herstellern bezogen worden waren.

Autoklav	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Brutschrank Cytoperm 2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CanoScan 8400F	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
CapLC-System	Waters, Milford, MA, USA
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
FLA 5100	Fujifilm Europa GmbH, Düsseldorf
Folienschweißgerät Vacupack 2 Plus	Krupps GmbH, Offenbach am Main
<i>Gel Dryer, Model 583</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer (Protean xi 2-D Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hamilton Pipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Hera <i>Safe</i>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Hera <i>freeze</i>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Kühlzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen

Küvetten	Hellma, Müllheim
<i>LightCycler</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co., Staufen
Mikroskop Diavert	Leitz GmbH, Wetzlar
Minifuge 2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Netzteil Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Weilheim
<i>Protean IEF Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Q-TOF Ultima Global equipped with a nanoflow ESI Z-spray source</i>	Waters GmbH, Eschborn
Reinstwasser-System Seralpur pro 90 CN	SERAL Erich Alhäuser GmbH, Ransbach-Baumbach
Schüttelmaschine	Schütt, Göttingen & Bühler, Tübingen
<i>SpeedVac SVC100</i>	UniEquip GmbH, München
Spektrophotometer DU-7500	Beckman, Kalifornien, USA
<i>Steril Gard Hood</i>	The Baker Co., Inc., Sanford, Maine, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschall-Desintegrator <i>Sonifier</i>	Branson Ultraschall GmbH, Dietzenbach
Vakuumpfuge Univapo 150 H	UniEquip GmbH, Martinsried/München
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA und Schütt, Göttingen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wärmeplatte <i>Hot Plate 062</i>	Labotect GmbH, Göttingen
Wärmeschrank	Bachofer Laboratoriums Geräte, Reutlingen
96-Well-Photometer Milenia	Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der CCRF-CEM-Zelllinie

Die CCRF-CEM-Zelllinie (humane T-Lymphoblasten-Zelllinie) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die Inkubation der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen in Kultivierungsmedium bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂. Verwendet wurden ausschließlich Zellen der 10. bis 20. Passage. In 20 ml Kultivierungsmedium wurden 0,25 x 10⁶ Zellen/ml mit 250 µg/l Ionomycin und 10 µg/l PMA aktiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit SRL mit den in den Abbildungen und im Text angegebenen Konzentrationen. SRL wurde in DMSO (1 mg/ml) gelöst und die Aliquots bei -20°C gelagert. Vor einer Inkubation der Zellen wurde diese Stock-Lösung in Kultivierungsmedium gelöst. Für die Kontrollen wurde DMSO ohne SRL in gleicher Menge in Kultivierungsmedium gelöst und anschließend inkubiert.

Konservierung der CCRF-CEM-Zellen in flüssigem Stickstoff

Zum Aufbewahren von Zellpopulationen der gleichen Passage wurden diese gemäß den Vorgaben des DSMZ in Gefriermedium eingefroren. Nach dem Splitten der Zellen wurden die verbliebenden CCRF-CEM-Zellen erneut mit 2000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und mit eiskaltem Gefriermedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Aliquotierung in 1 ml Kryoröhrchen und das Einfrieren bei -20°C. Nach ca. 16 Stunden wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Auftauen von in flüssigem Stickstoff konservierten CCRF-CEM-Zellen

Die Zellen in den Kryoröhrchen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein Falcon-Röhrchen mit Auftaumedium überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen mit 2000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet mit frischem Auftaumedium resuspendiert, bevor die Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben und in den Wärmeschrank gestellt wurden. An den beiden darauf folgenden Tagen wurde das FCS schrittweise auf die für das Kultivierungsmedium übliche Konzentration von 10% FCS reduziert.

2.2.2. Proliferationstest

Die Quantifizierung der CCRF-CEM-Zellproliferation erfolgte mittels ELISA unter Verwendung von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) nach Herstellerangaben in einer 96-Well-Kulturplatte. Pro Well wurden 3×10^4 CCRF-CEM-Zellen in 200 µl Kultivierungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-100 µmol/l; resp. 0,09142-91,42 mg/l) SRL über 48 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Kultivierungsmedium gewechselt und 31 Stunden nach Versuchsbeginn wurden die Zellen gemäß den Herstellerangaben mit 20 µl BrdU-Stammlösung pro Well für die letzten 17 Stunden inkubiert. Die Platten wurden anschließend zentrifugiert, die Zellen mit FixDenat-Lösung denaturiert und ein mit alkalischer Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen BrdU für eine Stunde hinzugegeben. Nach drei Waschsritten wurde die Substratlösung für 15 Minuten hinzugegeben und die Reaktion mit einer 1-molaren H₂SO₄-Lösung gestoppt. Die Absorption wurde innerhalb von fünf Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Referenzwert von 650 nm kolorimetrisch im 96-Well-Photometer gemessen.

2.2.3. Proteinextraktion

Die CCRF-CEM-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit 2,5 µmol/l SRL behandelt. Die behandelten CCRF-CEM-Zellen und die unbehandelten CCRF-CEM-Zellen der Kontrolle wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in Zell-Lysepuffer bei RT lysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach dem Protokoll von *Bradford (1976)* unter Verwendung von *BioRad Protein Assay* gemessen. Zunächst wurde eine Standardkurve aus Rinderserumalbumin (BSA) in Ampuwa hergestellt. Ein Vergleich mit einem Standard einer bekannten BSA-Konzentration ermöglicht eine Aussage über die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe. Anschließend wurden 20 µl einer jeden Probe/Standard in die Messküvetten pipettiert und jeweils 1 ml *BioRad Protein Assay*, das zuvor im Verhältnis 1:5 mit d_4H_2O verdünnt wurde, in jede Messküvette gegeben. *BioRad Protein Assay* enthält *Coomassie (Brilliant) Blue*. Das Absorptionsmaximum von *Coomassie (Brilliant) Blue* verschiebt sich durch Proteinbindung von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Messung erfolgte mittels eines Spektrophotometers nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten bei 595 nm. Die Proteine der einzelnen Proben wurden nach Messung der Proteinkonzentration bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)

Die 2DE wurde gemäß dem Protokoll von *Görg et al. (2000)* durchgeführt. Die erste Dimension steht für die Trennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt, also der Nettoladung der Proteine. Hierfür wurden 180 µg eines Gesamt-Proteinlysats von behandelten und unbehandelten CCRF-CEM-Zellen mit Rehydrationspuffer und BPB-Lösung (1 µl/ml) auf ein Gesamtvolumen von 325 µl aufgefüllt und auf einen 17 cm langen immobilisierten pH-Gradienten (IPG)-Streifen mit einem nichtlinearen pH-

Bereich von 3-10 aufgetragen. Anschließend wurden die IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet und es folgte die passive Rehydratation der IPG-Streifen über 16 Stunden. Die isoelektrische Fokussierung der IPG-Streifen wurde mit der *Protean IEF Cell* bei 20°C mit 32000 Vh durchgeführt. Die IPG-Streifen wurden dann jeweils für 20-30 Minuten in 10 ml Äquilibrationspuffer 1 und nachfolgend in 10 ml Äquilibrationspuffer 2 äquilibriert. Hierbei soll durch das im Äquilibrationspuffer 1 enthaltene DTT eine Reduktion der Disulfidbrücken und durch das im Äquilibrationspuffer 2 enthaltene Iodoacetamid eine Alkylierung der freien Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste erreicht und somit eine folgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht werden. Anschließend wurde je ein IPG-Streifen auf ein 12%iges Polyacrylamid gelegt, das gemäß Tabelle 3 in einem XL-System der Firma BioRad hergestellt wurde. Fünf µl des Molekulargewichtsmarkers *Precision Plus Protein All Blue* wurden auf ein Filterpapier aufgetragen und auf der linken Seite eines jeden Polyacrylamidgels neben dem IPG-Streifen aufgelegt.

Reagenz	2 Polyacrylamidgele	4 Polyacrylamidgele	6 Polyacrylamidgele
ddH ₂ O	24,65 ml	49,3 ml	73,95 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	32,1 ml	64,2 ml	96,3 ml
1,5 mol/l Tris (pH 8,8)	19,25 ml	38,5 ml	57,75 ml
10% SDS	1,1 ml	2,2 ml	3,3 ml
10% APS	385 µl	770 µl	1155 µl
TEMED	25,5 µl	51 µl	76,5 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der 12%igen Polyacrylamidgele

Es folgte die zweite Dimension - die vertikale Auftrennung des bereits nach dem pI aufgetrennten Proteingemischs nach dem MW mittels der SDS-PAGE nach *Laemmli*

(1970). Durch das SDS werden die Proteine denaturiert und Wechselwirkungen werden unterbunden. Zudem erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass sie sich im elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegen. Im Polyacrylamidgel erfolgt dann eine Auftrennung der Proteine nach dem MW, wobei die Polyacrylamid-Matrix als eine Art molekulares Sieb fungiert. Es resultiert eine punktförmige Verteilung der einzelnen Proteine des bereits nach dem pI aufgetrennten Proteingemischs, je nach pI und MW des einzelnen Proteins. Die SDS-PAGE erfolgte bei einer Temperatur von 4°C und einer Spannung von 90 V über etwa 19 Stunden.

2.2.5. Phosphoprotein- und Silberfärbung der 2DE-Polyacrylamidgele

Die 2DE-Polyacrylamidgele wurden dann in Färbekammern überführt und zweimal für 30 Minuten mit 250 ml Fixierungslösung pro Polyacrylamidgel fixiert, anschließend mit ddH_2O gewaschen und nachfolgend die Phosphoproteinfärbung mit *Ready Solution Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Stain* nach Herstellerangaben vorgenommen. Die Phosphoproteinfärbung, die nachfolgende 90-minütige Inkubation in Entfärber, das anschließende Waschen der 2DE-Polyacrylamidgele mit ddH_2O wie auch das Scannen der 2DE-Polyacrylamidgele mit dem Fluoreszenz-Scanner FLA 5100 bei einer Wellenlänge von 532 nm erfolgten im Dunkeln bei RT. Nach dem Scannen der 2DE-Polyacrylamidgele wurde die Silberfärbung gemäß der Methode von *Blum et al.* (1987) durchgeführt. Die 2DE-Polyacrylamidgele wurden mittels Fixierungslösung für eine Stunde fixiert, dann für jeweils 20 Minuten zunächst mit Waschpuffer 1 und nachfolgend mit Waschpuffer 2 gewaschen. Der stets frisch zubereitete Sensitizer wurde für 60 Sekunden auf die 2DE-Polyacrylamidgele gegeben und mit drei 20-sekündigen Waschschritten entfernt, bevor die stets frisch zubereitete Lösung für die Silberfärbung für 20 Minuten auf die 2DE-

Polyacrylamidgele gegeben wurde. Nach drei 20-sekündigen Waschschrinen wurde die Lösung für die Entwicklung auf die 2DE-Polyacrylamidgele gegeben und die Entwicklung nach 2 bis 10 Minuten mittels Fixierungslösung gestoppt. Anschließend wurden die silbergefärbten 2DE-Polyacrylamidgele mit einem CanoScan 8400F digitalisiert und in Lagerungspuffer aufbewahrt oder direkt mit dem *Gel Dryer* über 1,5 Stunden bei 80°C getrocknet.

2.2.6. Auswertung der Proteinspots in den 2DE-Polyacrylamidgelen

Die densitometrische Quantifikation der Proteinspot-Intensität, normalisiert zur Gesamtintensität aller Proteinspots eines Polyacrylamidgels, erfolgte mittels der Software Delta2D gemäß den Herstellerangaben (Luhn et al. 2003). Auswahlkriterium für eine massenspektrometrische Identifizierung von veränderten Proteinspots innerhalb des Phosphoprotein-/Protein-Profils waren signifikante Unterschiede der Proteinspot-Intensität zwischen den behandelten und den unbehandelten CCRF-CEM-Zellen.

2.2.7. Proteinidentifikation

Der In-Gel-Verdau wurde entsprechend dem modifizierten Protokoll von *Shevchenko et al.* (1996) durchgeführt. Die Proteinspots wurden ausgeschnitten und für 10-15 Minuten mit 50 µl einer vor Gebrauch frisch hergestellten Entfärbelösung entfärbt. Nach zweimaligem Waschen der Polyacrylamid-Gelstücke, wurden diese für 20 Minuten durch Zugabe von 50 µl einer 0,1-molaren Ammoniumbicarbonat-Lösung äquilibriert. Es folgte die Hinzugabe von 50 µl ACN, um eine 1 zu 1 Lösung zu erhalten. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde die Lösung entfernt und die Proben in der Vakuumzentrifuge für etwa 15 Minuten getrocknet. Die nachfolgende 45-minütige Inkubation der Polyacrylamid-Gelstücke mit 10 µl Trypsin-Verdau-Puffer

erfolgte auf Eis. Anschließend wurden die Polyacrylamid-Gelstücke mit 20-60 µl Verdau-Puffer ohne Trypsin bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup gegeben und mittels Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die Polyacrylamid-Gelstücke wurden mit jeweils 25-75 µl einer 0,1%igen TFA-Lösung bedeckt und die Eppendorf-Cups dann in einen Schwimmständer für 30 Minuten in ein Ultraschall-Wasserbad gestellt, um die Peptide aus den Polyacrylamid-Gelstücken zu extrahieren. Die Überstände wurden entnommen, zu den bereits getrockneten Überständen hinzugegeben und erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dieser Schritt wurde zunächst mit einer Lösung aus 30% ACN und 70% 0,1%iger TFA-Lösung, danach mit einer Lösung aus 60% ACN und 40% 0,1%iger TFA-Lösung und schließlich mit 100% ACN wiederholt. Die aus den einzelnen Schritten entnommenen Überstände der einzelnen Proben wurden gepoolt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und die Proben dann bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Zur weiteren Analyse wurden die Proben in 0,1%iger Ameisensäure gelöst und 1 µl Probe für die chromatographische Separation auf ein CapLC-System aufgetragen. Die Analyse der Peptid-Sequenzen erfolgte dann mit einem Q-TOF Ultima Global Massenspektrometer nach einer Elektrospray-Ionisation der Probe in positiven Ionen-Modus wie zuvor beschrieben (Asif et al. 2009). Die erhaltenen Daten wurden mit der Software MassLynx verarbeitet und anschließend durch die Mascot-Suchmaschine mit den Protein-Datenbanken MSDB und Swiss-Prot abgeglichen.

2.2.8. Quantitative Real-Time-PCR

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt.

Isolierung von Nukleinsäuren aus Kulturzellen

Aus der CCRF-CEM-Zellkultur wurden 2×10^6 Zellen als Probenmaterial verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert, das Zellpellet mit 200 μ l PBS resuspendiert, 200 μ l Bindungspuffer hinzugegeben, mit 40 μ l Proteinase-K Lösung versetzt und für 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Isopropanol hinzugegeben und der Ansatz für eine Minute mit 10000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaliger Hinzugabe von Waschpuffer und jeweils nachfolgendem Zentrifugieren der Proben wurden die Nukleinsäuren mit 100 μ l Elutionspuffer versetzt und durch erneutes Zentrifugieren in ein frisches Reagiergefäß zur weiteren Analyse überführt. Der Elutionspuffer wurde vor Verwendung auf 70°C vorgewärmt.

Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Der Farbstoff SYBR-Green I interkaliert in die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffs ansteigt. Die Zunahme der Lichtemission wird zur Detektion von DNA eingesetzt und ist somit ein direktes Maß für die Zunahme der gebildeten DNA. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem *LightCycler* durchgeführt. Durch Erhitzen auf 95°C denaturiert die doppelsträngige DNA, so dass an den nun vorliegenden Einzelsträngen sequenzspezifische Primer binden können. Primer sind Oligonukleotide, die als Startpunkt für die *Taq*Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus*, dienen. Erleichtert wird die Anlagerung des Primers an das

jeweilige DNA-*Template* (*Annealing*) durch ein Herabsetzen der Temperatur auf 55°C. Diese sogenannte *Annealing*-Temperatur liegt unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer und ist erforderlich für eine spezifische Bindung der Primer. Die DNA-Synthese erfolgt bei 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur der hitzestabilen *Taq*Polymerase, welche die Anlagerung von Desoxynukleotiden an das 3`-Ende des Primers katalysiert (*Elongation*). So entsteht ein zur DNA-Matrize komplementärer Strang, an welchem die Primer in einem weiteren Reaktionszyklus erneut binden können.

Reaktionsgemisch	Stammlösung	µl	Vorgang	Temp.	Zeit	Zyklen
^{dd} H ₂ O		4,9	Initiale Denaturierung	95°C	30 s	1
LC-MasterMix		2,9	Denaturierung	95°C	1 s	
PCR-Puffer (10 x)	200 mmol/l Tris (pH 8,4) 500 mmol/l KCl	1	Annealing	55°C	5 s	35
MgCl ₂	50 mmol/l	0,6	Elongation	72°C	10 s	
BSA	10 mg/ml	0,5	Messung: Mykoplasma	82-84°C		
DMSO	5% (v/v)	0,5	Messung: Primer	~76°C		
dNTP	je 10 mmol/l	0,2				
<i>Taq</i> Polymerase	5 U/µl	0,1				
SYBR Green I	1:1000	1,0				
Forward Primer	100 µmol/l	0,1				
Reverse Primer	100 µmol/l	0,1				

Tabelle 4: Die linke Tabellenseite zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsgemischs, die rechte Tabellenseite die Bedingungen für die quantitative RT-PCR im LightCycler.

Die Primer für den Nachweis von Mykoplasmen-DNA (Operon Biotechnologies GmbH, Köln) wurden in sterilem Wasser gelöst, so dass die Konzentration 100 pmol/µl betrug. Das folgende Primerpaar wurde verwendet:

Forward Primer: 5' – GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T - 3'

Reverse Primer: 5' – TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC - 3'.

Die Schmelztemperatur der Primer liegt bei ca. 76°C, die der Mykoplasmen-DNA bei ca. 82°C. Die Länge des Replikats beträgt 268 Basenpaare (bp). Das Reaktionsgemisch und die Reaktionslaufbedingungen im *LightCycler* sind in Tabelle 4 dargestellt. Pro 1 µl DNA wurden 9 µl des Reaktionsgemischs hinzugefügt.

2.2.9. Statistik und bioinformatische Auswertung

Die Software Delta2D (V3.6; DECODON GmbH, Greifswald) wurde zur densitometrischen Auswertung der 2DE-Polyacrylamidgele nach einer Phosphoprotein- und einer Silberfärbung verwendet. Der Friedman-Test wurde unter Verwendung einer Software für die statistische Evaluation SPSS (V14.0 für Windows; Chicago, Illinois, USA) vorgenommen. Die massenspektrometrisch ermittelten Daten wurden mittels MassLynx (V4.0; Micromass, Manchester, UK) prozessiert. Die *Molecular INTeraction database* (MINT; <http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>) wurde für die Analyse und für eine graphische Übersicht von direkt und indirekt interagierenden Proteinen innerhalb eines Netzwerkes verwendet (Chatr-aryamontri et al. 2007).

3. ERGEBNISSE

3.1. BrdU-Proliferationstest

Eine 48-stündige Inkubation von CCRF-CEM-Zellen mit einer zunehmenden Konzentration von SRL von 0 zu 100 $\mu\text{mol/l}$ führte zu einer Dosis-abhängigen Inhibierung der Zellproliferation mit einer halbmaximalen Inhibierungskonzentration (IC_{50}) von 2 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 2). Im Bereich der höchsten getesteten Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ betrug die Inhibierung der Zellproliferation um 99.4%.

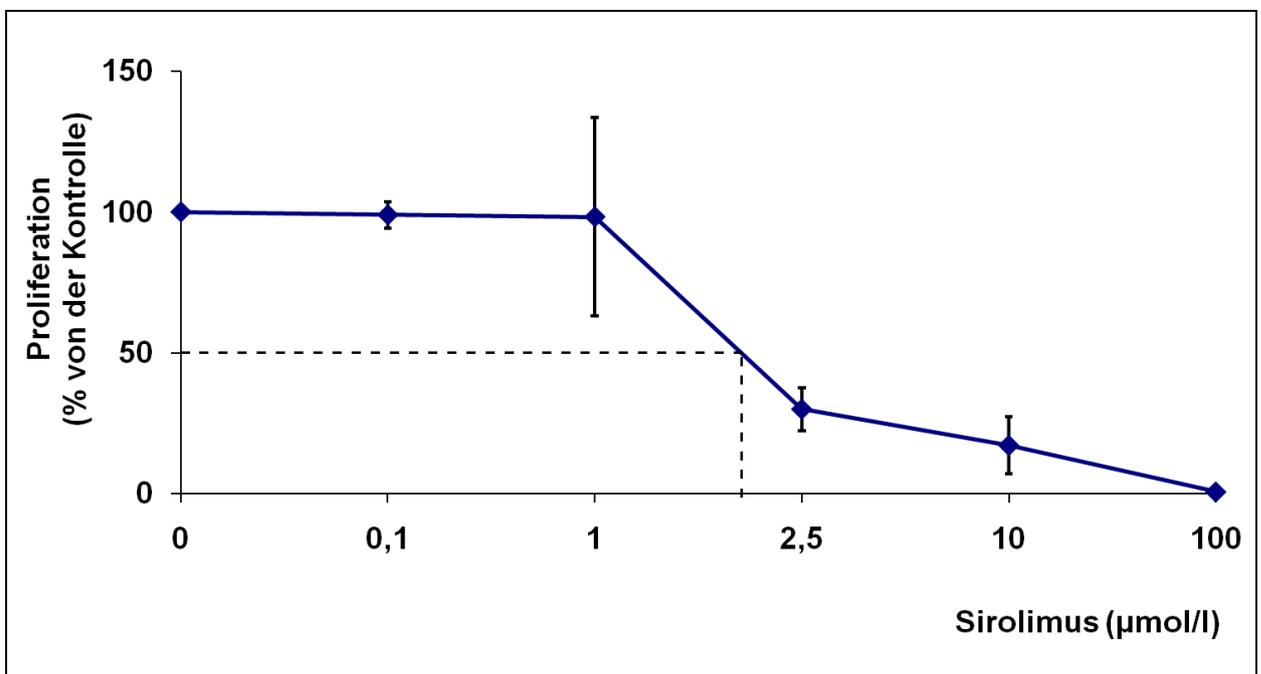


Abbildung 2: Konzentrations-abhängige Inhibierung der CCRF-CEM-Zellproliferation durch Sirolimus. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von fünf Experimenten.

3.2. Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung

Für die Untersuchung der frühen Veränderungen innerhalb des Proteoms und des Phosphoproteoms von CCRF-CEM-Zellen wurden eine 30-minütige Inkubationszeit und eine SRL-Konzentration von 2,5 µmol/l gewählt. Die Proteine von behandelten und unbehandelten CCRF-CEM-Zellen wurden extrahiert und mittels 2DE aufgetrennt. Anschließend wurde eine Phosphoproteinfärbung wie oben beschrieben durchgeführt, die 2DE-Polyacrylamidgele mit dem Fluoreszenz-Scanner FLA 5100 eingescannt und nachfolgend eine Silberfärbung vorgenommen.

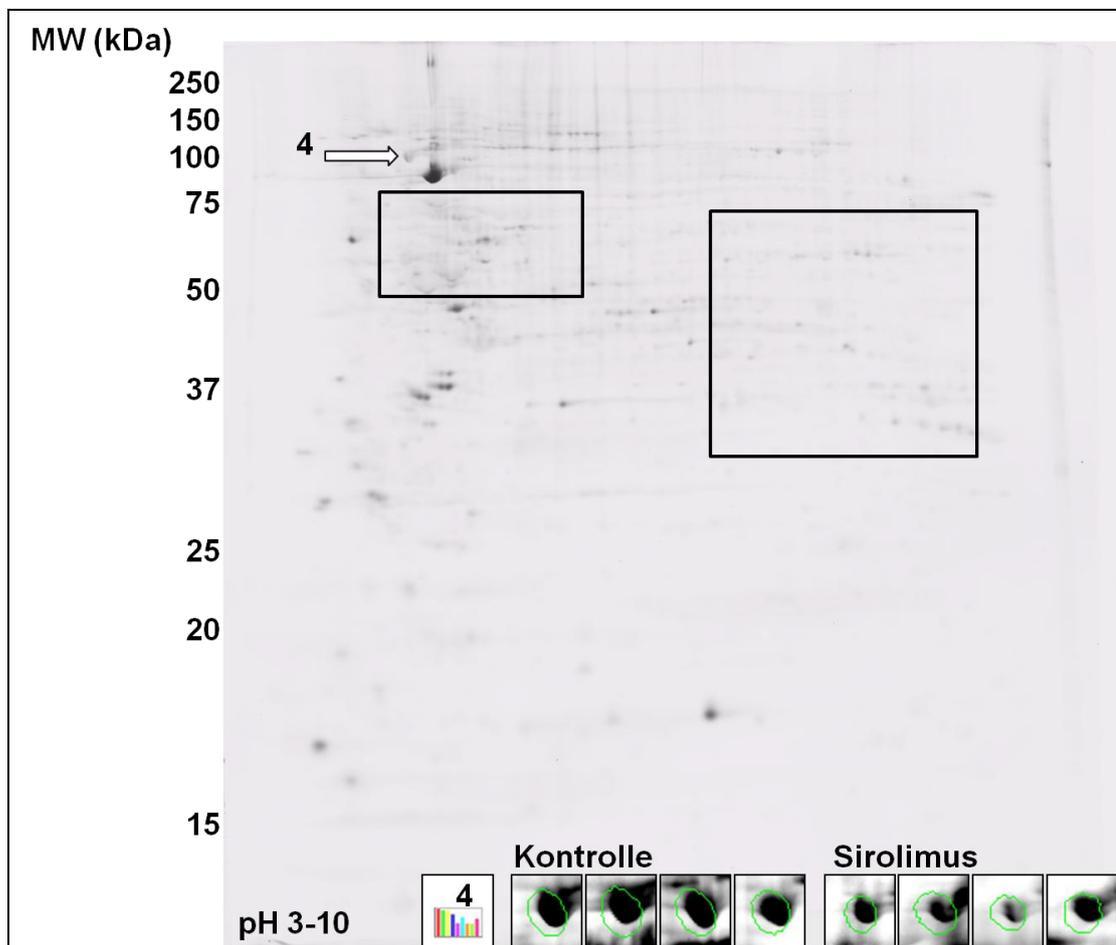


Abbildung 3: Repräsentatives Bild eines Polyacrylamidgels nach einer Phosphoproteinfärbung (*Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain*) und Darstellung des Proteinspots mit der Nummer 4 durch die Software Delta2D in vier Experimenten.

Die Abbildung 3 zeigt exemplarisch das eingescannte Bild einer unbehandelten Probe nach einer Phosphoproteinfärbung. Vier Wiederholungen dieses Experiments wurden durchgeführt, so dass insgesamt vier Bild-Paare von jeweils unbehandelter *versus* SRL-behandelter Probe von phosphoproteingefärbten 2DE-Polyacrylamidgelen mit der Software Delta2D analysiert werden konnten.

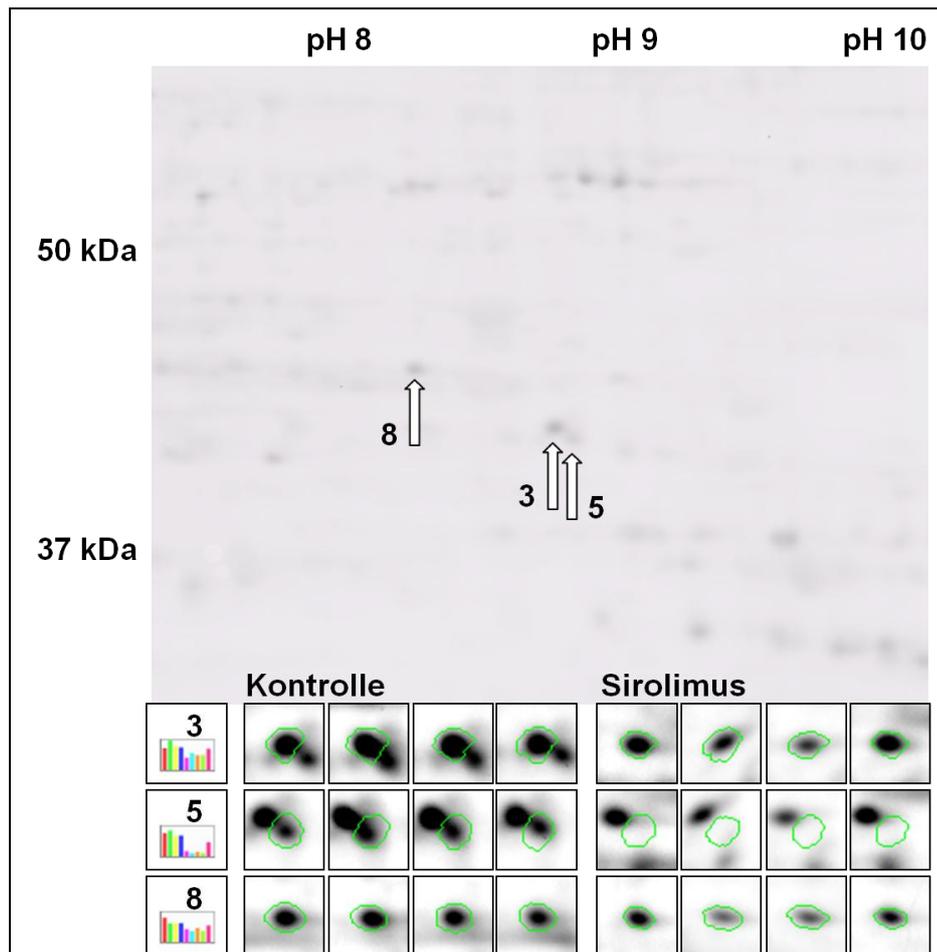


Abbildung 4: Vergrößerte Darstellung aus Abbildung 3 (großer Kasten) eines Polyacrylamidgels aus der Kontrollgruppe nach einer Phosphoproteinfärbung mit Darstellung der Proteinspots 3, 5 und 8 durch die Software Delta2D in vier Experimenten.

Die vergleichende Analyse dieser vier Bild-Paare mittels der Software Delta2D ergab acht Proteinspots mit Veränderungen der relativen Intensität, die alle eine asymptotische Signifikanz im Friedman-Test für verbundene Stichproben aufwiesen

($P < 0.05$). Exemplarisch sind die Proteinspots 3, 4, 5 und 8 und deren Lokalisation innerhalb des Polyacrylamidgels in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Die gemittelte prozentuale Ratio der Proteinspot-Intensitäten und die Standardabweichung von vier Experimenten nach einer Phosphoproteinfärbung der SRL-behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Proben sind in Abbildung 5 als Balkendiagramm und im Anhang unter 6.1. mit den jeweiligen Einzelwerten dargestellt.

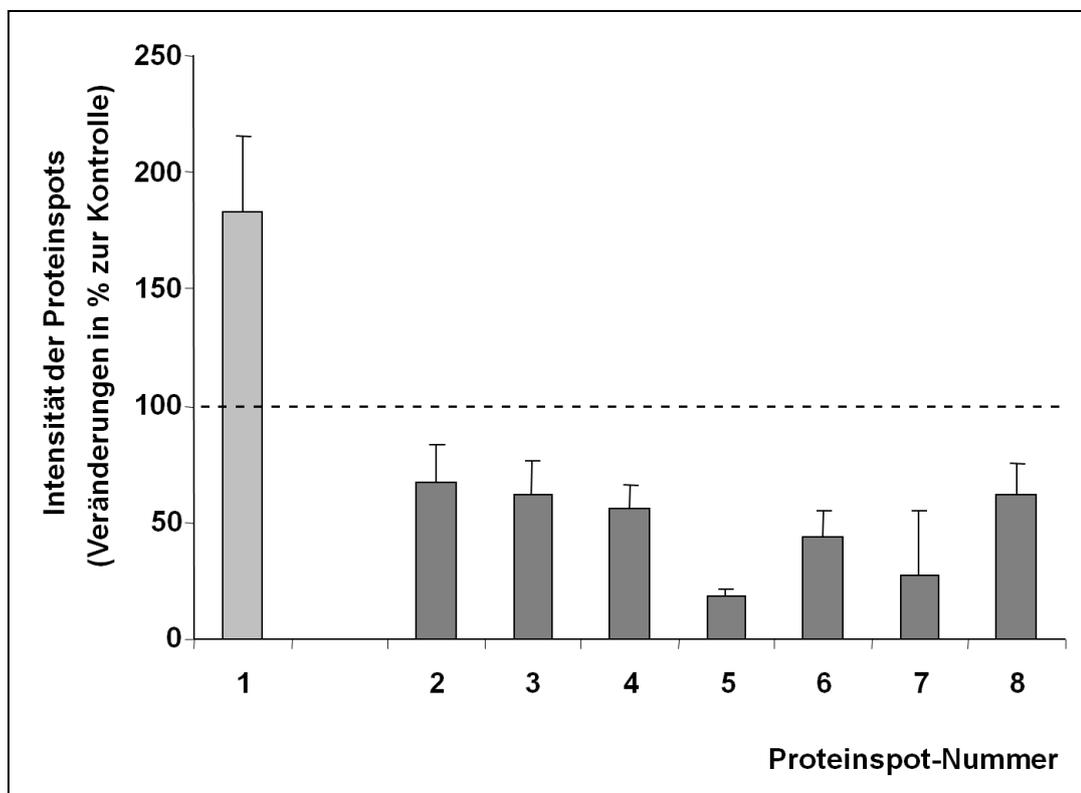


Abbildung 5: Signifikant ($P < 0.05$) veränderte Proteinspots nach einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in phosphoproteingefärbten 2DE-Polyacrylamidgelen. Die Balken zeigen die gemittelte prozentuale Ratio der Proteinspot-Intensitäten (behandelte Zellen versus Kontrollen) und die Standardabweichung von vier Experimenten.

Um diese in der Phosphoproteinfärbung signifikant veränderten Proteinspots identifizieren zu können, wurden die beiden (nach Phosphoprotein- und Silberfärbung) digitalisierten Bilder desselben Polyacrylamidgels derselben Probe

mittels der Software Delta2D übereinandergelegt, um so die korrespondierenden Proteinspots im silbergefärbten Bild zu ermitteln (Abbildung 6). Acht dieser signifikant veränderten Proteinspots konnten nach Auffinden der korrespondierenden Proteinspots im silbergefärbten Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mittels In-Gel-Verdau, Massenspektrometrie und Abfrage der Proteindatenbanken identifiziert werden.

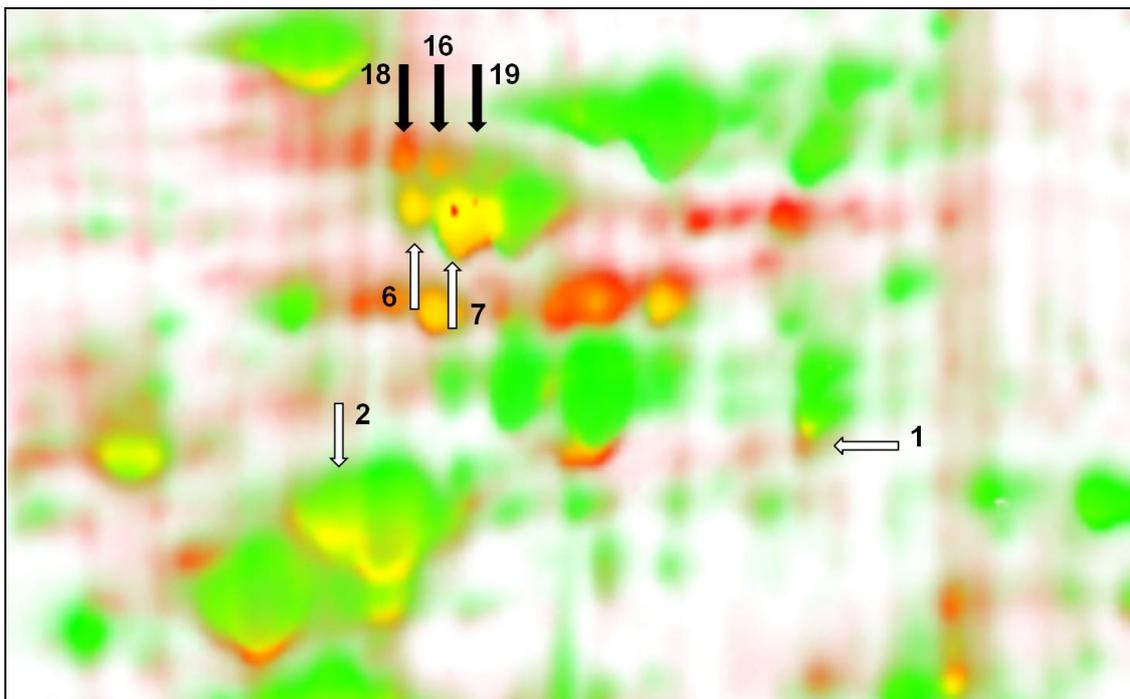


Abbildung 6: Darstellung aus der Software Delta2D. Die digitalisierten Bilder desselben Polyacrylamidgels einer Probe nach einer Phosphoproteinfärbung (rot) und nach einer Silberfärbung (grün) wurden mittels Delta2D übereinander gelegt. Proteinspots der gleichen Intensität in beiden Färbungen erscheinen gelb. Dargestellt sind Vergrößerungen der kleinen Kästen aus den Abbildungen 3 und 7 mit Darstellung der signifikant veränderten Proteinspots innerhalb der phosphoproteingefärbten (weiße Pfeile) und silbergefärbten (schwarze Pfeile) 2DE-Polyacrylamidgelle.

Die acht massenspektrometrisch identifizierten Proteinspots repräsentieren sieben unterschiedliche Proteine. Der Proteinspot-Nr. 1 (Abbildungen 5 und 6), der unter einer SRL-Behandlung eine signifikant erhöhte Phosphorylierung zeigte, konnte als Untereinheit-theta des T-Komplex Proteins 1 (TCPQ) identifiziert werden. Die

Phosphorylierung von sieben Proteinspots war unter einer SRL-Behandlung signifikant vermindert. Die Sequenzanalyse von Proteinspot-Nr. 2 ergab die Anwesenheit von zwei Proteinen, Tubulin alpha-1B Kette (TBA1B) und/oder Vimentin (VIME). Weitere Proteine mit einer verminderten Phosphorylierung waren das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein D0 (HNRPD, Proteinspot-Nr. 3), das Vorläuferprotein des Endoplasmins (ENPL, Proteinspot-Nr. 4), Septin-9 (SEPT9, Proteinspot-Nr. 5), Plastin-2 (PLSL, Proteinspot-Nr. 6 und 7) und nochmals HNRPD (Proteinspot-Nr. 8). Von diesen acht identifizierten Proteinen wurden sechs Proteine durch jeweils einen Proteinspot repräsentiert und zwei Proteine wurden durch jeweils zwei Proteinspots repräsentiert (HNRPD mit Proteinspot-Nr. 3 und 8, PLSL mit Proteinspot-Nr. 6 und 7). Die in der Phosphoproteinfärbung signifikant veränderten Proteine sind in Tabelle 5 mit der Identifikationsnummer des jeweiligen Proteins bei der Proteindatenbank Uniprot sowie mit den geschätzten und errechneten MW und pI dargestellt.

Protein-spot-Nr.	Proteinname (Abkürzungen)	Uniprot ID	MW (kDa) Calc./Obs.	pI Calc./Obs.	Funktion #
<i>Proteinspot mit einem erhöhten Phosphorylierungsstatus unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in den 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Phosphoproteinfärbung:</i>					
1	T-Komplex Protein 1, Untereinheit-theta (TCPQ, CCT8)*	P50990	59,583/~53	5,42/~5,3	Chaperon
<i>Proteinspots mit einem verminderten Phosphorylierungsstatus unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in den 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Phosphoproteinfärbung:</i>					
2	Tubulin, alpha-1B Kette (TBA1B, TUBA1B)*	P68363	50,120/~50	4,94/~4,5	Mikrotubuläre Isoform
	Vimentin (VIME, VIM)*	P08670	53,619/~50	5,06/~4,5	Mikrofilament

3	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein D0 (HNRPD)*	Q14103	38,410/~42	7,62/~7,7	Durch Ubiquitin synthetisiertes nukleäres Ribonukleoprotein
4	Vorläuferprotein des Endoplasmins (ENPL, HSP90B1, GRP94)*	P14625	92,411/~100	4,76/~4,3	Hoch konserviertes molekulares Chaperon
5	Septin-9 (SEPT9)	Q9UHD8	65,361/~41	9,06/~7,8	Zytoskeletales Filament-formendes Protein
6	Plastin-2 (PLSL)	P13796	70,245/~70	5,20/~4,6	Ubiquitiniertes Aktin-bindendes Protein
7	Plastin-2 (PLSL)	P13796	70,245/~70	5,20/~4,7	(siehe oben)
8	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein D0 (HNRPD)*	Q14103	38,410/~44	7,62/~7,4	(siehe oben)
<p>MW (kDa) – Molekulargewicht in Kilodalton, Calc./Obs. – errechnete/geschätzte Werte, pI – isoelektrischer Punkt, N/A – keine Informationen verfügbar, * – Proteine innerhalb eines Netzwerks in MINT; # – Informationen verfügbar unter http://www.proteinatlas.org, http://www.matrixscience.com oder http://www.ncbi.nlm.nih.gov</p>					

Tabelle 5: Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und die Funktion der signifikant veränderten Proteine nach einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in den 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Phosphoproteinfärbung.

3.3. Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge

Die phosphoproteingefärbten 2DE-Polyacrylamidgele wurden anschließend einer Silberfärbung wie oben beschrieben unterzogen. Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch das digitalisierte Bild einer unbehandelten Probe nach der Silberfärbung.

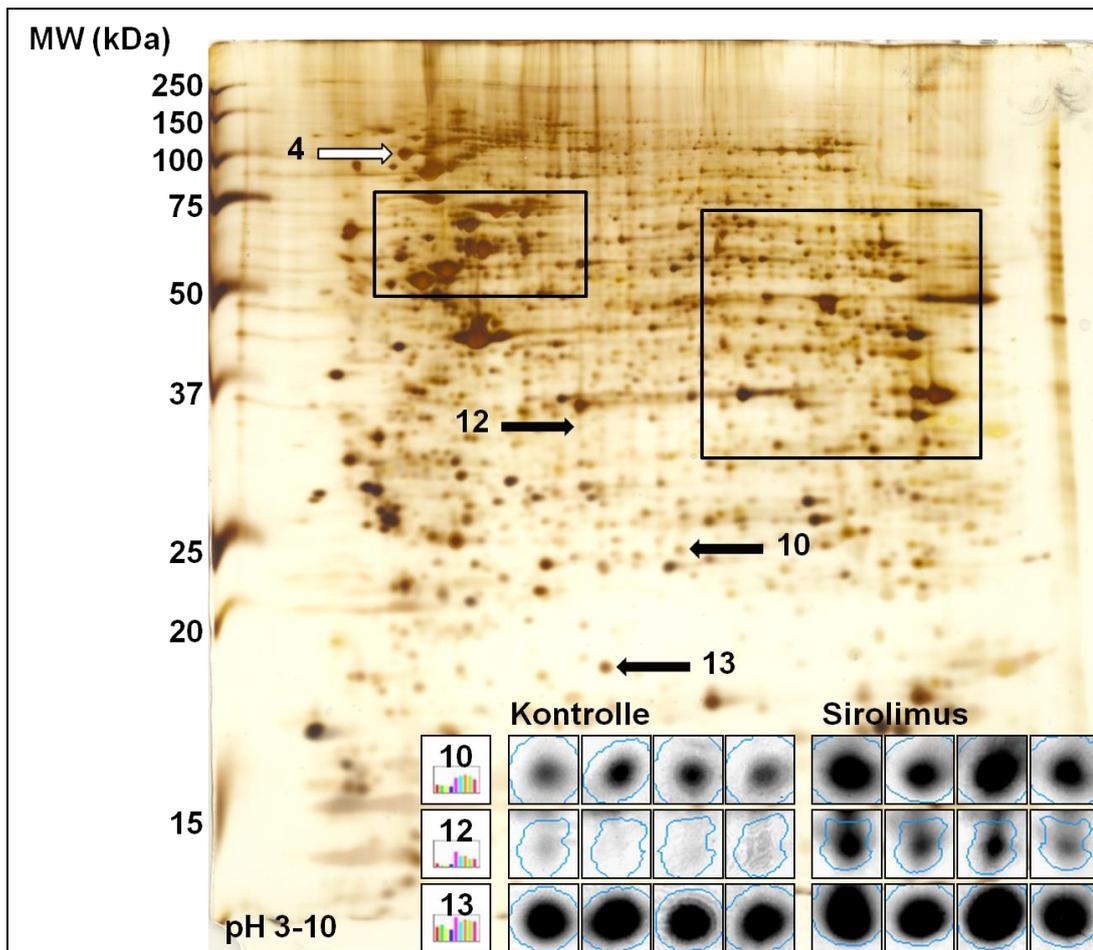


Abbildung 7: Repräsentatives Bild eines Polyacrylamidgels nach einer Silberfärbung und Darstellung der Proteinspots 10, 12 und 13 mittels der Software Delta2D in vier Experimenten. Der weiße Pfeil zeigt einen in der Phosphoproteinfärbung signifikant veränderten Proteinspot. Die schwarzen Pfeile zeigen die in der Silberfärbung signifikant veränderten Proteinspots.

Vier Wiederholungen dieses Experiments wurden durchgeführt, so dass insgesamt vier Bild-Paare von jeweils unbehandelter *versus* SRL-behandelter Probe von silbergefärbten 2DE-Polyacrylamidgelen mit der Software Delta2D analysiert werden konnten. Die vergleichende Analyse der digitalisierten Bilder der silbergefärbten

2DE-Polyacrylamidgеле mittels der Software Delta2D ergab elf Proteinspots mit Veränderungen der relativen Intensität, die alle eine asymptotische Signifikanz im Friedman-Test für verbundene Stichproben aufwiesen ($P < 0.05$).

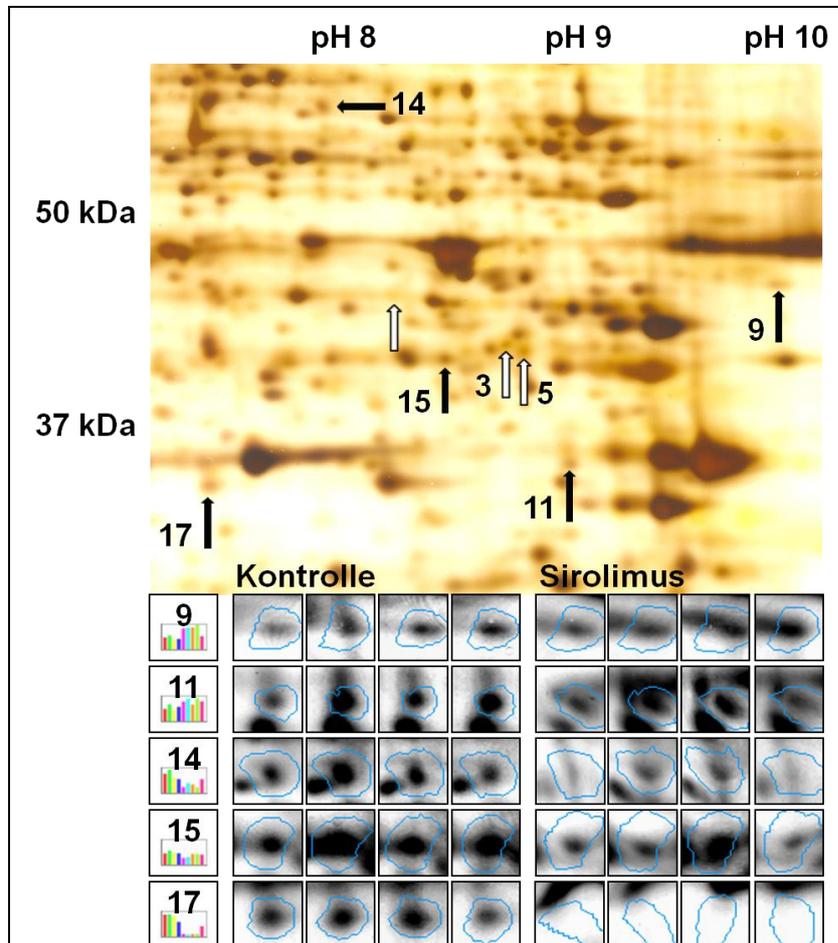


Abbildung 8: Vergrößerte Darstellung aus Abbildung 7 (großer Kasten) eines Polyacrylamidgels aus der Kontrollgruppe nach einer Silberfärbung mit Darstellung der Proteinspots 9, 11, 14, 15 und 17 durch die Software Delta2D in vier Experimenten. Die weißen Pfeile zeigen die in der Phosphoproteinfärbung signifikant veränderten Proteinspots. Die schwarzen Pfeile zeigen die in der Silberfärbung signifikant veränderten Proteinspots.

Exemplarisch ist die Lokalisation der Proteinspots 10, 12 und 13 innerhalb des Polyacrylamidgels in Abbildung 7 und die Lokalisation der Proteinspots 9, 11, 14, 15 und 17 in Abbildung 8 dargestellt. Die gemittelte prozentuale Ratio der Proteinspot-Intensitäten und die Standardabweichung von vier Experimenten nach einer Silberfärbung der SRL-behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Proben

sind in Abbildung 9 als Balkendiagramm und im Anhang unter 6.2. mit den jeweiligen Einzelwerten dargestellt.

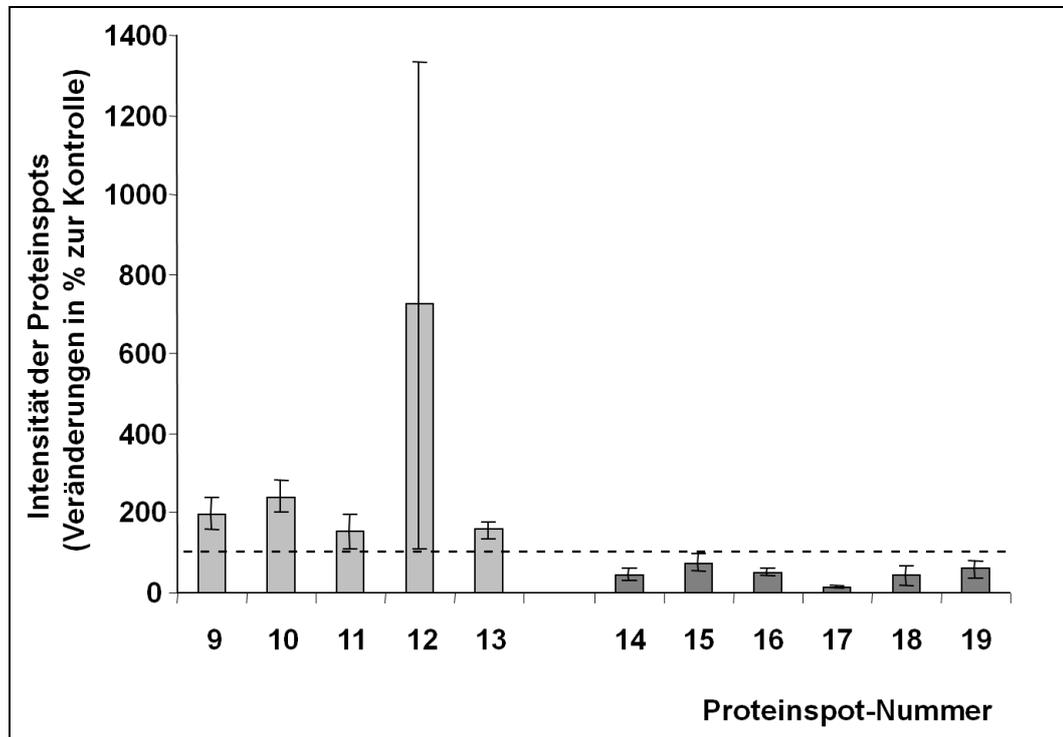


Abbildung 9: Signifikant ($P < 0.05$) veränderte Proteinspots nach einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Silberfärbung. Die Balken zeigen die gemittelte prozentuale Ratio der Proteinspot-Intensitäten (behandelte versus unbehandelte Zellen) und die Standardabweichung von vier Experimenten.

Elf der signifikant veränderten Proteinspots konnten mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, die wiederum neun unterschiedliche Proteine repräsentieren. Fünf Proteinspots zeigten eine signifikant gesteigerte Intensität in der Silberfärbung nach einer SRL-Behandlung der CCRF-CEM-Zellen, die folgende fünf Proteine repräsentieren: die Untereinheit-beta des mitochondrialen Vorläuferproteins des trifunktionalen Enzyms (ECHB, Proteinspot-Nr. 9), die Untereinheit-beta des Proteasom Typ-3 (PSB3, Proteinspot-Nr. 10), das mitochondriale Vorläuferprotein der bifunktionalen Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase/Cyclohydrolase (MTDC, Proteinspot-Nr. 11), die B-Kette der L-Laktat-Dehydrogenase (LDHB, Proteinspot-Nr.

12) und die Nucleosiddiphosphat-Kinase A (NDKA, Proteinspot-Nr. 13). Die Intensität von sechs Proteinspots war nach einer SRL-Behandlung der CCRF-CEM-Zellen in der Silberfärbung signifikant erniedrigt, die folgende vier Proteine repräsentieren: das EH-Domäne-enthaltende-Protein 1 (EHD1, Proteinspot-Nr. 14), die zytoplasmatische Aspartat-Aminotransferase (AATC, Proteinspot-Nr. 15), Lamin-B1 (LMNB1, Proteinspot-Nr. 16, 18 und 19) und die zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase (MDHC, Proteinspot-Nr. 17). Die in der Silberfärbung signifikant veränderten Proteine sind in Tabelle 6 mit der jeweiligen Identifikationsnummer bei der Proteindatenbank Uniprot sowie mit den geschätzten und errechneten MW und pI dargestellt.

Protein-spot-Nr.	Proteinname (Abkürzungen)	Uniprot ID	MW (kDa) Calc./Obs.	pI Calc./Obs.	Funktion #
<i>Proteinspots mit einer vermehrten Gesamtmenge unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Silberfärbung:</i>					
9	mitochondriales Vorläuferprotein des trifunktionalen Enzyms, Untereinheit-beta (ECHB, HADHB) *	P55084	51,262/~45	9,45/~9	Katalysator in der mitochondrialen β -Oxidation langkettiger Fettsäuren mit 3-Ketoacyl-CoA Thiolase-Aktivität
10	Untereinheit-beta des Proteasom- Typ-3 (PSB3, PSMB3) *	P49720	22,933/~23	6,14/~6,6	Immunoproteasom
11	mitochondriales Vorläuferprotein der bifunktionalen Methylentetrahydrofolat Dehydrogenase/ Cyclohydrolase (MTDC)	P13995	37,871/~37	8,86/~8,3	Zellkern-codiertes mitochondriales Enzym
12	B-Kette der L-	P07195	36,615/~32	5,71/~5,8	Kohlenhydrat-

	Lactat-Dehydrogenase (LDHB)*				stoffwechsel
13	Nucleosid-diphosphat-Kinase A (NDKA, nm23-H1, NME1)	P15531	17,138/~18	5,83/~6	Suppressor des invasiven Tumor-Phänotyps, Transkriptionsfaktor und Aktivator von MYC
<i>Proteinspots mit einer verminderten Gesamtmenge unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Silberfärbung:</i>					
14	EH-Domäne enthaltendes Protein 1 (EHD1)	Q9H4M9	60,589/~60	6,35/~7,4	Substrat für EGFR bei Protein-Protein-Interaktionen und intrazellulärer Proteinsortierung
15	zytoplasmatische Aspartat-Aminotransferase (AATC; GOT1)	P17174	46,219/~40	6,52/~7,8	Pyridoxal Phosphat-abhängiges Enzym im Aminosäuren Metabolismus, Harnstoff- und Citratzyklus
16	Lamin-B1 (LMNB1)*	P20700	66,368/~70	5,11/~4,8	Matrix der Kernmembran
17	zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase (MDHC, MDH1)	P40925	36,403/~33	6,91/~7	Katalysator der reversiblen Oxidation von Malat zu Oxalacetat
18	Lamin-B1 (LMNB1)*	P20700	66,368/~70	5,11/~4,7	(siehe oben)
19	Lamin-B1 (LMNB1)*	P20700	66,368/~70	5,11/~4,9	(siehe oben)
MW (kDa) – Molekulargewicht in Kilodalton, Calc./Obs. – errechnete/geschätzte Werte, pI – isoelektrischer Punkt, N/A – keine verfügbaren Informationen, * – Proteine innerhalb eines Netzwerks in MINT; # – Informationen verfügbar unter http://www.proteinatlas.org , http://www.matrixscience.com oder http://www.ncbi.nlm.nih.gov					

Tabelle 6: Das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt und die Funktion der signifikant veränderten Proteine nach einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen in 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Silberfärbung.

Die Hälfte aller identifizierten Proteine wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus unterschiedlichen 2DE-Polyacrylamidgelen erneut ausgeschnitten und massenspektrometrisch mittels ESI-TOF MS/MS identifiziert. Die wiederholten massenspektrometrischen Untersuchungen der signifikant veränderten Proteinspots bestätigten die initial erhobenen Daten.

3.4. Mykoplasmentest

Eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen wurde durch eine Real-Time-PCR ausgeschlossen. Die Schmelzkurven sind in Abbildung 10 dargestellt.

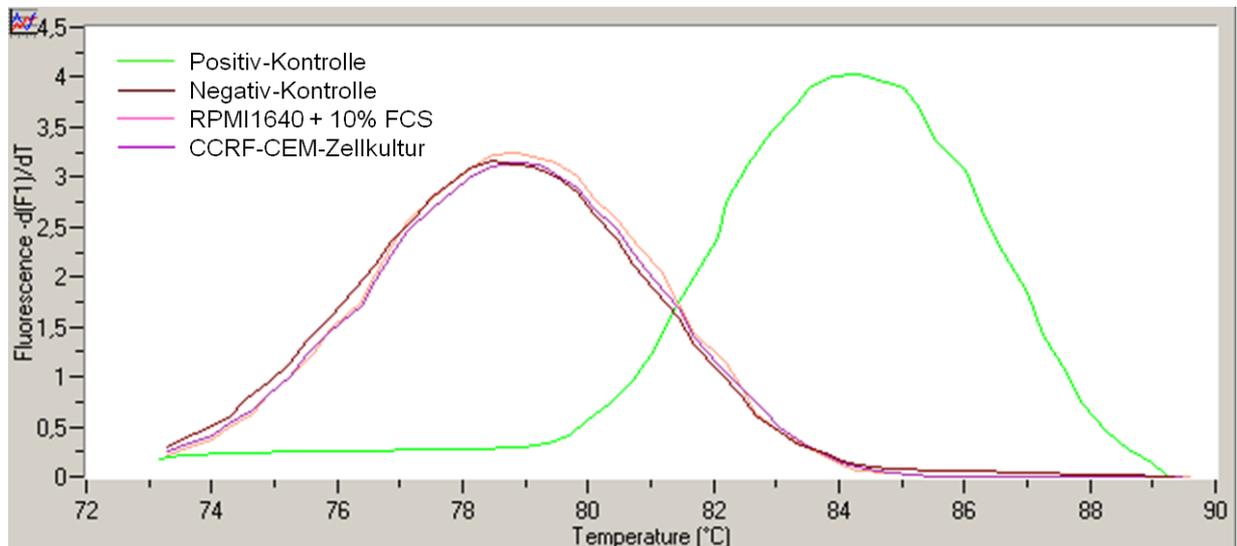


Abbildung 10: Die Schmelzkurven einer Positiv-Kontrolle (grün), einer Negativ-Kontrolle (dunkelbraun), des Zellmediums RPMI1640 mit 10% FCS (rosa) und der CCRF-CEM-Zellkultur (lila).

3.5. Bioinformatische Analyse der identifizierten Proteine

Die identifizierten Proteine wurden mit Hilfe der MINT-Datenbank (Chatr-aryamontri et al. 2007) analysiert. Ein Zusammenhang ergab sich für neun der sechzehn identifizierten Proteine (56%), die sich innerhalb eines Netzwerks darstellten: TCPQ, TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, ECHB, PSB3, LDHB und LMNB (Abbildung 11). Vier Proteine (NDKA, EHD1, AATC und MDHC) stellten sich innerhalb eines anderen Netzwerkes als miteinander kommunizierend dar. Die Proteine SEPT9, PLSL und MTDC ließen sich mittels dieser Datenbank keinem gemeinsamen Signalweg zuordnen.

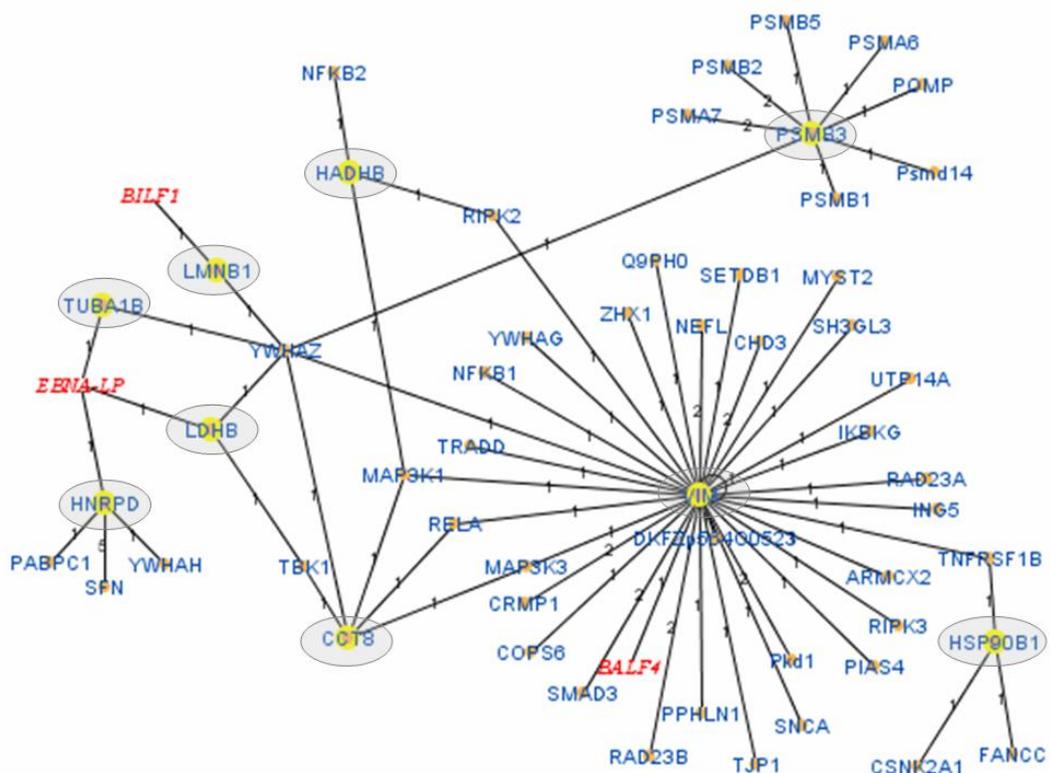


Abbildung 11: In einem Netzwerk von interagierenden Proteinen sind die in dieser Studie als signifikant veränderten Proteine umkreist und grau unterlegt worden: TCPQ (hier CCT8), TBA1B (TUBA1B), VIME (VIM), HNRPD, ENPL (HSP90B1), ECHB (HADHB), PSB3 (PSMB3), LDHB und LMNB1 (Quelle: Molecular INTERaction database (MINT) 2009. Verfügbar unter: <http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>. Zugriff am 14.06.2009; Chatr-aryamontri et al. 2007).

4. DISKUSSION

4.1. Inhibierung der Zellproliferation durch Sirolimus

Wir führten eine differentielle Analyse des Proteoms und des Phosphoproteoms von CCRF-CEM-Zellen nach einer Kurzzeit-Inkubation mit SRL durch. Eine Inkubation mit SRL führte zu einer Dosis-abhängigen Inhibition der Zellproliferation (Abbildung 2). Bei einer durchschnittlichen Proliferationsrate der CCRF-CEM-Zellen von 30% bei 2,5 µmol/l SRL gegenüber der unbehandelten Kontrolle, wurde diese Konzentration für die weiteren Untersuchungen des Proteoms und des Phosphoproteoms verwendet.

4.2. Durch Sirolimus signifikant veränderte Proteine

Unter Verwendung von 2DE und ESI-TOF MS/MS konnten wir darstellen, dass eine 30-minütige Inkubation mit 2,5 µmol/l SRL zu einem signifikant veränderten Status der Phosphorylierung in CCRF-CEM-Zellen führt (Abbildung 5). Die Auswertung der Ergebnisse ergab ein vermehrt phosphoryliertes Protein (TCPQ) und sechs vermindert phosphorylierte Proteine (TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, SEPT9, PLSL), die in Tabelle 5 und in Abbildung 12 aufgeführt sind. Unter diesen Proteinen zeigten SEPT9 (Proteinspot-Nr. 5) und PLSL (Proteinspot-Nr. 7) eine mehr als 3fach verminderte Phosphorylierung in den SRL-behandelten CCRF-CEM-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Kontrolle (Tabelle Anhang 6.1.).

Wir konnten anhand derselben 2DE-Polyacrylamidgele mittels einer Silberfärbung auch signifikante Veränderungen der Proteinkonzentrationen feststellen (Abbildung 9). Die Auswertung der Ergebnisse ergab fünf Proteine mit einer erhöhten Gesamtmenge (ECHB, PSB3, MTDC, LDHB, NDKA) und vier Proteine mit einer verminderten Gesamtmenge (EHD1, AATC, LMNB1, MDHC), die in Tabelle 6 und in

Abbildung 12 aufgeführt sind. Unter diesen Proteinen zeigte LDHB (Proteinspot-Nr. 12) eine mehr als 3fach erhöhte Gesamtmenge und MDHC (Proteinspot-Nr. 17) eine mehr als 3fach verminderte Gesamtmenge in den SRL-behandelten CCRF-CEM-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Kontrolle (Abbildung 12, Tabelle Anhang 6.2.).

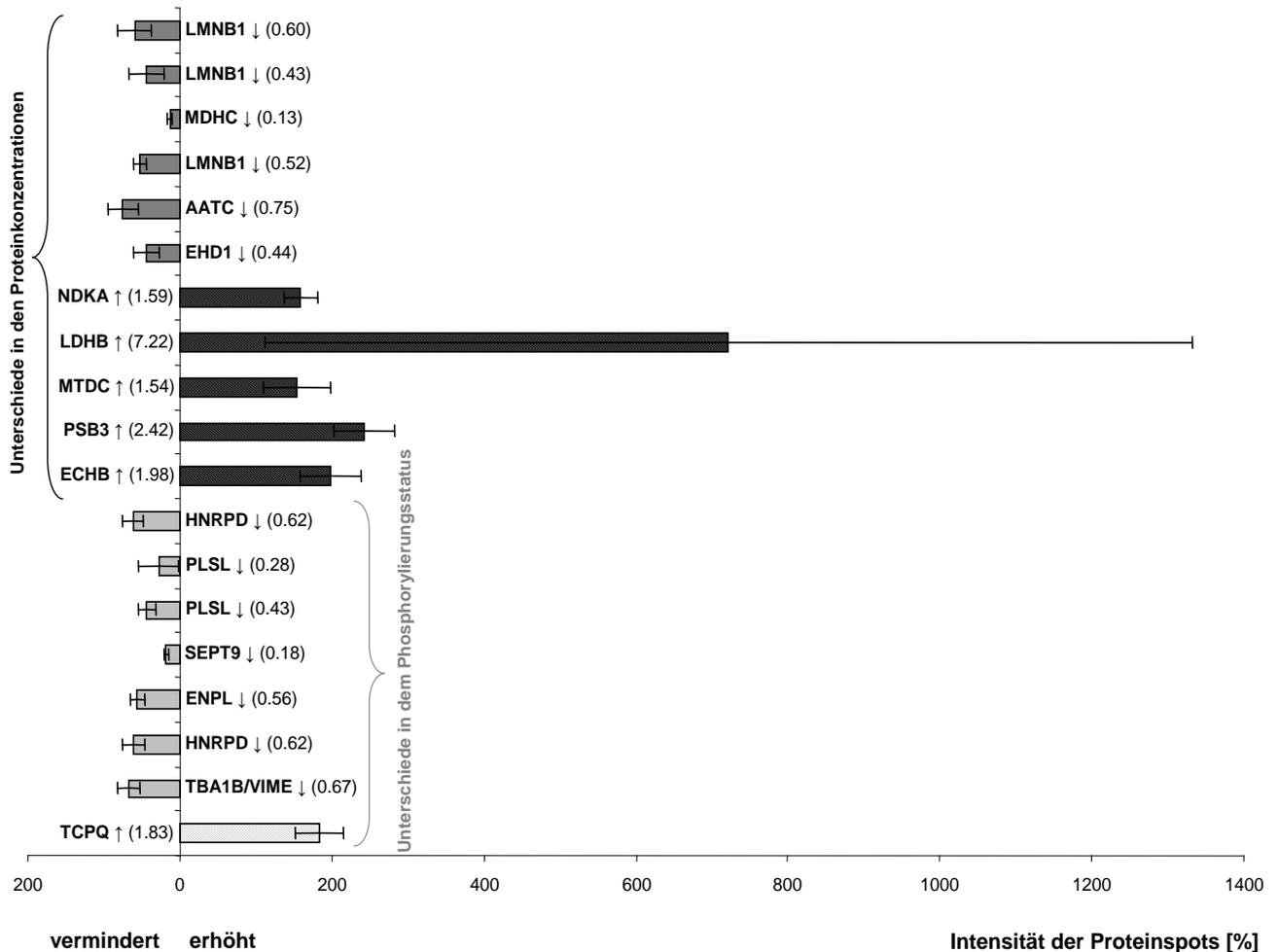


Abbildung 12: Signifikante Veränderungen in den Proteinkonzentrationen bzw. im Phosphorylierungsstatus nach einer 30-minütigen Inkubation von CCRF-CEM-Zellen mit 2,5 µmol/l Sirolimus.

Insgesamt zeigten die Proteine eine gute Übereinstimmung zwischen dem anhand der 2DE-Polyacrylamidgele festgestellten MW und pI und den auf der Basis der Aminosäuresequenzen errechneten Werten (Tabellen 5 und 6). Die meisten der

nach 2DE und beiden Färbungen identifizierten Proteine sind im Hinblick auf eine Zuordnung zu Zellkompartimenten im Zytoplasma gelegen, gefolgt von einigen Proteinen aus dem Nukleus, Membranproteinen und mitochondrialen Proteinen. Die meisten Proteine, die Veränderungen hinsichtlich ihrer Gesamtmenge aufwiesen, waren Enzyme (Transferasen, Peptidasen, Hydrolasen und Oxidoreduktasen), wohingegen die meisten Proteine mit verändertem Phosphorylierungsstatus Mikrofilamente und Chaperone darstellten (Tabellen 5 und 6).

4.3. Bioinformatische Analyse

4.3.1. Signifikant veränderte Proteine und YWHAZ

Die Analyse bezüglich möglicher Zusammenhänge zwischen den signifikant veränderten Proteinen und Phosphoproteinen mit Hilfe der MINT-Datenbank (Chatr-aryamontri et al. 2007) ergab einen Zusammenhang für neun der identifizierten Proteine (TCPQ, TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, ECHB, PSB3, LDHB, LMNB1) die sich innerhalb eines Netzwerks darstellten. Sechs dieser Proteine (TBA1B, LMNB1, PSB3, VIME, LDHB, TCPQ) stehen über das Protein YWHAZ in direkter Verbindung zueinander, zwei Proteine (ENPL, ECHB) stehen indirekt mit VIME und darüber mit YWHAZ in Verbindung und HNRPD steht indirekt mit YWHAZ in Verbindung (Abbildungen 11 und 13).

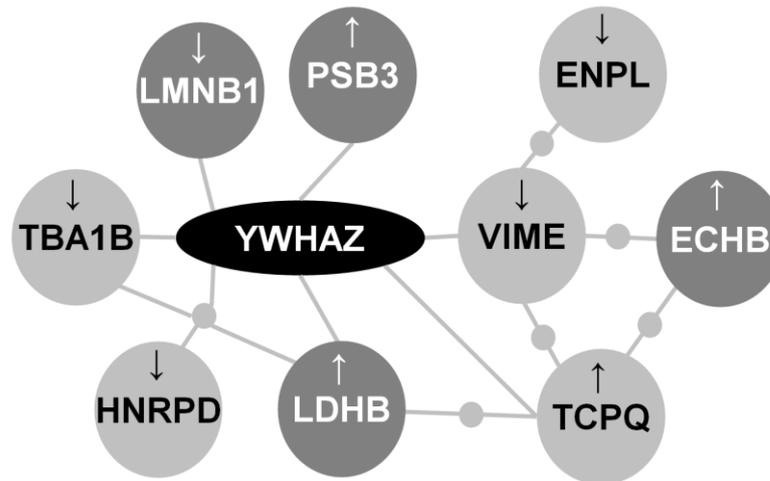


Abbildung 13: Darstellung der neun in dieser Studie identifizierten Proteine und des Proteins YWHAZ, für die eine Beziehung mit Hilfe der MINT-Datenbank gezeigt werden konnte. Auf hellgrauem Untergrund sind die Proteine mit signifikant verändertem Phosphorylierungsstatus dargestellt und auf dunkelgrauem Untergrund die Proteine mit signifikant veränderter Proteinkonzentration. Die Pfeile geben an, ob eine Zu- (↑) oder Abnahme (↓) der jeweiligen Veränderung vorliegt.

4.3.2. Die Familie der 14-3-3-Proteine

Die 14-3-3-Proteine gehören zu einer evolutionär hochkonservierten Multigen-Familie kleiner, saurer Proteine. Bei Säugetieren kommen sieben Isoformen der 14-3-3-Proteine vor, die Molmassen von 28-33 kDa aufweisen und mit den griechischen Buchstaben β , γ , ϵ , σ , η , ζ und τ gekennzeichnet werden. In den meisten Fällen binden die 14-3-3-Proteine ihre Zielproteine, wenn diese in ihrer phosphorylierten Form vorliegen; zwei anerkannte Bindungsmotive konnten mit RSXpSXP und RX(Y/F)XpSXP identifiziert werden, wobei pS entweder Phosphoserin oder Phosphothreonin darstellt. Die Bindung der 14-3-3-Proteine an die individuellen Zielproteine kann die enzymatische Aktivität, die subzelluläre Lokalisation, die Protein-Protein-Interaktionen, die Dephosphorylierung und die Proteolyse dieser individuellen Zielproteine verändern. Die 14-3-3-Proteine binden an und regulieren zahlreiche Regulatoren des Zellzyklus, darunter Wee1, Cdc25A, Cdc25B und Cdc25C. In jedem dieser Fälle binden die 14-3-3-Proteine diese Regulatoren

während der Interphase des Zellzyklus, nicht jedoch während der Mitose (Meek et al. 2004).

Das YWHAZ (Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase Aktivierungsprotein, zeta-Polypeptid, 14-3-3-zeta) gehört zu der Familie der 14-3-3-Proteine und ist als ein Transkriptionsfaktor bindendes Protein bekannt, das an der Anti-Apoptose, der Proteinmarkierung und der Signaltransduktion beteiligt ist. Die Abbildung 14 zeigt eine Vielzahl von Proteinen, für die in verschiedenen Studien ein Zusammenhang mit YWHAZ beschrieben werden konnte.

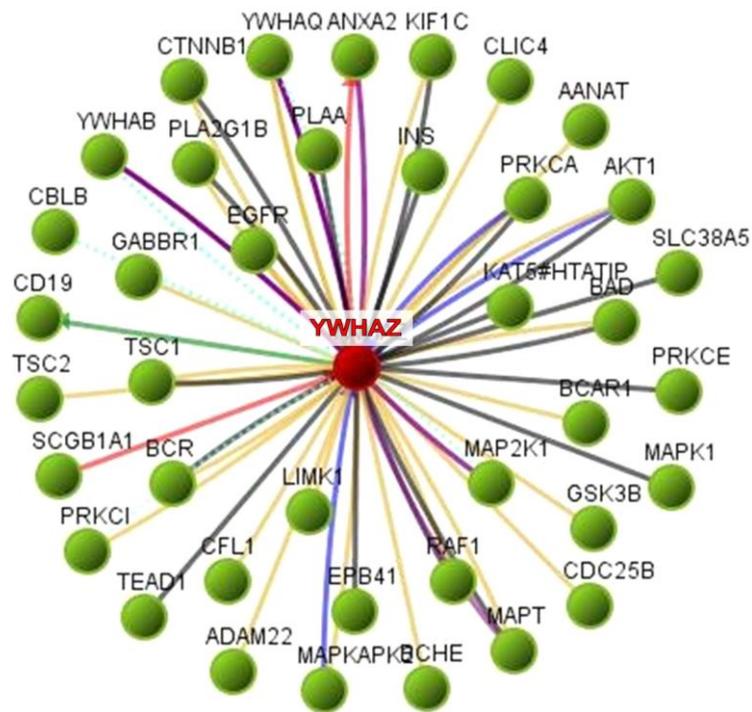


Abbildung 14: YWHAZ steht mit einer Vielzahl von Proteinen in einem Zusammenhang, von denen einige auch an dem PI3K/AKT-Signalweg und an dem EGF/PDGF-Signalweg teilnehmen (Quelle: mit freundlicher Genehmigung von SABiosciences™, Frederick, Maryland, USA. Verfügbar unter: <http://www.sabiosciences.com/genenetwork/genenetworkcentral.php>. Zugriff am 26.02.2010. Copyright © 2000-2010 SABiosciences™, a QIAGEN company).

So wurde vermutet, dass die Assoziation mit 14-3-3-Proteinen sowohl bei der Regulation der Insulinsensitivität durch eine Unterbrechung der Bindungsfähigkeit des Insulinrezeptors und dessen Substrats (Ogihara et al. 1997) als auch bei der

Aktivierung von c-Raf durch eine Beteiligung an dem Signalweg der PKC eine Rolle spielt (Leffers et al. 1993). Die Aktivierung der PKC ist vermutlich an der Induktion der Zellantwort auf eine Vielzahl von Liganden-gesteuerten Rezeptorsystemen und an der Regulation der Fähigkeit zur Zellantwort auf externe Stimuli beteiligt.

4.3.3. YWHAZ und der mTOR-Signalweg

In einem zweiten Schritt wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen YWHAZ und dem mTOR-Signalweg gibt. SRL bindet an das Immunophilin FKBP12 und bildet mit diesem einen Komplex. Dieser Komplex lagert sich dann an mTOR an, was zu einer Inhibition des mTOR-Komplexes führt. mTOR konnte aus HeLa-Zelllysaten mittels einer YWHAZ-Affinitätssäule als Interaktionspartner des YWHAZ in einer Studie identifiziert werden (Meek et al. 2004).

Die AKT ist über den PIK3-Signalweg dem mTOR-Komplex vorgeschaltet und ist an dessen Regulation beteiligt. Eine direkte Interaktion von rekombinatem YWHAZ sowohl mit rekombinanter als auch mit endogener AKT konnte in Lysaten von embryonalen Nierenzellen dargestellt werden und eine Transfektion von aktivierter AKT in embryonalen Nierenzellen führte zu einer Phosphorylierung von YWHAZ (Powell et al. 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass YWHAZ die Aktivierung von beta-Catenin (CTNNB1) durch AKT in intestinalen Stammzellen der Maus erleichtert und es wurde vermutet, dass die Phosphorylierung von CTNNB1 durch AKT zu einer Bindung von YWHAZ und zu einer Stabilisierung von CTNNB1 führt (Tian et al. 2004).

Für YWHAZ konnte also sowohl eine Bindungsstelle an mTOR nachgewiesen werden, als auch eine Interaktion mit der dem mTOR-Komplex vorgeschalteten AKT beschrieben werden. Möglicherweise kommt es im Rahmen der Bindung des SRL-

FKBP12-Komplexes an mTOR zu einer Freisetzung und/oder Phosphorylierung von YWHAZ mit einer nachfolgenden Veränderung der in dieser Studie beschriebenen Proteine, was eine frühe Antwort auf das Immunsuppressivum SRL abbilden könnte.

4.4. Funktionen der identifizierten Proteine

Als nächstes folgte eine Untersuchung der Proteine innerhalb des Netzwerks von interagierenden Proteinen (Abbildung 11) und der involvierten biologischen Prozesse (Tabellen 5 und 6), um die zellulären Effekte, die zu einer signifikanten Inhibition der CCRF-CEM Zellproliferation führen (Abbildung 2), näher zu beleuchten.

ENPL (*Heat Shock Protein 90 kDa Beta Member 1* (HSP90B1), *94 kDa glucose-regulated Protein* (GRP94)) ist ein durch Zellstress-aktivierbares im endoplasmatischen Retikulum/sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Glykoprotein und molekulares Chaperon, das für verschiedene biologische Prozesse erforderlich ist, insbesondere für den Export von an der nativen Immunantwort beteiligten Molekülen an die Zelloberfläche. Eine Phosphorylierung durch die Casein-Kinase-2 konnte *in vitro* für alle glykosylierten Formen dieses Proteins gezeigt werden, wobei in Sf21-Insektenzellen nur die am wenigsten mobile Form dieses Chaperons durch die Casein-Kinase-2 phosphoryliert worden war (Cala 2000). Eine frühere Studie vermutete, dass eine Autophosphorylierung der Serin- und Threoninreste des ENPL die Formation des Komplexes und folglich die Funktion als Chaperon regulieren könnte (Csermely et al. 1995). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass ENPL zu einem frühen Zeitpunkt nach Induktion der Zelldifferenzierung (Spitze bei 6 h) an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird (Frasson et al. 2009). Dieses Ereignis ist für den Export des Chaperons vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat in der frühen Phase der Myoblasten-Differenzierung notwendig. Insbesondere wurde vermutet, dass die durch AKT vermittelte Phosphorylierung von

Stress-induzierten Chaperonen (z.B. von ENPL) einen Mechanismus für die Regulation der Funktion der Chaperone während der mesangialen Zellantwort auf physiologische und pathologische Stimuli darstellt (Barati et al. 2006). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Effekte von SRL auf CCRF-CEM-Zellen ermöglichte eine Bestimmung der relativen Phosphorylierung von ENPL. Auf diesen Ergebnissen basierend, zeigte ENPL einen signifikant verminderten Phosphorylierungsstatus nach einer 30-minütigen Inkubation mit SRL (Abbildung 12, Tabelle 7, Anhang 6.1.). Interessanterweise war ENPL unter den translational unterdrückten mRNAs nach einer 4-stündigen Inkubation von humanen Jurkat T-Zellen mit SRL beobachtet worden (Grolleau et al. 2002). Es könnte spekuliert werden, dass eine verminderte Phosphorylierung von ENPL eine frühe Antwort auf das Immunsuppressivum SRL darstellt, gefolgt von einer veränderten Expression von ENPL.

TCPQ gehört zu den Chaperonen und ist in der vorliegenden Studie unter SRL vermehrt phosphoryliert. TCPQ bindet neben Aktin und Tubulin auch andere zytosolische Proteine und ist an deren Proteinfaltung unter ATP-Verbrauch beteiligt. Ein Zusammenhang mit YWHAZ konnte bereits dargestellt werden (Meek et al. 2004). Es könnte spekuliert werden, dass eine vermehrte Phosphorylierung von TCPQ durch YWHAZ erfolgt. Die Mehrzahl der identifizierten Proteine mit signifikant veränderten Proteinspots in der Phosphoproteinfärbung zeigte hingegen eine geringere Phosphorylierung und ist beteiligt an der Mitose, der zellulären und intrazellulären Bewegung, der Polymerisierung von Proteinen (TBA1B), der Immunantwort, der Stabilisierung der zytoplasmatischen Architektur und der Förderung von spezifischen dynamischen Zellprozessen (VIME), der Beeinflussung des pre-mRNA Processings, der mRNA-Stabilität, dem mRNA-Metabolismus und

Transport (HNRPD), der Signaltransduktion, der Proteinfaltung, der Degradation von Proteinen und der Stabilisierung und Faltung von denaturierten Proteinen nach Zellstress (ENPL).

Die Konzentration von LMNB1 stellte sich unter einer SRL-Behandlung vermindert dar. Während der Mitose ist die Matrix der Zellkernmembran reversibel voneinander getrennt, während die Lamin-Proteine phosphoryliert sind. Die Lamin Proteine sind vermutlich an der Stabilität des Zellkerns, der Chromatin-Struktur und der Genexpression beteiligt.

Die Proteinkonzentration unter einer SRL-Behandlung war für Proteine erhöht, die eine Rolle spielen bei der katabolen mitochondrialen beta-Oxidation langkettiger Fettsäuren mit 3-ketoacyl-CoA-Thiolase-Aktivität (ECHB), beim Zerschneiden von Peptiden in einem ATP/Ubiquitin-abhängigen Prozess innerhalb eines nicht-lysosomalen Stoffwechselwegs (PSB3) und in der anaeroben Glykolyse/dem Kohlenhydratstoffwechsel (LDHB).

4.5. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Studie, konnten erstmals in CCRF-CEM-Zellen sowohl die frühen Effekte von SRL auf den Status der Phosphorylierung und auf die Expression von Proteinen, als auch eine Beziehung zwischen 9 von insgesamt 16 signifikant veränderten Proteinen durch das Bindungsprotein YWHAZ gezeigt werden, dessen Regulation offensichtlich durch SRL beeinflusst werden konnte. Da die 14-3-3-Proteine (z.B. YWHAZ) und die Chaperone (z.B. ENPL) mit AKT interagieren, vermuten wir, dass durch die Inhibition der mTOR-Achse die AKT vermittelte Phosphorylierung des Endoplasmiums herabgesetzt wurde. Insgesamt korrelieren die hier aufgelisteten Prozesse hauptsächlich mit der Signaltransduktion, dem Zellmetabolismus und der Mitose.

Das Wissen über die exakten molekularbiologischen Vorgänge der mTOR-Regulation könnte bei der Entwicklung neuer und nebenwirkungsarmer Medikamente hilfreich sein. Die Rolle, die die 14-3-3-Proteine bei der Regulation des mTOR-Komplexes spielen, bleibt zunächst unklar. Weitere Studien sind erforderlich, um deren Funktion in Bezug auf die Aktivität des mTOR-Komplexes zu klären. Insbesondere sollten weitere Studien aufzeigen, ob bereits durch die Anlagerung des FKBP12-SRL-Komplexes an mTOR eine Freisetzung von YWHAZ erreicht wird und falls ja, ob das freigesetzte YWHAZ selbst eine regulatorische Aktivität besitzt und ggf. welche Signalwege hierdurch berührt werden. Die Klärung dieser Fragen könnte möglicherweise dabei helfen, eine Inhibition der für eine suffiziente Immunsuppression erforderlichen Signalwege zielgerichteter zu erreichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. englisch

Objectives: The present study was designed to investigate early proteome and phosphoproteome changes during inhibition of lymphocyte proliferation induced by sirolimus (SRL). **Material and Methods:** Proliferation assays were conducted using human CCRF-CEM T-lymphoblasts under different SRL concentrations. Total protein lysates after SRL treatment were used to distinguish significantly regulated proteins and phosphorylated proteins in 2DE gels using a Q-TOF Ultima Global mass spectrometer. **Results and Discussion:** Incubation with 2.5 $\mu\text{mol/l}$ SRL resulted in an approx. 70% inhibition of cell proliferation. Cells incubated with 2.5 $\mu\text{mol/l}$ for 30 min showed a differential phosphorylation pattern with one higher (TCPQ) and six lower-phosphorylation signals (TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, SEPT9, PLSL). On investigating the differential protein expression five proteins were found to be up- (ECHB, PSB3, MTDC, LDHB, NDKA) and four were down-regulated (EHD1, AATC, LMNB1, MDHC). Nine of these differentially regulated proteins/phosphoproteins (TCPQ, TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, ECHB, PSB3, LDHB, and LMNB1) showed significant interaction potential through the binding protein YWHAZ using MINT software. **Conclusions:** In the present study the simultaneous early influence of SRL on the phosphorylation status and on the protein expression in the total proteome of CCRF-CEM-cells was reported for the first time. Nine proteins out of sixteen identified and significantly regulated proteins predicted interaction through the binding protein YWHAZ belonging to the 14-3-3 protein family.

5.2. deutsch

Ziele: Die vorliegende Studie wurde unternommen, um die frühen Veränderungen des Proteoms und Phosphoproteoms während einer durch Sirolimus (SRL) induzierten Inhibition der Lymphozytenproliferation zu untersuchen. **Materialien und Methoden:** Die Proliferationstests wurden mit humanen CCRF-CEM T-Lymphoblasten unter verschiedenen SRL-Konzentrationen durchgeführt. Das Gesamtprotein der Zelllysate nach einer SRL-Behandlung wurde verwendet, um signifikant veränderte Proteine und phosphorylierte Proteine in 2DE-Gelen unterscheiden und mittels einem Q-TOF Ultima Global Massenspektrometer identifizieren zu können. **Ergebnisse und Diskussion:** Die Inkubation mit 2,5 µmol/l SRL führte zu einer annähernd 70%igen Inhibition der Zellproliferation. Die für 30 Minuten mit 2,5 µmol/l SRL inkubierten Zellen zeigten ein differentielles Phosphorylierungsmuster mit einem vermehrt (TCPQ) und sechs vermindert phosphorylierten Proteinen (TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, SEPT9, PLSL). Die Untersuchung der differentiellen Proteinexpression zeigte fünf vermehrt (ECHB, PSB3, MTDC, LDHB, NDKA) und vier vermindert (EHD1, AATC, LMNB1, MDHC) exprimierte Proteine. Neun dieser unterschiedlich regulierten Proteine/Phosphoproteine (TCPQ, TBA1B, VIME, HNRPD, ENPL, ECHB, PSB3, LDHB, LMNB1) stellten sich über das Bindeprotein YWHAZ als potentielle Interaktionspartner bei der Auswertung mittels der Software MINT dar. **Schlussfolgerungen:** In dieser Arbeit wird erstmals der simultane Einfluss von SRL auf den Phosphorylierungsstatus und die Proteinexpression im Gesamtproteom von CCRF-CEM-Zellen beschrieben. Von den sechzehn identifizierten signifikant veränderten Proteinen konnte zwischen neun dieser Proteine und dem mTOR-Komplex eine Beziehung über das Bindungsprotein YWHAZ aus der Gruppe der 14-3-3-Proteine gezeigt werden.

6. ANHANG

6.1. Tabelle 7: Ratio der Intensitäten nach einer Phosphoproteinfärbung

Protein-spot-Nr.	Mittelwert SRL/C	SRLI/CI	SRLII/CII	SRLIII/CIII	SRLIV/CIV
<i>Gesteigerte Proteinspot-Intensität unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen</i>					
1*	1,83	1,73	1,54	2,29	1,77
<i>Verminderte Proteinspot-Intensität unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen</i>					
2*	0,67	0,68	0,47	0,70	0,85
3*	0,62	0,77	0,42	0,63	0,66
4*	0,56	0,69	0,50	0,48	0,57
5*	0,18	0,13	0,20	0,17	0,21
6*	0,43	0,32	0,46	0,36	0,58
7*	0,28	0,11	0,15	0,18	0,68
8*	0,62	0,45	0,69	0,58	0,75
SRL – Sirolimus,					
C – Kontrolle,					
* – P < 0.05 Asymptotische Signifikanz im Friedman-Test für verbundene Stichproben					

Tabelle 7: Ratio der Intensitäten von signifikant veränderten Proteinspots von mit Sirolimus behandelten versus unbehandelten CCRF-CEM-Zellen in den 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Phosphoproteinfärbung von vier Experimenten (I-IV).

6.2. Tabelle 8: Ratio der Intensitäten nach einer Silberfärbung

Protein-spot-Nr.	Mittelwert SRL/C	SRLI/CI	SRLII/CII	SRLIII/CIII	SRLIV/CIV
<i>Gesteigerte Proteinspot-Intensität unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen</i>					
9*	1,98	1,85	1,51	2,48	2,08
10*	2,42	2,16	2,12	2,42	3,00
11*	1,54	1,84	1,16	2,01	1,16
12*	7,22	3,14	16,29	5,08	4,36
13*	1,59	1,37	1,48	1,66	1,86
<i>Verminderte Proteinspot-Intensität unter einer Sirolimus-Behandlung von CCRF-CEM-Zellen</i>					
14*	0,44	0,51	0,25	0,38	0,62
15*	0,75	0,68	0,48	0,89	0,94
16*	0,52	0,54	0,53	0,40	0,60
17*	0,13	0,09	0,12	0,14	0,16
18*	0,43	0,20	0,54	0,28	0,71
19*	0,60	0,91	0,44	0,54	0,50
SRL – Sirolimus, C – Kontrolle, * – P < 0.05 Asymptotische Signifikanz im Friedman-Test für verbundene Stichproben					

Tabelle 8: Ratio der Intensitäten von signifikant veränderten Proteinspots von mit Sirolimus behandelten versus unbehandelten CCRF-CEM-Zellen in den 2DE-Polyacrylamidgelen nach einer Silberfärbung von vier Experimenten (I-IV).

6.3. Tabelle 9: Anzahl und Übereinstimmung von Peptiden

Proteinspot-Nr.	Protein Name	Score	Anzahl der identifizierten Peptide	Sequenzen der identifizierten Peptide
1	TCPQ	182	12/13	K.LFVTNDAATILR.E R.DIDEVSSLLR.T K.QYGNEVFLAK.L K.AIADTGANVVVTGGK.V K.TVGATALPR.L K.EDGAISTIVLR.G R.GSTDNLMDDIER.A Oxidation (M) R.GSTDNLMDDIER.A Oxidation (M) R.AVDDGVNTFK.V R.LVPGGGATEIELAK.Q K.FAEAFEAIPIR.A R.ALAENSGVK.A K.LATNAAVTVLR.V
2	TBA1B	342	17/22	K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H R.AVFVDLEPTVIDEVR.T R.QLFHPEQLITGK.E K.EIIDLVLDLDR.I R.NLDIERPTYTNLNR.L R.NLDIERPTYTNLNR.L R.LISQIVSSITASLR.F R.IHFPLATYAPVISAEEK.A R.IHFPLATYAPVISAEEK.A K.YMACCLLYR.G 2 x Carbamidomethyl (C) K.YMACCLLYR.G 2 x Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)

				K.DVNAAIATIK.T
				K.DVNAAIATIK.T
				R.SIQFVDWCPTGFK.V
				Carbamidomethyl (C)
				R.SIQFVDWCPTGFK.V
				Carbamidomethyl (C)
				K.VGINYQPPTVVPGGDLAK.V
				K.VGINYQPPTVVPGGDLAK.V
				R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L
				Carbamidomethyl (C)
				R.LDHKFDLMYAK.R
				R.LDHKFDLMYAK.R Oxidation (M)
				R.AFVHWYVGEEMEEGFSEAR.E
				Oxidation (M)
				R.EDMAALEK.D
VIME	201	16		R.TYSLGSALRPSTSR.S
				R.SLYASSPGGVYATR.S
				R.TNEKVELQELNDR.F
				K.ILLAELEQLK.G
				K.ILLAELEQLKGQK.S
				R.LGDLYEEEMR.E
				R.LGDLYEEEMR.E Oxidation (M)
				R.QVDQLTNDK.A
				R.VEVERDNLAEDIMR.L
				R.VEVERDNLAEDIMR.L Oxidation (M)
				R.DNLAEDIMR.L
				R.EEAENTLQSFR.Q
				K.NLQEAEWYK.S
				K.FADLSEAANR.N
				R.EYQDLLNVK.M
				R.ISLPLPNFSSLNLR.E

3	HNRPD	118	4	K.DLKDYFSK.F K.FGEVVDCTLK.L Carbamidomethyl (C) R.GFGFVLFK.E K.IFVGGLSPDTPEEK.I
4	ENPL	325	22/23	K.FAFQAEVNR.M K.LIINSLYK.N R.ELISNASDALDK.I R.ELISNASDALDKIR.L K.SGTSEFLNK.M K.TETVEEPMEEEEAAKEEK.E Oxidation (M) K.EVEEDEYK.A K.EVEEDEYKAFYK.S K.SILFVPTSAPR.G R.GLFDEYGSK.K R.VFITDDFHDMMPK.Y 2 x Oxidation (M) K.GVVDSDDLPLNVS.R.E K.IADDKYNDTFWK.E K.EFGTNIK.L K.LGVIEDHSNR.T K.IYFMAGSSR.K Oxidation (M) R.KEAESSPFVER.L K.EAESSPFVER.L K.DISTNYYASQK.K K.DISTNYYASQK.K K.TFEINPR.H R.SGYLLPDTK.A R.LSLNIDPDAK.V

5	SEPT9	59	8	K.STLINTLFK.S K.SVQPTSEER.I K.SITHDIEEK.G K.FINDQYEK.Y K.YLQEEVNINR.K K.VVNIVPVIK.A K.ADTLTLEER.V R.ITADLLSNGIDVYPQK.E
6	PLSL	53	2	K.ALENDPDCR.H Carbamidomethyl (C) R.QFVTATDVVR.G
7	PLSL	279	13/18	K.AACLPLPGYR.V Carbamidomethyl (C) K.MINLSVPDTIDER.T Oxidation (M) K.MINLSVPDTIDER.T Oxidation (M) R.NEALIALLR.E K.IGNFSTDIK.D K.AYYHLLEQVAPK.G K.AYYHLLEQVAPK.G K.GDEEGVPAVVIDMSGRLR.E Oxidation (M) K.GDEEGVPAVVIDMSGRLR.E Oxidation (M) R.QFVTATDVVR.G R.NWMNSLGVNPR.V Oxidation (M) R.NWMNSLGVNPR.V Oxidation (M) K.FSLVGIGGQDLNEGNR.T R.YTLNILEEIGGGQK.V K.VNDDIIVNWVNETLR.E R.VYALPEDLVEVNP.K.M R.VYALPEDLVEVNP.K.M

				K.MVMTVFACLMGK.G Carbamidomethyl (C); 3 x Oxidation (M)
8	HNRPD	67	3	K.FGEVVDCTLK.L Carbamidomethyl (C) R.GFGFVLFK.E K.IFVGGLSPDTPEEK.I
9	ECHB	36	2	R.NVVVVDGVR.T R.LAAAFVSR.L
10	PSB3	39	3	K.NCVAIAADR.R Carbamidomethyl (C) R.FGIQAQMVTTFDQK.I Oxidation (M) R.FGPYYTEPVIAGLDPK.T
11	MTDC	56	2	K.EGAAVIDVGINR.V K.LVGDVDFEGVR.Q
12	LDHB	123	7	K.LIAPVAEEEEATVPNNK.I K.IVADKDYSVTANSK.I K.IVVVTAGVR.Q K.FIIPQIVK.Y K.MVVESAYEVIK.L Oxidation (M) R.GLTSVINQK.L K.SADTLWDIQK.D
13	NDKA	91	5/6	R.TFIAIKPDGVQR.G R.TFIAIKPDGVQR.G R.GLVGEIHK.R K.FMQASEDLLK.E Oxidation (M) R.VMLGETNPADSKPGTIR.G Oxidation (M) R.NIIHGSDSVESA EK.E
14	EHD1	103	6	K.EPELFQTVAEGLR.Q K.LLPLEEHYR.F

				K.ADQIETQQLMR.V Oxidation (M) K.LFEAEEQDLFK.D K.ELVNNLGEIYQK.I K.LLDTVDDMLANDIAR.L Oxidation (M)
15	AATC	89	8	R.LALGDDSPALK.E R.VGGVQSLGGTGALR.I R.IGADFLAR.W K.NFGLYNER.V R.ITWSNPPAQGAR.I K.QVEYLVNEK.H K.HIYLLPSGR.I R.INVSGLTTK.N
16	LMNB1	311	22/23	R.AGGPTTPLSPTR.L R.LAVYIDKVR.S R.SLETENSALQLQVTEREEVR.G K.ALYETELADAR.R K.ALYETELADARR.A K.LQIELGK.C K.LREYEAALNSK.D R.EYEAALNSK.D K.DAALATALGDKK.S K.DAALATALGDKK.S K.QLADETLLKVDLENR.C R.CQSLTEDLEFRK.S Carbamidomethyl (C) K.SMYEEEINETR.R.K Oxidation (M) R.LVEVDSSGR.Q R.QIEYKYK.L R.LSSEMNTSTVNSAR.E Oxidation (M) R.LSSEMNTSTVNSAREELMESR.M 2 x

				Oxidation (M) K.LALDMEISAYR.K Oxidation (M) K.LALDMEISAYRK.L Oxidation (M) K.LLEGEER.L R.KIGDTSVSYK.Y K.VILKNSQGEEVAQR.S K.NSQGEEVAQR.S
17	MDHC	55	3	K.GEFVTTVQQR.G K.FVEGLPINDFSR.E K.ELTEEKESAFEFLSSA.-
18	LMNB1	132	13	R.AGGPTTPLSPTR.L K.ALYETELADAR.R K.ALYETELADARR.A K.LREYEAALNSK.D K.DAALATALGDKK.S K.SMYEEEINETR.R Oxidation (M) K.SMYEEEINETR.R.K Oxidation (M) R.LVEVDSGR.Q R.QIEYEYK.L K.LALDMEISAYR.K Oxidation (M) K.LALDMEISAYRK.L Oxidation (M) K.LLEGEER.L K.NSQGEEVAQR.S
19	LMNB1	272	24/25	R.AGGPTTPLSPTR.L R.SLETENSALQLQVTER.E R.SLETENSALQLQVTEREEVR.G K.ALYETELADAR.R K.ALYETELADARR.A K.LQIELGK.C

K.LREYEAALNSK.D
R.EYEAALNSK.D
K.DAALATALGDKK.S
K.QLADETLLK.V
R.CQSLTEDLEFRK.S Carbamidomethyl (C)
K.SMYEEEINETR.R Oxidation (M)
R.LVEVDSGR.Q
R.LSSEMNTSTVNSAREELMESR.M 2 x Oxidation (M)
R.EELMESR.M Oxidation (M)
R.IESLSSQLSNLQK.E
R.IQELEDLLAK.E
K.LALDMEISAYR.K Oxidation (M)
K.LALDMEISAYRK.L Oxidation (M)
K.LALDMEISAYRK.L Oxidation (M)
K.LLEGEER.L
K.LLEGEERLK.L
K.LSPSPSSR.V
K.VILKNSQGEEVAQR.S
K.NSQGEEVAQR.S

Tabelle 9: Anzahl und Übereinstimmung von Peptiden der mittels nano-LC MS/MS identifizierten Proteine aus dem Proteom von CCRF-CEM-Zellen nach einer SRL-Behandlung.

6.4. Publikationsliste

Veröffentlichungen:

Schultze FC, Petrova DT, Oellerich M, Armstrong VW, Asif AR (2010): Differential proteome and phosphoproteome signatures in human T-lymphoblast cells induced by sirolimus. *Cell Prolif* 43, 396-404

Petrova DT, Brehmer F, **Schultze FC**, Asif AR, Gross O, Oellerich M, Brandhorst G: Differential kidney proteome profiling in a model for renal fibrosis under treatment with mycophenolate mofetil. *Pathobiology Ms. No.:* 201011002 (in press)

Poster:

Petrova DT, Brehmer F, **Schultze FC**, Asif AR, Gross O, Oellerich M, Brandhorst G (2010): Differential kidney proteome profiling in a model for renal fibrosis under treatment with mycophenolate mofetil: implications for epithelial-mesenchymal transition. DGKL 2010, Mannheim (Posterpreis). *Clin Chem Lab Med* 49, A129

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abizaid A (2007): Sirolimus-eluting coronary stents: a review. *Vasc Health Risk Manage* 3, 191-201
- Arellano FM, Wentworth CE, Arana A, Fernandez C, Paul CF (2007): Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 127, 808-816
- Armstrong VW, Oellerich M (2001): New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 34, 9-16
- Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Hecker M, Cattaruzza M (2009): T-786C Polymorphism of the NOS-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress-a proteome analysis. *J Proteome Res* 8, 3161-3168
- Bailey DG, Dresser GK (2004): Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *Am J Cardiovasc Drugs* 4, 281-297
- Bandhakavi S, Xie H, O'Callaghan B, Sakurai H, Kim DH, Griffin TJ (2008): Hsf1 activation inhibits rapamycin resistance and TOR signaling in yeast revealed by combined proteomic and genetic analysis. *PLoS ONE* 3, e1598
- Barati MT, Rane MJ, Klein JB, McLeish KR (2006): A proteomic screen identified stress-induced chaperone proteins as targets of Akt phosphorylation in mesangial cells. *J Proteome Res* 5, 1636-1646
- Benet LZ, Cummins CL, Wu CY (2004): Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int J Pharm* 277, 3-9

- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V.: Rote Liste 2004: Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte). ISBN: 3-87193-286-8; Editio Cantor Verlag, Aulendorf 2004
- Cala SE (2000): GRP94 hyperglycosylation and phosphorylation in Sf21 cells. *Biochim Biophys Acta* 1496, 296-310
- Chatr-aryamontri A, Ceol A, Palazzi LM, Nardelli G, Schneider MV, Castagnoli L, Cesareni G (2007): MINT: the Molecular INTeraction database. *Nucleic Acids Res* 35, D572-574
- Chinen J, Buckley RH (2010): Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol* 125, 324-335
- Choudhary J, Grant SGN (2004): Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nat Neurosci* 7, 440-445
- Christians U, Schmitz V, Schöning W, Bendrick-Peart J, Klawitter J, Haschke M, Klawitter J (2008): Toxicodynamic therapeutic drug monitoring of immunosuppressants: promises, reality, and challenges. *Ther Drug Monit* 30, 151-158

- Clark DP: Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. 1. Auflage; Elsevier GmbH, München 2006
- Csermely P, Miyata Y, Schnaider T, Yahara I (1995): Autophosphorylation of grp94 (endoplasmic reticulum chaperone). *J Biol Chem* 270, 6381-6388
- Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Gutmann DH (2005): Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res* 65, 2755-2760
- Dihazi H, Müller GA (2007): Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases. *Expert Rev Proteomics* 4, 39-50
- Dowling RJ, Pollak M, Sonenberg N (2009): Current status and challenges associated with targeting mTOR for cancer therapy. *BioDrugs* 23, 77-91
- Frasson M, Vitadello M, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pinna LA, Gorza L, Donella-Deana A (2009): Grp94 is Tyr-phosphorylated by Fyn in the lumen of the endoplasmic reticulum and translocates to Golgi in differentiating myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1793, 239-252
- Furukawa H, Todo S (2004): Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc* 36, 274S-284S
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053
- Grinyó JM, Cruzado JM (2006): Mycophenolate mofetil and sirolimus combination in renal transplantation. *Am J Transplant* 6, 1991-1999

- Grolleau A, Bowman J, Pradet-Balade B, Puravs E, Hanash S, Garcia-Sanz JA, Beretta L (2002): Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 277, 22175-22184
- Hay N, Sonenberg N (2004): Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945
- Huang J, Zhu H, Haggarty SJ, Spring DR, Hwang H, Jin F, Snyder M, Schreiber SL (2004): Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 101, 16594-16599
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I (2007): Global ARCC Trial: Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 2271-2281
- Jacinto E, Hall MN (2003): Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 117-126
- James DG (1996): A new immunosuppressant: tacrolimus. *Postgrad Med J* 72, 586
- Koolman J, Röhm KH: Taschenatlas der Biochemie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1998, 278
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Honore B, Andersen AH, Walbum E, Vandekerckhove J, Celis JE (1993): Molecular cloning and expression of the

transformation sensitive epithelial marker stratifin: a member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signalling pathway. *J Mol Biol* 231, 982-998

Liu MY, Cai S, Espejo A, Bedford MT, Walker CL (2002): 14-3-3 interacts with the tumor suppressor tuberin at Akt phosphorylation site(s). *Cancer Res* 62, 6475-6480

Lloyd M (2002): Philip Showalter Hench, 1896-1965. *Rheumatology (Oxford)* 41, 582-584

Loftus CG, Egan LJ, Sandborn WJ (2004): Cyclosporine, tacrolimus, and mycophenolate mofetil in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 33, 141-169

Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1998

Luhn S, Berth M, Hecker M, Bernhardt J (2003): Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics* 3, 1117-1127

Meek SE, Lane WS, Piwnica-Worms H (2004): Comprehensive Proteomic Analysis of Interphase and Mitotic 14-3-3-binding Proteins. *J Biol Chem* 279, 32046-32054

Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S (2005): A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 54, 1-9

Morath C, Arns W, Schwenger V, Mehrabi A, Fonouni H, Schmidt J, Zeier M (2007): Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 22, viii61-viii65

- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen / Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2008
- Nowack R (2008): Review article: cytochrome P450 enzyme, and transport protein mediated herb-drug interactions in renal transplant patients: grapefruit juice, St John's Wort - and beyond! *Nephrology (Carlton, Vic)* 13, 337-347
- Oellerich M, Armstrong VW, Streit F, Weber L, Tönshoff B (2004): Immunosuppressive drug monitoring of sirolimus and cyclosporine in pediatric patients. *Clin Biochem* 37, 424-428
- Ogihara T, Isobe T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, Onishi Y, Inukai K, Anai M, Fukushima Y et al. (1997): 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* 272, 25267-25274
- Paghdal KV, Schwartz RA (2007): Sirolimus (rapamycin): from the soil of Easter Island to a bright future. *J Am Acad Dermatol* 57, 1046-1050
- Paine MF, Leung LY, Watkins PB (2004): New insights into drug absorption: studies with sirolimus. *Ther Drug Monit* 26, 463-467
- Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ (2004): Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* 100, 657-666
- Ponticelli C (2004): The pleiotropic effects of mTor inhibitors. *J Nephrol* 17, 762-768
- Powell DW, Rane MJ, Chen Q, Singh S, McLeish KR (2002): Identification of 14-3-3-zeta as a protein kinase B/Akt substrate. *J Biol Chem* 277, 21639-21642

- Rao RD, Buckner JC, Sarkaria JN (2004): Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 621-635
- Rensing BJ, Vos J, Smits PC, Foley DP, van den Brand MJB, van der Giessen WJ, de Feijter PJ, Serruys PW (2001): Coronary restenosis elimination with a sirolimus eluting stent: first European human experience with 6-month angiographic and intravascular ultrasonic follow-up. *Eur Heart J* 22, 2125-2130
- Robinson JM, Ackerman WE, Kniss DA, Takizawa T, Vandr  DD (2008): Proteomics of the human placenta: promises and realities. *Placenta* 29, 135-143
- Sehgal SN (2003): Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 35, 7S-14S
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858
- Teachey DT, Grupp SA, Brown VI (2009): Mammalian target of rapamycin inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies. *Br J Haematol* 145, 569-580
- Thongboonkerd V (2008): Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol BioSyst* 4, 810-815
- Tian Q, Feetham MC, Tao WA, He XC, Li L, Aebersold R, Hood L (2004): Proteomic analysis identifies that 14-3-3-zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 101, 15370-15375
- Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975): Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing Streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28, 721-726

Walz G, Budde K, Mannaa M, Nürnberger J, Wanner C, Sommerer C, Kunzendorf U, Banas B, Hörl WH, Obermüller N (2010): Everolimus in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 363, 830-840

Westhoff TH, van der Giet M (2007): Tacrolimus in the treatment of idiopathic nephrotic syndrome. *Expert Opin Invest Drugs* 16, 1099-1110

Zhao XF, Gartenhaus RB (2009): Phospho-p70S6K and cdc2/cdk1 as therapeutic targets for diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Opin Ther Targets* 13, 1085-1093

PUBLIKATION

Schultze FC, Petrova DT, Oellerich M, Armstrong VW, Asif AR (2010):

Differential proteome and phosphoproteome signatures in human T-lymphoblast cells induced by sirolimus.

Cell Prolif 43, 396-404

Die Publikation befindet sich innerhalb der Dissertation auf den Seiten 84-92.

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich hiermit bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Victor William Armstrong, der bedauerlicherweise am 27. Februar 2010 verstorben ist. Danken möchte ich ihm für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation und die hervorragende Unterstützung in allen Belangen, insbesondere aber für die wertvolle Zeit, die er mir gegeben hat. Er war mir menschlich und fachlich ein großes Vorbild.

Auch möchte ich mich herzlich bedanken bei Herrn Professor Dr. med. Nicolas von Ahsen, der sich bereit erklärt hatte, die Nachfolge von Herrn Professor Dr. rer. nat. Victor William Armstrong anzutreten und ohne den ich diese Arbeit nicht hätte vollenden können.

Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Abdul Rahman Asif möchte ich an dieser Stelle ebenso danken wie auch Herrn PD Dr. rer. nat. Hassan Dihazi für die Möglichkeit zur Nutzung des Fluoreszenz-Scanners.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Christina Wiese, Frau Christa Scholz und Frau Dr. rer. nat. Darinka Todorova Petrova, die mir während dieser Zeit stets kompetent und tatkräftig auf vielfältige Art und Weise beiseite standen.