

Aus der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Regulation der „*spleen tyrosine kinase*“ Syk im
B-Zell-Antigen-Rezeptor-Signalweg**

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

vorgelegt von

Hanibal Bohnenberger
aus
Hardegsen

Göttingen 2013

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

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Pieler

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem des Menschen	1
1.2 Die B-Zelle im Immunsystem	1
1.3 Der BZR-Signalweg	4
1.4 Die „ <i>spleen tyrosine kinase</i> “ Syk.....	7
1.5 Massenspektrometrische Analysen von Signalwegen	10
1.6 Ziel der Studie.....	13
2. Material.....	15
2.1 Geräte.....	15
2.2 Computersoftware und Internetadressen.....	16
2.3 Materialien	17
2.4 Chemikalien und Reagenzien	17
2.5 Puffer und Medien.....	19
2.6 Enzyme	22
2.7 Kits.....	22
2.8 Vektoren.....	22
2.9 cDNAs.....	23
2.10 Oligonukleotide (Primer)	23
2.11 Verwendete Konstrukte.....	25
2.12 Antikörper.....	26
2.13 Zelllinien.....	27
3. Methoden.....	29
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.1.2 Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion	29
3.1.3 <i>Overlab extension</i> PCR	30
3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.1.5 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen.....	31
3.1.6 Klonierung von PCR-Produkten in den pCRII-TOPO-Vektor.....	31
3.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien	32
3.1.8 Transformation von kompetenten Bakterien.....	32
3.1.9 Kulturbedingungen der Bakterien	32
3.1.10 Präparation von Plasmiden	33
3.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure.....	33
3.1.12 Sequenzierung von DNA	33
3.1.13 Restriktionsverdau.....	33
3.1.14 Ligation.....	33
3.1.15 Linearisierung und Ethanol-fällung von Vektoren	34
3.2 Zellbiologische Methoden	34
3.2.1 Kulturbedingungen	34
3.2.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen	34
3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	35
3.2.4 Transfektion durch Elektroporation.....	35
3.2.5 Retrovirale Transfektion	36
3.2.6 Analyse der Citrin-Expression	36

3.2.7 Analyse der Oberflächenexpression von IgM	37
3.2.8 Analyse des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms	37
3.2.9 Stimulation von Zellen	38
3.2.10 Zelllyse	38
3.2.11 Konfokale Laser-Mikroskopie von lebenden Zellen	39
3.3 Proteinbiochemische Methoden	39
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.3.2 Coomassie-Färbung	40
3.3.3 Westernblot-Analyse	40
3.3.4 Expression und Isolation von GST-Proteinen	41
3.3.5 Far-Westernblot	42
3.3.6 Immunopräzipitation	42
3.3.7 Affinitätspräzipitation mittels Streptaktin-Matrix	42
3.3.8 Bradford-Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen	43
3.3.9 <i>In-vitro</i> -Kinase-Experiment	43
3.4 Massenspektrometrische Methoden	44
3.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und <i>In-Gel</i> -Verdau von Proteinen	44
3.4.2 Anreicherung von phosphorylierten Peptiden	45
3.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	45
3.4.4 Massenspektrometrische Analyse	45
3.4.5 Auswertung der Daten mit MaxQuant und MsQuant	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Expression von Strep-Syk in DT40- und DG-75-B-Lymphozyten	47
4.2 Das Phosphorylierungsprofil von Syk in aktivierten B-Zellen	49
4.3 Die BZR-induzierte Phosphorylierungskinetik von Syk	51
4.4 Das Interaktom von Syk in ruhenden und aktivierten B-Zellen	55
4.5 14-3-3 γ bindet an phosphoryliertes Serin 297 in humanem Syk	59
4.6 14-3-3 γ bindet direkt an phosphoryliertes Serin 297	62
4.7 Das Interaktom von Syk S297A	64
4.8 14-3-3 inhibiert die Bildung des Kalzium-Initiations-Komplexes	65
4.9 14-3-3 inhibiert die Phosphorylierung und Rekrutierung von Syk	68
4.10 Cbl und 14-3-3 inhibieren Syk unabhängig voneinander	72
4.11 Serinphosphorylierung beeinflusst die SH2-Domänen von Syk	73
4.12 Prolinreiche Motive koppeln SLP65 über Cin85 an Syk	75
5. Diskussion	78
5.1 Die Phosphorylierungskinetik und das Interaktom von Syk	78
5.2 Die Inhibition von Syk durch 14-3-3	81
5.3 Serinabhängige Beeinflussung der SH2-Domänen von Syk	85
5.4 Cin85 koppelt SLP65 an Syk	86
6. Zusammenfassung	88
7. Literaturverzeichnis	89

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden Publiziert in:

Bohnenberger H, Oellerich T, Engelke M, Hsiao HH, Urlaub H, Wienands J

Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells, Frontline Article, European Journal of Immunology, 2011

Oellerich T, Bremes V, Neumann K, **Bohnenberger H**, Dittmann K, Hsiao HH, Engelke M, Schnyder T, Batista FD, Urlaub H, Wienands J

The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85, EMBO Journal, 2011

Teile dieser Arbeit wurden als Poster vorgestellt:

Oellerich T, Bremes V, Neumann K, **Bohnenberger H**, Dittmann K, Hsiao HH, Engelke M, Schnyder T, Batista FD, Urlaub H, Wienands J

SLP65 and CIN85 control antigen receptor signaling, Keystone Symposia, Breckton-ridge, USA, 2010

Oellerich T, Bremes V, Neumann K, **Bohnenberger H**, Engelke M, Dittmann K, Hsiao HH, Urlaub H, Wienands J

Composition and dynamic reorganization of the Syk/SLP65 interactomes as revealed by functional proteomics, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 2010

Weitere Publikationen zu dem Thema der Doktorarbeit:

Oellerich T, Oellerich M, Engelke M, Hsiao HH, Zhang J, **Bohnenberger H**, Berg T, Wienands J, Bug G, Brandts C, Urlaub H, Serve H

β 2-integrin-derived signals induce cell survival and proliferation of AML blasts by activating a SYK/STAT signaling axis, Blood, 2013

Lösing M, Goldbeck I, Manno B, Oellerich T, Schnyder T, **Bohnenberger H**, Stork B, Urlaub H, Batista F, Wienands J, Engelke M

The Dok-3/Grb2 signal module attenuates Lyn-dependent activation of Syk in B cell antigen receptor microclusters. Journal of Biological Chemistry, 2012

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
Akt	Protein-Kinase B
ALV	<i>avian leucosis virus</i>
Amp	Ampicillin
AP	Affinitätspräzipitation
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BASH	<i>B cell adapter containing SH2-Domain</i>
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum-Albumin
Btk	Bruton's Tyrosin-Kinase
Bw	<i>Backward</i>
BZR	B-Zell-Antigen-Rezeptor
CARMA1	<i>CARD-containing MAGUK protein 1</i>
Cbl	<i>Casitas B cell lineage lymphoma</i>
CCL	Geklärte zelluläre Lysate
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
Cin85	<i>Cbl-interacting protein of 85 kDa</i>
CS	Hühnchen-Serum
Cy-5	Cyanin-5
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbeccos minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-desoxynucleoside-5'-triphosphate
1D-PAGE	Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>Enhanced chemical luminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Erk	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
F(ab)	Antigenbindendes Fragment
FCS	Fetales Kälber-Serum
Fw	<i>Forward</i>
Gab2	<i>GRB2 associated binder 2</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfon-Säure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IAA	Indol-3-Essigsäure
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase</i>
IP	Immunopräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat

IPI	Internationaler Protein-Index
IPTG	Isopropyl-1-thio-galactopyranosid
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
IκB	<i>Nuclear factor kappa B inhibitor</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
Kan	Kanamycin
kB	Kilobase
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LB	<i>Lysogeny bRoth, Karlsruhe</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LDS	<i>Lithium dodecyl sulfate</i>
LTQ-Orbitrap	<i>Linear trap quadrupole orbitrap</i>
Lyn	<i>Lck/yes-related novel kinase</i>
m/z	Masse / Ladung
MAP-Kinase	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMLV	<i>Murine leukemia virus</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor for κ-gene in B cells</i>
OD	Optische Dichte
NP40	IGEPAL CA-630
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLK1	<i>Polo-like kinase 1</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
Puro	Puromycin
RasGRP3	<i>RAS guanyl releasing protein 3</i>
RhoH	<i>Rho-related GTP-binding protein</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
S297A	Serin 297 mutiert zu Alanin
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Sek1	<i>SAPK/ERK kinase 1</i>
SH	<i>Src-homology domain</i>
SHP	<i>SH-domain protein tyrosine phosphatase</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling of aminoacids in cellculture</i>
SLP65	<i>SH2-Domain-containing leukocyte protein of 65 kDa</i>
SLP76	<i>SH2-Domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
Std. Abw.	Standardabweichung
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFB	<i>Transformation buffer</i>

TiO ₂	Titanium-Dioxid
TOM1L1	<i>Target of myb1-like 1</i>
TRAP1	<i>Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Antigen-Rezeptor
UV	Ultraviolett
Vav	<i>Vav oncogene</i>
VSV-G	<i>Vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Masse / Volumen
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Galactopyranosid
Zap-70	<i>70 kDa zeta chain associated protein</i>

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Kode	Ein-Buchstaben-Kode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Nucleosid	Abkürzung
Desoxyadenosin	A
Desoxycytidin	C
Desoxyguanosin	G
Desoxythymidin	T

Einheiten und Präfixe							
k	kilo	min	Minute	A	Ampere	U	Unit/Enzymeinheit
m	milli	sec	Sekunde	F	Farad	Da	Dalton
µ	micro	m	Meter	V	Volt	Å	Angström
n	nano	l	Liter	g	Erdbeschleunigung	°C	Grad Celsius
		M	molar	rpm	<i>rounds per minute</i>		

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes System, das sich aus einer Vielzahl von löslichen und zellulären Komponenten sowie verschiedenen lymphatischen Organen zusammensetzt. Zusammen sichern sie durch die Erkennung und Eliminierung von körperfremden Krankheitserregern das Überleben des Organismus. Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen, unspezifischen und einem erworbenen, spezifischen Anteil (Murphy et al. 2008).

Das unspezifische Immunsystem stellt dabei die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Krankheitserreger dar. Gelingt es einem Infektionserreger, die Barrieren von Haut oder Schleimhaut zu überwinden, wird dieser von der unspezifischen Abwehr mittels Rezeptoren für pathogen-spezifische Strukturen erkannt und über Mechanismen wie Phagozytose zum Teil auch eliminiert (Janeway und Medzhitov 2002). Außerdem ist das unspezifische Immunsystem an der Aktivierung des spezifischen Immunsystems beteiligt (Fearon und Locksley 1996).

Das spezifische Immunsystem besteht aus B- und T-Zellen. Kennzeichen der spezifischen Immunantwort ist die Expression von Rezeptoren, die gezielt gegen spezifische Antigene einzelner Pathogene gerichtet sind. B-Zellen exprimieren dafür den B-Zell-Antigen-Rezeptor (BZR). Über genetische Rekombinationsmechanismen können Antigen-Rezeptoren für ungefähr 10^{12} unterschiedliche Strukturen gebildet werden. Jede B-Zelle trägt dabei jeweils nur einen spezifischen Antigen-Rezeptor, der durch ein spezifisches Antigen-Epitop aktiviert werden kann (Davies und Cohen 1996).

1.2 Die B-Zelle im Immunsystem

B-Zellen sezernieren nach Aktivierung Antikörper, die bereits 1890 von Emil von Behring und Shibasaburo KITASATO als „Antitoxine“ beschrieben wurden (von Behring und KITASATO 1890). B-Zellen, die noch keinen Kontakt zu einem Antigen hatten, sogenannte naive B-Zellen, exprimieren eine membranständige Form des Antikörpers als Teil des BZR, der Antigene erkennt und das Signal der Antigenerkennung in das Innere der Zelle übermittelt. Dadurch kommt es über Effekte auf Ebene der Transkription und der zytoskelettalen Organisation zur Aktivierung der B-Zelle (Tsubata und Wienands 2001). Da jede B-Zelle nur einen Antigen-Rezeptor exprimiert, ist für ein umfassendes Immunsystem die Existenz eines großen B-Zell-Bestandes essentiell.

Die B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen, in deren Genom die Informationen für die Antikörper liegen. Jeweils zwei schwere und zwei leichte Ketten bilden zusammen einen Antikörper. An beiden Ketten lassen sich eine konstante Region von einer hoch variablen, antigenbindenden Region, die jeweils von einem V-, einem J- und bei der schweren Kette zusätzlich von einem D-Gensegment im Immunglobulinloкус kodiert werden, unterscheiden. Die Zusammensetzung verschiedener VDJ-Gensegmente wird als somatische Rekombination bezeichnet. Zusätzlich bildet bei der leichten und schweren Kette das C-Gensegment die konstante Region, welche bei der schweren Kette die Antikörperklasse definiert (Brack et al. 1978, Tonegawa et al. 1978).

Anhand des Status der somatischen Rekombination im Immunglobulinloкус und über die Expression von intrazellulären und membrangebundenen Proteinen lassen sich die verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung von der Pro- über die Prä- bis zur reifen B-Zelle unterscheiden. Pro-B-Zellen rekombinieren die Gensegmente der schweren Kette, die den auf Prä-B-Zellen exprimierten Prä-BZR bilden. Nur wenn dieser funktionsfähig ist, kommt es zur Rekombination der Segmente für die leichte Kette. Ist auch dies erfolgreich, wird der BZR auf der Oberfläche der nun unreifen B-Zelle auf seine Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen getestet. Dies wird als negative Selektion bezeichnet und soll die Anzahl selbst-reaktiver B-Zellen verringern. Die B-Zelle verlässt das Knochenmark als sogenannte reife, naive B-Zelle (Goodnow et al. 1995, Löffert et al. 1994).

Essentiell für die Entwicklung und das Überleben peripherer B-Zellen sind kontinuierliche Signale durch den BZR (Wang LD und Clark 2003). Da die genetische Inaktivierung des BZR in reifen B-Zellen zum Untergang der peripheren B-Zell-Population führt, wird die Existenz eines antigenunabhängigen BZR-Signals im Sinne eines tonisch schwach aktiven Signalweges vermutet (Lam et al. 1997).

Die reifen, naiven B-Zellen zirkulieren über die Blutbahn zwischen den peripheren lymphatischen Organen und können dort durch Antigene aktiviert werden. Diese werden als Komplex aus BZR und gebundenem Antigen durch Endozytose aufgenommen, das Antigen intrazellulär proteolytisch verdaut und die entstehenden Peptide auf der Oberfläche der B-Zelle mittels MHC-II-Molekülen präsentiert. Die B-Zelle benötigt danach ein zweites Signal zur vollständigen Aktivierung, das von einer T-Helferzelle über die Interaktion des T-Zell-Antigen-Rezeptors (TZR) mit dem MHC-II-

gebundenen Peptid und des CD40-Liganden mit CD40 auf der B-Zelle vermittelt wird (Goodnow et al. 2010).

Die aktivierte B-Zelle entwickelt sich danach entweder zu einem IgM sezernierenden Plasmablasten oder migriert mit T-Helferzellen in einen primären Lymphfollikel. Die Plasmablasten haben eine erste protektive Wirkung auf den Organismus und sterben nach wenigen Tagen ab. Die von T-Helferzellen begleiteten B-Zellen proliferieren im Lymphfollikel weiter und formen schließlich ein Keimzentrum. Die zu Beginn stark teilungsaktiven B-Zellen werden Zentroblasten genannt, die sich zum Teil zu weniger teilungsaktiven Zentrozyten weiterentwickeln (Goodnow et al. 2010). Die proliferierenden Zellen des Keimzentrums durchlaufen dabei den Prozess der somatischen Hypermutation. Dabei werden durch Punktmutationen einzelne Aminosäuren der schweren und leichten Kette ausgetauscht. Die meisten dieser Mutationen werden die Bindung des BZR an das Antigen schwächen und die B-Zellen werden absterben (negative Selektion). Einige Mutationen werden die Affinität zum Antigen jedoch stärken und diese Zellen werden sich weiter vermehren (positive Selektion). Dadurch nimmt im Keimzentrum die Affinität des BZR zum Antigen zu, ein Prozess der als Affinitätsreifung bezeichnet wird. Die Signalstärke durch den BZR ist dabei einer der Hauptfaktoren (Jacob et al. 1991).

Zu Beginn einer Immunantwort werden vor allem IgM-Antikörper sezerniert, in den Keimzentren kommt es jedoch zum Isotypenwechsel, so dass neben IgM auch IgG, IgA und IgE, die alle unterschiedliche biologische Eigenschaften haben, sezerniert werden können. Dabei kommt es durch erneute somatische Rekombination zur Auswahl eines neuen C-Segmentes in der für die schwere Kette kodierenden Region auf der DNA (Stavnezer et al. 2008). Am Ende der Keimzentrumsreaktion entstehen aus den B-Zellen entweder Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen (Goodnow et al. 2010). Plasmazellen sekretieren die hochaffinen Antikörper, die an spezifische Antigene eines Pathogens binden, wodurch dieses neutralisiert oder für das unspezifische Immunsystem markiert und dadurch leichter beseitigt wird oder es kommt zur antikörperabhängigen Aktivierung des Komplementsystems (Cooper 1985, Karakawa et al. 1988). B-Gedächtniszellen haben die Fähigkeit, bei Reinfektion mit einem Erreger sehr schnell mit der Bildung von hochaffinen Antikörpern zu reagieren, so dass der Organismus vor bereits bekannten Erregern geschützt ist (McHeyzer-Williams et al. 2011).

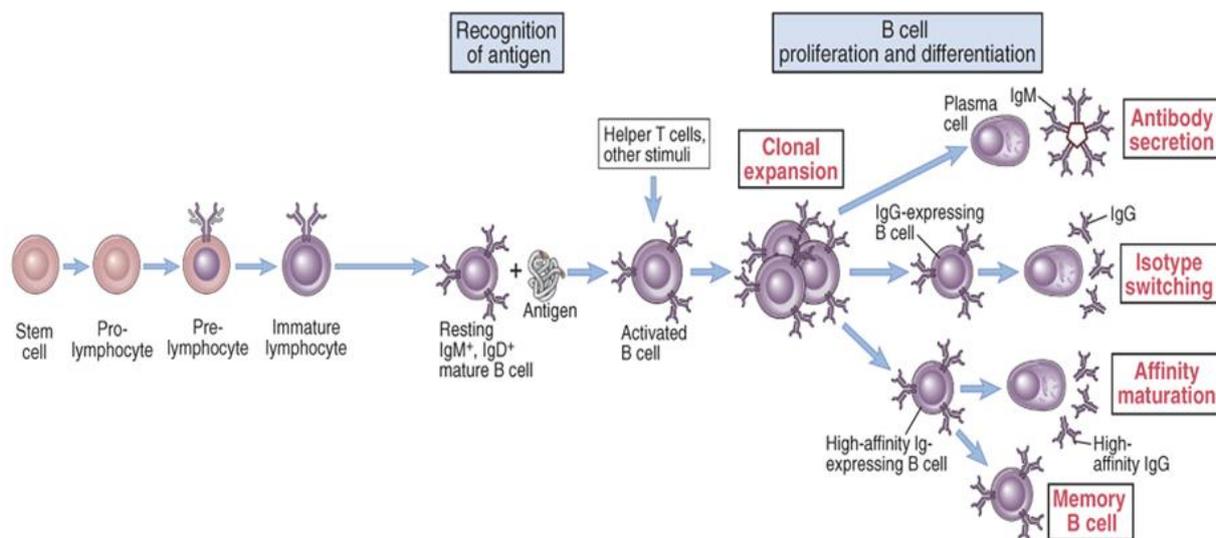


Abb. 1: Die Entwicklung der B-Zelle. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der B-Zelle von der pluripotenten Stammzelle im Knochenmark bis zur antikörpersezernierenden Plasmazelle. Modifiziert nach Abbas et al. 2007, S. 154 und 216.

1.3 Der BZR-Signalweg

Der BZR enthält als Antigen-bindenden Teil eine membrangebundene Form des für diese B-Zelle spezifischen Antikörpers. Die Expression auf der Zelloberfläche wird durch die stabilisierende Funktion eines nicht kovalent assoziierten Heterodimeres, bestehend aus Ig- α (CD79a) und Ig- β (CD79b), ermöglicht (Wienands 2000). Ig- α und Ig- β sind der signalleitende Teil des BZR und enthalten im zytoplasmatischen Teil jeweils ein „*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*“ (ITAM), dessen Konsensussequenz bereits 1989 als D/E X₇ D/E X₂ Y X₂ I/L X₇ Y X₂ I/L (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Kode) identifiziert wurde (Reth 1989) und als für die signalübermittelnde Funktion des Heterodimers essentiell beschrieben wurde (Flaswinkel und Reth 1994, Sanchez et al. 1993).

Durch die Bindung eines passenden Antigens wird der BZR aktiviert (Sohn et al. 2006). Bereits in ruhenden B-Zellen sind Tyrosin-Kinasen der Src-Familie wie Lyn über eine phosphorylierungsunabhängige Interaktion mit Ig- α assoziiert (Campbell und Sefton 1992). Nach Antigenbindung werden Tyrosine der ITAMs durch diese Src-Kinasen phosphoryliert (Saouaf et al. 1994) und die Tyrosin-Kinase Syk wird über die Bindung der Tandem-SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosine der ITAM-Motive zum aktivierten BZR rekrutiert (Kurosaki et al. 1995). SH2-Domänen sind circa 100 Aminosäuren lang und binden spezifisch an Aminosäuresequenzen, die ein phosphoryliertes Tyrosin enthalten (Liu et al. 2006). Die Aktivierung von Syk

erfolgt über die Bindung zu den ITAMs und durch Phosphorylierung durch Lyn und Syk selbst (Kurosaki et al. 1994, Tsang et al. 2008). Dabei kann Syk sowohl benachbarte Syk-Moleküle als auch sich selbst im Sinne einer Autophosphorylierung phosphorylieren. Des Weiteren kann Syk auch Tyrosine in ITAM-Motiven phosphorylieren und den gestarteten BZR-Signalweg damit verstärken (Rolli et al. 2002).

Ein Hauptsubstrat von Syk ist das B-Zell-spezifische Adapterprotein SLP65 (auch BLNK oder BASH genannt) (Fu et al. 1998, Goitsuka et al. 1998, Wienands et al. 1998). Nach Phosphorylierung rekrutiert SLP65 die Tyrosin-Kinase Btk und die Phospholipase PLC- γ 2 und bildet den sogenannten Kalzium-Initiations-Komplex (Chiu et al. 2002). Dieser Komplex ermöglicht es Btk und Syk, PLC- γ 2 zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren. Außerdem rekrutiert SLP65 den Komplex an die Plasmamembran, wo PLC- γ 2 Zugang zu ihrem Substrat, dem Phospholipid Phosphatidyl-Inositol-4,5-Phosphat [PIP₂] erhält (Engelke et al. 2007). Die Details der Membranrekrutierung von SLP65 sind noch nicht abschließend geklärt, es zeigte sich jedoch, dass der N-Terminus (Köhler et al. 2005) und die SH2-Domäne von SLP65 (Abudula et al. 2007) sowie drei prolinreiche Motive, die an Cin85 binden (Oellerich et al. 2011), für die Rekrutierung nötig sind.

An der Membran hydrolysiert PLC- γ 2 PIP₂ in der Zellmembran, wodurch Inositol-1,4,5-Phosphat (IP₃) ins Zytosol freigesetzt wird und Diacylglycerol (DAG) in der Plasmamembran verbleibt. IP₃ aktiviert IP₃-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum, wodurch Kalziumionen in das Zytoplasma strömen (Kurosaki et al. 2000). Auf diesen Einstrom von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern folgt ein Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum (Engelke et al. 2007). Die erhöhte zytosolische Kalziumionenkonzentration beeinflusst eine Vielzahl zellulärer Prozesse, häufig über die Bindung an Calmodulin. Als Beispiel wird über die erhöhte Kalziumionenkonzentration die Phosphatase Calcineurin aktiviert, die den Transkriptionsfaktor NFAT, welcher in ruhenden Zellen durch konstitutive Phosphorylierung im Zytosol gehalten wird, dephosphoryliert und so in den Zellkern translozieren lässt (Crabtree und Olson 2002).

Ebenfalls durch die Aktivität der PLC- γ 2 kommt es über die Bindung an DAG zur Aktivierung der Serin/Threonin-Protein-Kinase C- β (PKC- β). Diese aktiviert das Adapterprotein CARMA1 und den Guanosin-Austauschfaktor RasGRP3. Ersteres führt über die Bildung eines Multiproteinkomplexes zur Aktivierung der Kinase IKK, die

über Phosphorylierung zum proteasomalen Abbau von I κ B führt. NF- κ B wird in ruhenden B-Zellen durch I κ B im Zytosol gehalten und kann nun in den Zellkern translokieren und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren (Shinohara und Kurosaki 2009). Die Aktivierung von RasGRP3 führt über die Aktivierung von Ras über eine Kaskade von MAP-Kinasen zur Aktivierung von Erk und weiteren Transkriptionsfaktoren, die wesentlich für das Überleben der B-Zellen sind (Coughlin et al. 2005, Rowland et al. 2010). Weitere MAP-Kinasen, die durch den BZR aktiviert werden, sind p38 und Jnk, die unter anderem durch SLP65 reguliert werden (Oellerich et al. 2009, Cook et al. 2007) und den Transkriptionsfaktor AP-1 regulieren. Dieser ist wichtig für den Zellzyklus und die Differenzierung der B-Zellen (Foletta et al. 1998).

Durch aktiviertes Syk wird außerdem eine PI3-Kinase aktiviert, die PIP₂ phosphorylieren kann, so dass sich die Menge an PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) in der Membran erhöht (Marshall et al. 2000). Unter anderem binden die PH-Domänen von PLC- γ 2 und Btk an PIP₃ (Falasca et al. 1998, Saito et al. 2001). Ein weiteres Protein, das über PIP₃ an die Plasmamembran rekrutiert und dort aktiviert wird, ist Akt, das in vielen Zellsystemen und so auch in der B-Zelle anti-apoptotisch wirkt (Pogue et al. 2000). Eine Übersicht über den BZR-Signalweg ist in Abb. 2 dargestellt.

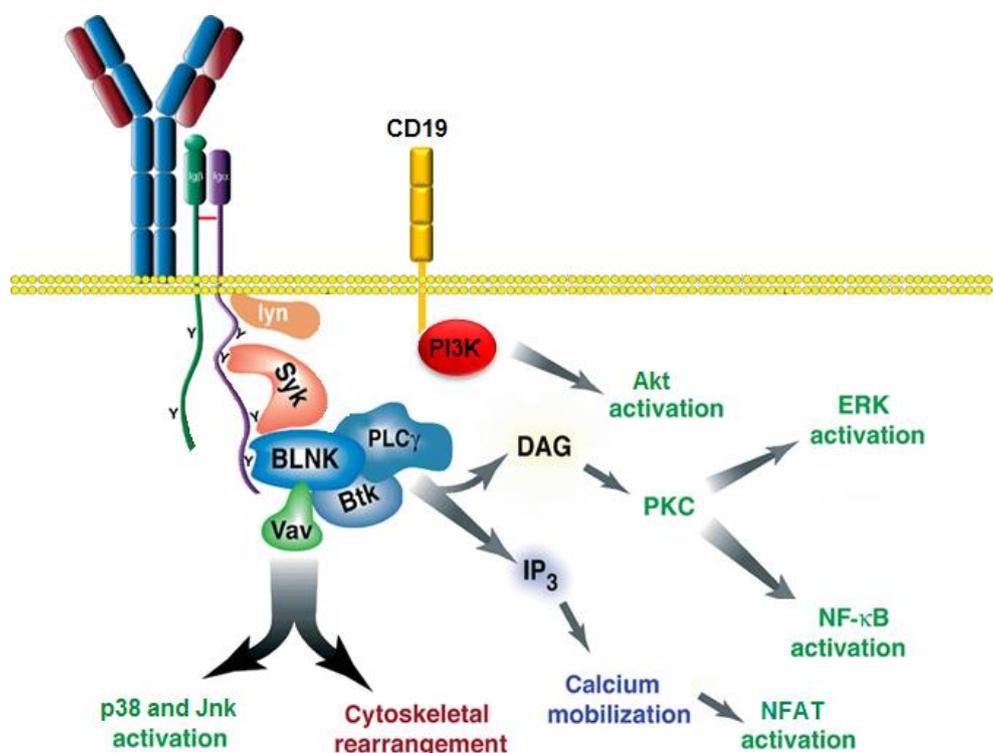


Abb. 2: Übersicht BZR-Signalweg. Nach Aktivierung des BZR durch ein Antigen kommt es zur Aktivierung und Rekrutierung von Syk an die ITAM-Motive in Ig- α und Ig- β . Dadurch wird eine Kette von intrazellulären Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in ihrer Gesamtheit die Reaktion der B-Zelle auf das Antigen bestimmen. Modifiziert nach Wang LD und Clark (2003, S.412).

1.4 Die „spleen tyrosine kinase“ Syk

Ursprünglich wurde Syk 1986 aus bovinem Thymus als 40 kDa großes Fragment mit der Fähigkeit, ein synthetisches Peptid zu phosphorylieren, isoliert (Zioncheck et al. 1986). Später konnte Syk als 72 kDa große Kinase identifiziert (Zioncheck et al. 1988) und durch Analyse von Syk-defizienten DT40-B-Zellen die essenzielle Funktion von Syk im BZR-Signalweg gezeigt werden (Takata et al. 1994). Syk-defiziente Mäuse zeigen einen Block in der B-Zell-Entwicklung auf Ebene der Pro-B-Zellen (Turner et al. 1995, Cheng et al. 1995).

Syk wird jedoch auch in den meisten anderen hämatopoietischen Zellen und einer Vielzahl von nicht-hämatopoietischen Zellen exprimiert (Yanagi et al. 2001) und neben den beschriebenen Funktionen von Syk im BZR-Signalweg gibt es viele weitere Rezeptoren und Zellsysteme, die Syk als aktivierende Kinase benötigen (Mócsai et al. 2010). Auch für eine Reihe von pathologischen Prozessen konnte eine Beteiligung von Syk gezeigt werden. So konnte für viele Formen der Non-Hodgkin-Lymphome wie die chronisch-lymphatische Leukämie (Buchner et al. 2009) oder das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (Chen et al. 2008) und für einige Formen der akuten lymphatischen Leukämie (Uckun et al. 2010 a) eine onkogene Funktion von Syk gezeigt werden. Die Inhibition von Syk durch Kinaseinhibitoren wie Fostamatinib konnte bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom-Rezidiv in einer klinischen Phase-II-Studie ein progressionsfreies Überleben von im Median 4,2 Monaten erzielen (Friedberg et al. 2010).

Syk besteht aus zwei N-terminalen SH2-Domänen, die spezifisch an Phosphotyrosine binden können und durch die Interdomäne A getrennt sind, und einer C-terminalen Kinasedomäne, die von den SH2-Domänen durch die Interdomäne B getrennt ist (siehe Abb. 3) (Sada et al. 2001). In der Interdomäne B befindet sich ein 23 Aminosäuren langer Abschnitt genannt *linker insert*, der in einer Isoform von Syk, genannt Syk-B, durch alternatives Splicing fehlt (Rowley et al. 1995). Besonders in der Interdomäne B findet sich eine Vielzahl von Tyrosinen, die nach einem BZR-Stimulus phosphoryliert werden und für die Aktivierung und Regulation von Syk wichtig sind (Furlong et al. 1997). Aber auch für die Adapterfunktion von Syk ist unter anderem die Interdomäne B entscheidend. Für eine Reihe von Proteinen, wie die regulatorische p85 α -Untereinheit der PI3-Kinase (Moon et al. 2005), den Guanosin-

Austauschfaktor VAV (Deckert et al. 1996) oder das Adapterprotein SLP65 (Kulathu et al. 2009) konnte eine Bindung an Syk gezeigt werden.

Syk ist größtenteils im Zytosol lokalisiert und wird nach einem BZR-Stimulus an die Plasmamembran rekrutiert (Ma et al. 2001). In T-Zellen wird die Funktion von Syk durch das Syk-ähnliche Protein Zap-70 übernommen. Zap-70 weist viele Homologien im Aufbau und in der Aminosäuresequenz auf, es fehlt jedoch das *linker insert*, so dass Zap-70 eher Syk-B gleicht (Chan et al. 1992).

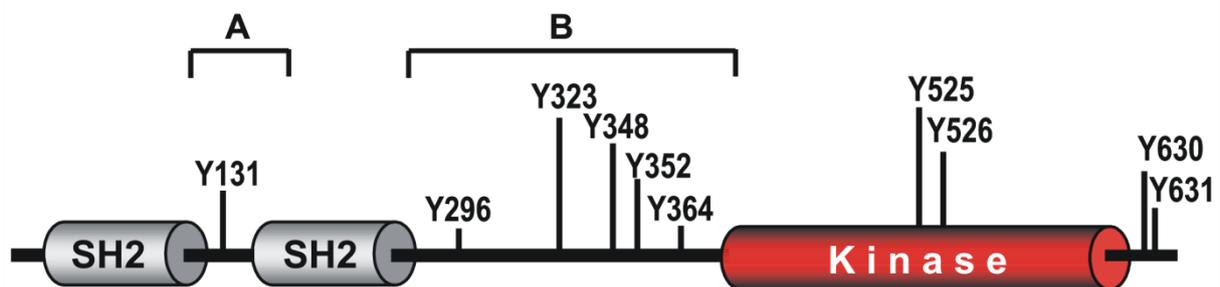


Abb. 3: Struktur von Syk. Eingezeichnet sind die Tandem-SH2-Domäne, die Kinasedomäne, die Interdomäne A und B sowie die bekannten Autophosphorylierungsstellen. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S. 1552).

Wie die meisten Signalproteine weist Syk in unstimulierten B-Zellen nur eine geringe Aktivität auf, die nach einem BZR-Stimulus für einen begrenzten Zeitraum und an bestimmten subzellulären Lokalisationen in der B-Zelle stark ansteigt. Nach der Rekrutierung an die Plasmamembran und der Aktivierung durch Phosphorylierung und ITAM-Bindung phosphoryliert Syk eine Reihe von Zielproteinen und beeinflusst dadurch die Aktivität der Proteine oder schafft Bindemotive für Phosphotyrosin-abhängige Bindedomänen wie SH2-Domänen (Geahlen 2009, Kulathu et al. 2009). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Syk präferentiell Tyrosine in Aminosäuremotiven phosphoryliert, an die auch SH2-Domänen binden können (Brunati et al. 1995). Vergleicht man verschiedene von Syk phosphorylierte Motive, ergibt sich das Konsensusmotiv (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Kode) EXXDEEDYYEXPXEPX (Geahlen 2009).

Für viele Kinasen konnte gezeigt werden, dass sie sich in unstimulierten Zellen in einer autoinhibierten Konformation befinden, wobei die einzelnen Domänen sich gegenseitig in ihrer Funktion blockieren (Huse und Kuriyan 2002). Für Zap-70 konnte durch Analyse der kristallinen Struktur der molekulare Mechanismus dazu gezeigt werden. Dabei stabilisieren spezifische unphosphorylierte Tyrosin-Reste die autoin-

hibierte Konformation. Durch Phosphorylierung dieser Tyrosin-Reste oder durch Interaktion der SH2-Domänen mit ITAM-Motiven werden diese intermolekularen Interaktionen gestört und Zap-70 geht in einen aktivierten Zustand über (Deindl et al. 2007). Für Syk konnte bisher keine hochauflösende Kristallstruktur erstellt werden, jedoch deuten verschiedene Studien, unter anderem auch eine niedrig aufgelöste dreidimensionale Struktur (Arias-Palomo et al. 2007 und 2009) darauf hin, dass Syk in ähnlicher Weise wie Zap-70 reguliert wird.

Es konnte gezeigt werden, dass Syk durch die Phosphorylierung von Tyrosin 348 und 352 (alle Aminosäureangaben beziehen sich auf humanes Syk) in der Interdomäne B aktiviert werden kann (Tsang et al. 2008). Diese Tyrosine können sowohl durch Syk selbst im Sinne einer Autophosphorylierung, als auch durch die Src-Kinase Lyn phosphoryliert werden (Keshvara et al. 1998) und entsprechen den Tyrosinen in Zap-70, die für die Aufrechterhaltung der autoinhibierten Form wichtig sind. Syk kann aber genauso durch die Bindung der Tandem-SH2-Domänen an phosphorylierte ITAM-Motive aktiviert werden, so dass von einem *Or-Gate* gesprochen wird, da beide Aktivierungsalternativen zur vollen Aktivität von Syk führen (Tsang et al. 2008).

Ebenfalls zu einer Aktivierung führt die Phosphorylierung der drei C-terminalen Tyrosine (629, 630 und 631), die ein Bindemotiv für die SH2-Domäne von SLP65 darstellen. Es wird vermutet, dass Syk initial über den BZR an die Plasmamembran rekrutiert wird und nach der Internalisierung des gebundenen Antigens zusammen mit dem BZR Syk durch einen Komplex mit SLP65 als aktive Kinase an der Plasmamembran verbleibt (Kulathu et al. 2008, Abudula et al. 2007). Für Zap-70 konnte an homologen Tyrosinen eine Rolle bei der Stabilisierung der Autoinhibition gezeigt werden (Deindl et al. 2007).

Schließlich ist der BZR-abhängige Kalziumionen-Einstrom auch von der Phosphorylierung der Tyrosine 525 und 526 in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne von Syk abhängig, wobei der genaue Mechanismus unklar bleibt, weil anders als bei vielen anderen Kinasen (Adams 2003) die Kinase-Aktivität von Syk dadurch nicht beeinflusst wird (Zhang et al. 1998).

Über die Inhibition von Syk ist weit weniger bekannt. Ein wichtiger Negativregulator scheint jedoch, nachdem es initial die Aktivierung von Syk bewirkt, Lyn zu sein, das über die Aktivierung von Phosphatasen wie SHP (DeFranco et al. 1998) die Dephos-

phorylierung von Syk bewirkt. In der Interdomäne B von Syk befindet sich das von Lyn phosphorylierte, inhibitorisch wirksame Tyrosin 323, an das im phosphorylierten Zustand unter anderem die E3-Ubiquitinligase Cbl bindet und zur Ubiquitylierung von Syk führen kann (Hong et al. 2002). Ubiquitylierung führt häufig zur proteasomalen Degradierung von Proteinen (Salomons et al. 2010), jedoch konnte in B-Zellen kein BZR-abhängiger Abbau von Syk gemessen werden (Kitaura et al. 2007, siehe auch Abb. 10, Seite 49), so dass auch ein vom Proteasom unabhängiger Inhibitionsmechanismus von Syk durch Cbl in Frage kommt. Eine weitere Aufschlüsselung der inhibitorisch wirksamen Elemente des BZR-Signalweges ist angesichts der Relevanz von Syk als Onkogen in vielen Neoplasien ein wichtiger Schritt zum Verständnis dieser Erkrankungen.

Neben der Beeinflussung von Proteinen über die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten ist für viele Proteine auch eine Regulation durch die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten beschrieben (Weiel et al. 1990), die jedoch bisher für Syk weit weniger ausführlich erforscht ist. Für Threonin 530 konnte gezeigt werden, dass es durch PLK1 phosphoryliert und dadurch die Kinase-Aktivität von Syk beeinflusst wird (Uckun et al. 2010 b). Bei der Vielzahl an Serinen und Threoninen in Syk kann jedoch von weiteren Tyrosin-unabhängigen Regulationsmechanismen ausgegangen werden. Die genaue Kenntnis über die Gesamtheit der phosphorylierten Serine und Threonine und ihrer Phosphorylierungskinetik könnte Hinweise auf weitere Regulationsmechanismen von Syk liefern.

1.5 Massenspektrometrische Analysen von Signalwegen

Bei der Transduktion extrazellulärer Signale über intrazelluläre Signalketten wirkt eine schwer zu überblickende Anzahl von teils noch unbekanntem Effektorproteinen in einem multipel verknüpften Netzwerk zusammen (Olsen et al. 2006). Bei der Vielzahl an möglichen Interaktionen der Effektorproteine und der Anzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen sind Methoden wie die Massenspektrometrie Möglichkeiten zum weiteren Verständnis von Signalkaskaden. Die klassische Funktion eines Massenspektrometers ist die Bestimmung der Masse eines Moleküls. Massenspektrometrische Untersuchungen haben den Vorteil, dass eine unvoreingenommene und globale Untersuchung eines Proteins vorgenommen werden kann (Walther und Mann 2010, Choudhary und Mann 2010). Dazu müssen das zu untersuchende Proteinge-

misch zunächst proteolytisch verdaut (Shevchenko et al. 2006) und die Peptide mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Fenn et al. 1989) ionisiert werden. Zur Bestimmung der Masse stehen dann verschiedene Systeme zur Verfügung. Für diese Arbeit wurde ein Orbitrap-Massenspektrometer verwendet. In diesem oszillieren die Peptide in einer bestimmten, von Masse und Ladung des Peptides abhängigen Frequenz um eine Ionenfalle. Dadurch kann die Masse im Verhältnis zur Ladung (m/z) und die Intensität jedes Peptides gemessen und als sogenanntes Spektrum mit m/z auf der Abszisse und der Intensität auf der Ordinate angezeigt werden kann (Scigelova und Makarov 2006). Dieser erste Schritt der Peptiderkennung wird als MS-Analyse bezeichnet. Allein die Masse genügt jedoch in komplexen Peptid-Gemischen nicht, um ein Peptid sicher zu identifizieren. Deshalb wird in einem zweiten Messschritt die Sequenz des Peptides bestimmt, was als MS/MS-Analyse bezeichnet wird. Dazu werden die Peptide zunächst in eine Kollisionskammer überführt, wo sie fragmentiert werden. Durch die erneute Messung der Masse der Bruchstücke kann die Aminosäuresequenz des Peptides bestimmt werden (Steen und Mann 2004). Durch den Abgleich der resultierenden MS- und MS/MS-Daten mit einer Datenbank (Perkins et al. 1999) werden die dazugehörigen Proteine ermittelt (Sadygov et al. 2004). Mittels elektronischer Datenverarbeitungsprogramme wie MaxQuant (Cox und Mann 2008) oder MsQuant (Schulze und Mann 2004) sind weitere quantitative Auswertungen möglich.

Häufig ist jedoch wichtiger, in welchem Ausmaß sich die Menge eines Proteins in zwei unterschiedlichen Konditionen, zum Beispiel in einer stimulierten im Vergleich zu einer unstimulierten Zelle, unterscheidet (Walther und Mann 2010), als die bloße Anwesenheit eines Proteins nachzuweisen. Eine Möglichkeit, quantitative Messungen durchzuführen, ist das *stable isotope labeling of amino acids in cell culture*, kurz SILAC (Ong et al. 2002). Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit unterschiedlich schweren Aminosäuren kultiviert. Der Massenunterschied wird dabei durch den Einbau von stabilen, schweren Isotopen von Kohlen-, Stick- oder Wasserstoff in die Aminosäuren Arginin und Lysin erreicht (siehe Abb.4 unten). Da Arginin und Lysin als essentielle Aminosäuren in eukaryoten Zellen nicht synthetisiert werden können, werden alle Proteine in den Zellen mit diesen veränderten Aminosäuren markiert.

Durch die Kultivierung einer Kontrollzelllinie mit leichten Aminosäuren kann ein relativer Vergleich von zwei verschiedenen Versuchsbedingungen erzielt werden, da sich die Peptide durch einen Massenunterschied im Massenspektrometer unterscheiden lassen (Ong et al. 2002). Es ergeben sich Peptid-Paare, die sich in ihrer Masse genau um die SILAC-Modifizierungen unterscheiden. Somit sind den aufgereinigten Peptiden der einen Zelle korrespondierende Peptide der anderen Zelle zuzuordnen. Ist die Intensität des Peptides aus beiden Zellen gleich groß, so ist das Peptid in beiden Versuchsbedingungen in gleicher Menge vorhanden. Wenn jedoch die Intensitäten der Peptide aus den schweren und leichten Zellen deutlich abweichen, so besteht ein quantifizierbarer Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen (siehe Abb. 4 oben).

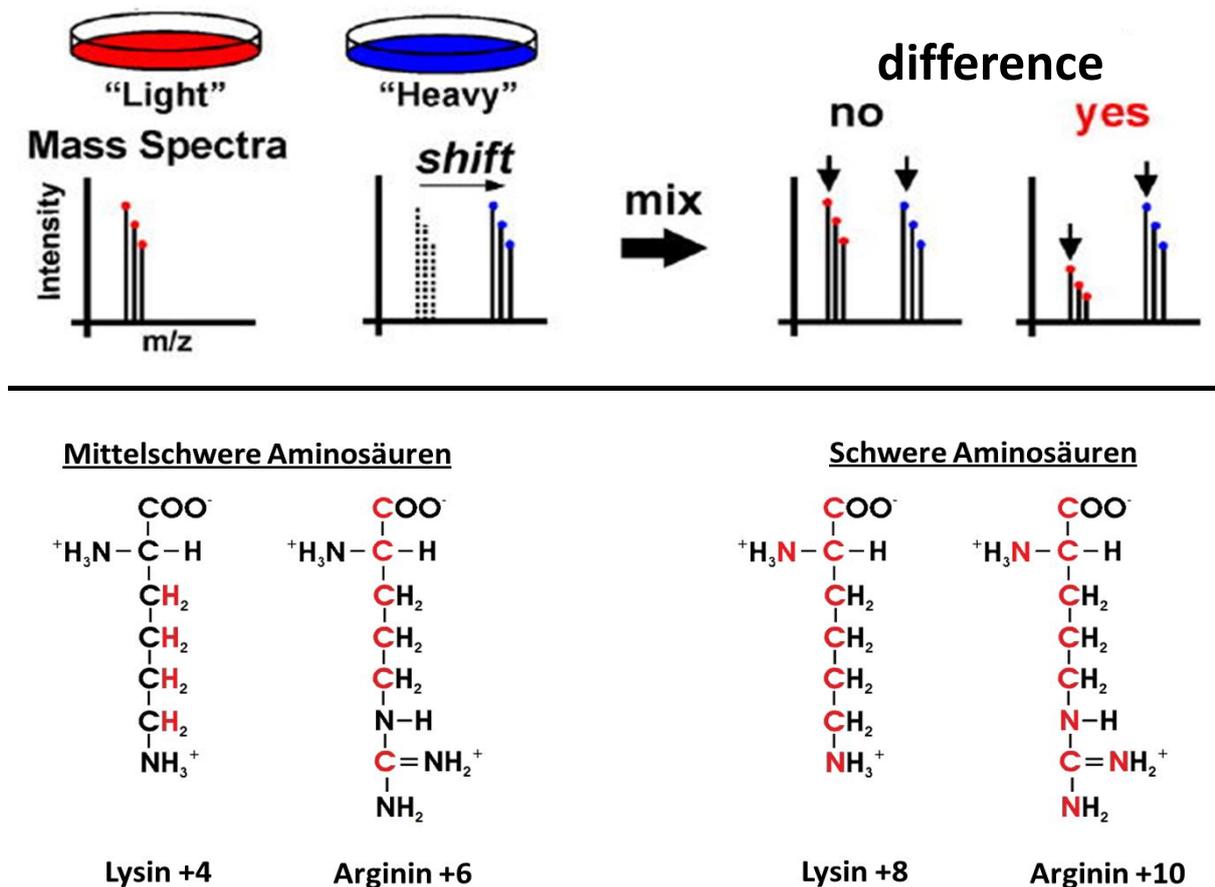


Abb. 4: Das SILAC-Prinzip. Der obere Abschnitt zeigt, wie sich die Spektren von leichten und schweren Peptiden zueinander verhalten, wenn die Peptide in unterschiedlichen Mengen vorliegen. Im unteren Abschnitt sind in Rot die Elemente der Aminosäuren dargestellt, die durch ein um eine Masseneinheit schwereres Isotop (²D, ¹³C oder ¹⁵N) substituiert sind. Modifiziert nach Rinehart et al. (2009, S. 528).

Neben den Proteinmengen spielen posttranslationale Modifikationen (PTM) wie die Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei allen zellulären Funktionen. Die Analyse

von PTMs mittels Massenspektrometrie ist möglich, da jede zu einer definierten Massenänderung des Peptids führt. Dieser Massenunterschied kann im MS-Modus zunächst global für das Peptid bestimmt und dann im MS/MS-Modus einer spezifischen Aminosäure zugeordnet werden. Durch die Kombination der massenspektrometrischen Analyse phosphorylierter Peptide mit dem SILAC-Prinzip ist es über die reine Identifikation von Phosphorylierungsstellen hinaus auch möglich, Phosphorylierungskinetiken nach Rezeptorstimulation zu messen (Witze et al. 2007).

1.6 Ziel der Studie

Für das Verständnis der diversen Funktionen von Syk ist eine umfassende Kenntnis über die Regulation der Syk-Aktivität sowie der Interaktion von Syk mit spezifischen Effektorproteinen nötig. In den letzten Jahren sind in diesem Bereich große Fortschritte erzielt worden, insbesondere die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen und die Untersuchung ihrer Funktion hat das Wissen über die Aktivierung von Syk stark vermehrt. Jedoch blieben viele Fragen, insbesondere zur Inhibition von Syk, bisher offen. Auch ist bisher wenig über die Phosphorylierung von Syk an Serinen und Threoninen bekannt.

Konventionelle Experimente wie die Ko-Immunopräzipitation einzelner Liganden haben den Nachteil, dass damit nur eine gezielte Überprüfung von Bindepartnern und Phosphorylierungsstellen möglich ist. Um dieses Problem zu überwinden, stellt die Massenspektrometrie in Kombination mit dem SILAC-Verfahren eine Möglichkeit dar, die Phosphorylierung und das Interaktom von Syk global und unvoreingenommen zu bestimmen.

Das Ziel dieser Studie soll die Analyse der BZR-abhängigen Phosphorylierungskinetik und des Interaktoms von Syk in B-Lymphozyten sein. Durch Mutationsanalysen der gefundenen Phosphorylierungsstellen und durch die Untersuchung der Konsequenzen einer solchen Mutation auf die Funktion von Syk im BZR-Signalweg sollen neue regulatorische Phosphorylierungsstellen und Interaktionspartner sowie deren Funktion identifiziert werden (siehe Abb. 5).

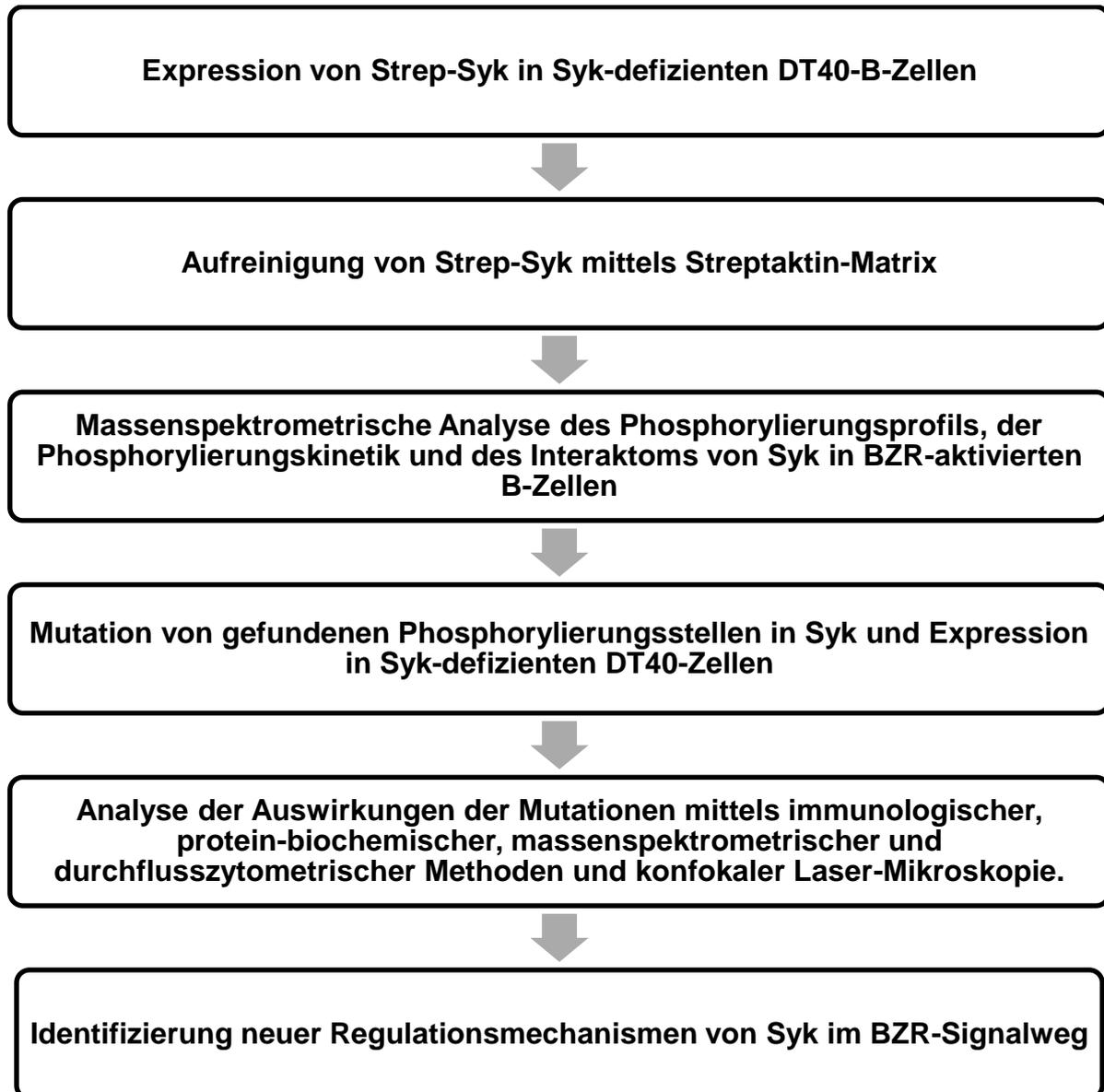


Abb. 5: Ziel der Studie. Die Abbildung zeigt zusammenfassend die Abfolge von Arbeitsschritten, die zur Identifizierung von neuen regulatorischen Elementen von Syk im BZR-Signalweg in dieser Arbeit erfolgt ist.

2. Material

2.1 Geräte

Autoklaven	Integra Biosciences, Ruhberg
Bakterienbrutschrank Kelvitron	Heraeus, Hanau
Blotwippe Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Blotapparatur T70/T77 semi-dry transfer unit	Hoefer, Holliston, Massachusetts
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Blotenwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Dielheim
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD, Franklin Lakes, New Jersey
Elektrophoresekammer für DNA-Elektrophorese	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammern für SDS-PAGE	Biorad, München
Elektroporator Gene Pulser	Biorad, München
ELISA-Auslesegerät Power Wave 340	Biotek, Winooski, Vermont
Feinwaage R160P	Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentations-System Chemi Lux Imager	Intas, Göttingen
Konfokales Laser-Mikroskop TCS SP2	Leica, Wetzlar
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Sorvall RC 3B Plus	MI-SS, Corona, California
Massenspektrometer LTQ-Orbitrap XL Hybrid	Thermo, Waltham, Massachusetts
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Nano-flow-LC-System 1100	Agilent, Santa Clara, California
PCR-Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Level 1	inoLab, Weilheim
Probenroller	Fröbel Labor Technik, Lindau
Schüttelinkubator Unitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Sicherheitswerkbank HeraSafe Typ H	Heraeus, Hanau
Sonifier Cell Disruptor B-15	Branson, Danbury, Connecticut
Spannungsquellen Electrophoresis Power Supply	Amersham, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Water Purification System Milli-Q	Millipore, Billerica, Massachusetts
Zellkultur-Inkubator Hera Cell 150	Heraeus, Hanau

2.2 Computersoftware und Internetadressen

Beschreibung	Verwendung
Photoshop CS2, Adobe, San Jose, Kalifornien	Bildbearbeitung
CellQuest Pro, BD, Franklin Lakes, New Jersey	Auswertung der Daten des Durchflusszytometers
Draw 10, Corel, Ottawa, Kanada	Bildbearbeitung
CSX-1400M Kamera Controller, Intas, Göttingen	Westernblot-Fotografie
FlowJo alias 3.5.3, Tree Star, Ashland, Oregon	Auswertung der Daten des Durchflusszytometers
Gel-Dokumentations-Software GDS, Intas, Göttingen	Fotografie von Agarose-Gelen
http://elm.eu.org/	<i>In-silico</i> -Analyse von Syk
http://frodo.wi.mit.edu/primer3/	Primerdesign
http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html	Protein- und DNA-Vergleich
http://scansite.mit.edu/	<i>In-silico</i> -Analyse von Syk
http://www.expasy.org/	Protein-Datenbank
http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Pubmed
ImageJ 1.42q, NIH, Bethesda, Maryland	Auswertung der konfokalen Laser-Mikroskopie
IPI Chicken 3.47, EBI, Cambridge, Massachusetts	Peptid-Datenbank
IPI Human 3.6, EBI, Cambridge, Massachusetts	Peptid-Datenbank
SP2 System, Leica, Wetzlar	Konfokale Mikroskopie
MASCOT 2.2.04, Matrix Science, Boston, Massachusetts	Suchmaschine für Peptidabgleich
MaxQuant 1.0.12.31, MPI, München	Auswertung Massenspektrometrischer Daten
MsQuant 2.0b6, CEBI, Odense, Dänemark	Auswertung Massenspektrometrischer Daten
Excel 2010, Microsoft, Redmond, Washington	Statistik, Erstellung von Diagrammen
pDRAW 3.1, AcaClone Software	<i>In-silico</i> -DNA-Bearbeitung

Tabelle 1: Verwendete Software und Internetadressen

2.3 Materialien

1.5 ml und 2 ml Verschlussröhrchen
Affinitätspräzipitations-Säulchen 5 ml
Akkupipettierhilfe Pipetboy
Blotting-Papier
Elektroporationsküvetten 4mm
Gekammerte Deckgläser Lab-Tek
NuPAGE Bis-Tris Gradientengel 4 – 12%
HPLC C18 Säulen
Nitrocellulose (Hybond™ ECL™)
PCR-Röhrchen
Pipetten (2,5; 20; 100; 1.000 µl)
Sterilfilter
Streptavidin-beschichtete ELISA-Platte
TiO₂-Säulchen
Ultrafiltrations-Zentrifugen-Röhrchen Vivaspin
Zellkultur Plastikware

Eppendorf, Hamburg
Thermo, Waltham, Massachusetts
Integra, Zizers, Schweiz
Whatman, Maidstone, UK
Peqlab, Erlangen
EMS, Hatfield, Pennsylvania
Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen
Amersham, München
Thermo, Waltham, Massachusetts
Eppendorf, Hamburg
Roth, Karlsruhe
Millipore, Billerica, Massachusetts
GL Sciences Inc
Sartorius, Göttingen
Greiner, Nunc, Falcon

2.4 Chemikalien und Reagenzien

ABTS
Acetonitril
Acrylamid
Agarose
Agar
Ammoniumhydroxid
Ammoniumperoxidosulfat (APS)
Ampicillin
Azid (NaN₃)
ATP
Biotinyliertes Gastrin-Vorläufer-Peptid (Tyr87)
Blasticidin
BSA
Bromphenolblau (BPB)
Coomassie Blue R250
Coomassie Plus 200 Bradford Reagenz
Desthiobiotin
Dimethylsulfoxid (DMSO)
DMEM-Medium
DNA-Marker GeneRuler™ 1 kb
2,5-Dihydroxybenzoesäure
Dithiothreitol (DTT)
EDTA

Sigma, St. Louis, Missouri
Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Sigma, St. Louis, Missouri
Sigma, St. Louis, Missouri
Merck, Darmstadt
Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Sigma, St. Louis, Missouri
Sigma, St. Louis, Missouri
CST, Danvers, Massachusetts
Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
PAA, Pasching, Österreich
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Thermo, Waltham, Massachusetts
IBA, Göttingen
Roth, Karlsruhe
Gibco, Darmstadt
Fermentas, St. Leon-Rot
Sigma, St. Louis, Missouri
Sigma, St. Louis, Missouri
Roth, Karlsruhe

EGTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, Missouri
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Darmstadt
Ficoll	Sigma, St. Louis, Missouri
Dialysiertes fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Glutathione-Sepharose-Beads	Amersham, München
Glutathion	Amersham, München
Glycerin (87%)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, St. Louis, Missouri
IGEPAL CA-630 (NP40)	Sigma, St. Louis, Missouri
Glucose	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hühnchen-Serum (CS)	Gibco, Darmstadt
Indo-1	Molecular Probes, Eugene, Oregon
Iodazetamid	Sigma, St. Louis, Missouri
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumazetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, St. Louis, Missouri
L-Arginin	Sigma, St. Louis, Missouri
L-Arginin +6	Sigma, St. Louis, Missouri
L-Arginin +10	Sigma, St. Louis, Missouri
LDS	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Luminol	Sigma, St. Louis, Missouri
L-Lysin	Sigma, St. Louis, Missouri
L-Lysin +4	Cambridge Isotopes, Andover, Massachusetts
L-Lysin +8	
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Sigma, St. Louis, Missouri
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methansäure	Merck, Darmstadt
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid	Ridel-de Haën, Seelze
Natriumfluorid	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis, Missouri
dNTPs	NEB, Ipswich, Massachusetts
Orthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma, St. Louis, Missouri
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma, St. Louis, Missouri
Penicillin/Streptomycin	Sigma, St. Louis, Missouri
Peptone	Roth, Karlsruhe
Pluronic F-127	Molecular Probes, Eugene, Oregon
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma, St. Louis, Missouri
Protease-Inhibitor-Cocktail (P 2714)	Sigma, St. Louis, Missouri
Protein-A/G-Plus-Agarose	SCBT, Santa Cruz, Kalifornien
Proteinmarker (vorgefärbt, 6.5-175 kDa)	NEB, Ipswich, Massachusetts
Puromycin	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Redox-Substanz	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
RPMI-1640-Medium	Gibco, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SILAC-RPMI-1640-Medium	Thermo, Waltham, Massachusetts
Sodium-Pyruvat	Biochrom, Berlin
Streptaktin-Sepharose-Beads	IBA, Göttingen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Transfektionsreagenz FuGENE	Roche, Risch, Schweiz
Trifluoressigsäure	Sigma, St. Louis, Missouri
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, St. Louis, Missouri
Trypsin	Gibco, Darmstadt
Modifiziertes Trypsin	Promega, Madison, Wisconsin
Tween-20	Roth, Karlsruhe
X-gal	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe

2.5 Puffer und Medien

Sofern nichts anderes angegeben, wurden alle Puffer und Medien in doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Medien für E. coli wurden für 30 min bei 125°C autoklaviert und bei 4°C gelagert. FCS und CS wurden für 20 min bei 56°C hitzeinaktiviert und bei -20°C gelagert. Alle Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT gelagert.

Blot-Transfer-Puffer 192 mM Glycin ; 25 mM Tris ; 0,1% (w/v) SDS ;
20% (v/v) Methanol

Agarose-Gel	TAE-Puffer ; 1% (w/v) Agarose ; 0,01% (v/v) Ethidiumbromid ; aufkochen lassen und bei 60°C lagern
Bakterien-Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM DTT ; 2% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
Block-Puffer	TBS-T ; 5% BSA (w/v) ; 0.001% NaN ₃
DNA-Laufpuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA ; 0,25% (w/v) BPB ; 15% (w/v) Ficoll
ECL-Lösung	4ml Lösung A: 0.1M Tris/HCl, pH 8.6 ; 250 mg/ml Luminol ; 4°C ; 400 µl Lösung B: 1,1 g/l parahydroxy-coumarin in DMSO ; 1,2 µl 30% H ₂ O ₂
Einfriermedium	hitzeinaktiviertes FCS ; 10% (v/v) DMSO ; 4°C
Glutathion-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 10 mM Glutathion
Indo-1	1 mM in DMSO
Kinase-Puffer	120 mM HEPES pH 7,5 ; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MnCl ₂ ; 6 µM Na ₃ VO ₄ ; 1,25 mM DTT
Kinase-ATP-Substrat-Lösung	40 µM ATP ; 50% (v/v) Substrat-Peptid
Kinase-Stopp-Puffer	50 mM EDTA, pH 8
Kinase-ABTS-Puffer	ABTS ; 0,4% (v/v) H ₂ O ₂
Krebs-Ringer-Lösung	140 mM NaCl ; 4 mM KCl ; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM; Glukose ; 10 mM HEPES pH 7,4 ; autoklaviert, 4°C; entweder 0,5 mM EGTA oder 1 mM CaCl ₂
Laemmli-Puffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 4% (w/v) SDS ; 2 mM EDTA ; 20% (v/v) Glycerin ; 0,02% (w/v) Bromphenolblau ; 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
LB-Medium	10 g/l Peptone; 5 g/l Hefe Extrakt ; 10 g/l NaCl; 4°C
LB-Amp-Medium	LB-Medium ; 100 µg/ml Ampicillin ; 4°C
LB-Kan-Medium	LB-Medium ; 50 µg/ml Kanamycin ; 4°C
LB-Agar	LB-Medium ; 2% (w/v) Agar ; 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin ; 4°C
PBS	137,5 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,6 mM Na ₂ HPO ₄
PBS-T	PBS ; 0,1% (w/v) Tween-20
Polybrene-Lösung	PBS ; 3 mg/ml Polybrene

RPMI-Medium	RPMI ; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS ; 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin ; für DT40 zusätzlich 1% (v/v) CS
DMEM-Medium	DMEM ; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS ; 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin
RPMI-SILAC-Medium	RPMI SILAC Medium ; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS ; 50 U/ml Penicillin ; 50 µg/ml Streptomycin ; 2 mg/ml Arginin (+0 ; +6 oder +10u) ; 4 mg/ml Lysin (+0 ; +4 oder +8u) ;
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris ; 192 mM Glycin ; 3,5 mM SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngel	375 mM Tris/HCl, pH 8,8 ; 0,1% (w/v) SDS ; 10% (w/v) Acrylamid ; 0,1% TEMED ; 0,1% APS (10%)
SDS-PAGE-Sammelgel	125 mM Tris/HCl, pH 6,8 ; 0,1% (w/v) SDS ; 4,8% (w/v) Acrylamid ; 0,1% TEMED ; 0,1% APS (10%)
TAE-Puffer	40 mM Tris/Essigsäure (HAc) pH 7,8 ; 1 mM EDTA pH 8,0
TBS-T	10 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 0,1% (v/v) Tween-20
TFB-I-Puffer	50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl ; 10 mM CaCl ₂ ; 30 mM KOAc pH 6,8 ; 15% (v/v) Glycerin ; mit Ethansäure auf pH 6,1 einstellen; sterilfiltrieren; 4°C
TFB-II-Puffer	75 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl ; 10 mM MOPS ; 15% (v/v) Glycerin ; mit KOH auf pH 7,0 einstellen ; sterilfiltriert ; 4°C
Trypsin/EDTA-Lösung	PBS; 0.05% (w/v) Trypsin; 0.02% (w/v) EDTA; 4°C
Zell-Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 ; 150 mM NaCl ; 5 mM NaF; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 2% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail; 0,5% NP40

2.6 Enzyme

Alkaline Phosphatase (CIP)	NEB, Ipswich, Massachusetts
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzyme, Vantaa, Finnland
Restriktionsendonukleasen	NEB, Ipswich, Massachusetts
T4-DNA-Ligase	NEB, Ipswich, Massachusetts
Taq-DNA-Polymerase	NEB, Ipswich, Massachusetts

2.7 Kits

Plasmidpräparation Mini	PureYield™ Plasmid Miniprep System, Promega, Madison, Wisconsin
Plasmidpräparation Midi	PureYield™ Plasmid Midiprep System, Promega, Madison, Wisconsin
DNA-Präparation Agarosegel	Wizard® Clean-Up System, Promega, Madison, Wisconsin
Klonierung in pCRII-TOPO	TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien

2.8 Vektoren

Vektor	Beschreibung	Herkunft
pCRII-TOPO	Zur Sicherung von PCR-Produkten mittels T/A-Klonierung, Ampicillin- und Kanamycinresistenz	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
pGEX	Zur Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterienzellen, GST-Gen N-terminal des Polylinker, Ampicillinresistenz	Amersham, München
pAbes-N-Strep	Zur retroviralen Transfektion, β -Aktin Promotor, STrEP-Tag-DNA (IBA, Göttingen) N-terminal des Polylinkers, Ampicillin- und Puromycinresistenz	Takata et al., 1994, modifiziert von Dr. T. Oellerich, Göttingen
pMSCV-Puro-N-Citrin	Zur retroviralen Transfektion mittels PlatE-Zellen, Citrin-Gen vor dem Polylinker, Ampicillin- und Puromycinresistenz	Clontech (Mountain View, Kalifornien), modifiziert von Dr. M. Engelke, Göttingen
pHCMV-VSV-G	Zur Expression von VSV-G in PlatE-Zellen zur Pseudotypisierung rekombinanter Retroviren	Labor Dr. M. Jücker, UKE Hamburg

Tabelle 2: Verwendete Vektoren

2.9 cDNAs

Die cDNA von humanem Syk lag bereits in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wienands vor. Die cDNA von humanem SLP76 wurde freundlicherweise von D. Yablonski (Haifa, Israel) bereitgestellt.

2.10 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Anlagerungstemperatur der Primer für die PCR wurde mit Hilfe von <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> errechnet. Für die Mutagenese-Primer wurde generell eine Anlagerungstemperatur von 70°C gewählt.

Primer	Sequenz 5'→3'	Anlagerungs- temperatur
Syk für pAbes		
Fw BamHI	AAAGGATCCACCATGGCCAGCAGCGG	62°C
Bw XhoI	AAACTCGAGTTAGTTCACCACGTCATAGTAG-TAATTG	62°C
Syk Mutagenese-Primer		
S44A fw	CTTTATTTGCTGCGCCAGGCCCGCAACTAC-CTGGG	Siehe Hinweis
bw	CCCAGGTAGTT-GCGGGCCTGGCGCAGCAAATAAAG	Siehe Hinweis
S44E fw	CTTTATTTGCTGCGCCAGGAGCGCAACTAC-CTGGG	Siehe Hinweis
bw	CCCAGGTAGTT-GCGCTCCTGGCGCAGCAAATAAAG	Siehe Hinweis
S202A fw	CAGAGACAACAACGGCGCCTACGCCCTGTGCC TG	Siehe Hinweis
bw	CAGGCACAGGGCGTAGGCGCCGTTGTT-GTCTCTG	Siehe Hinweis
S202E fw	CAGAGACAACAACGGCGAG-TACGCCCTGTGCCTG	Siehe Hinweis
bw	CAGGCACAGGGCGTACTCGCCGTTGTT-GTCTCTG	Siehe Hinweis
T256V fw	GGTTTGTTAAGAGTTCTTGTTGTCCCATGTC	Siehe Hinweis
bw	GACATGGGACAACAAGAACTCTTAACAAACC	Siehe Hinweis

S295A fw	CTCAAGAATCAAAGCATACTCCTTCCCAAAGC	Siehe Hinweis
bw	GCTTTGGGAAGGAGTATGCTTTGATTCTTGAG	Siehe Hinweis
S297A fw	GAATCAAATCATACGCCTTCCCAAAGCCTGGC	Siehe Hinweis
bw	GCCAGGCTTTGGGAAGGCGTATGATTTGATTC	Siehe Hinweis
S306A fw	CCTGGCCACAGAAAGGCCTCCCCTGCCCAAGG G	Siehe Hinweis
bw	CCCTTGGGCAGGGGAGGCCTTT- CTGTGGCCAGG	Siehe Hinweis
T317V fw	GAACCGGCAAGAGAGTGTTGTGTCATTCA- ATCCG	Siehe Hinweis
bw	CGGATTGAATGACACAACACTCTCTT- GCCGGTTC	Siehe Hinweis
Y323F fw	GTCATTCAATCCGTTTGAGCCAGAAC	Siehe Hinweis
bw	GTTCTGGCTCAAACGGATTGAATGAC	Siehe Hinweis
T371V fw	GGACCGAAAGCTGCTGGTGCTG- GAAGACAAAGAAC	Siehe Hinweis
bw	GTTCTTTGTCTTCCAGCACCCAGCAGCTTT- CGGTCC	Siehe Hinweis
T530V fw	CTACTACAAGGCCAGGTCCATG- GAAAGTGGCCTG	Siehe Hinweis
bw	CAGGCCACTTTCCATGGACCTGGGCCTTGTA- TAG	Siehe Hinweis
Syk-B overlap extension für pMSCV		
5' Teil-fw- BamHI	AAAAGGATCCGAAGCATGGCCAGCAGC	65°C
5' Teil-bw	GTGGCCAGGCTTTGGCAGGATGGGAACCTGGA	65°C
3' Teil-fw	GTTCCCATCCTGCGTCCTCCCCTGCCCAAGG	66°C
3' Teil-bw- NotI	AAAAGCGGCCGCGGAGCGGTTAGTTCACCACG	67°C
SLP76 für pMSCV		
Fw-BamHI	AAAAGGATCCATGGCACTGAGGAATGTGCC	66°C
Bw-NotI	AAAAGCGGCCGCCTATGGGTAC- CCTGCAGCATG	65°C

SLP76 Mutagenese-Primer		
K85P fw	GAGCATCTTCACACGCCAC- CCCAAGTCCCGCGG	Siehe Hinweis
bw	CCGCGGGACTTGGGGTGGGCGTGTGAAGAT- GCTC	Siehe Hinweis
L334P fw	CTTTGCCCCAGCCAGCACCCTTCTAT- GAGCTCC	Siehe Hinweis
bw	GGAGCTCATAG- GAAGTGGTGCTGGCTGGGGCAAAG	Siehe Hinweis
M337R + L334P fw	CCAGCACCACTTCTAGGAGCTCCAACACTTTC	Siehe Hinweis
bw	GAAAGTGTTGGAGCTCCTAG- GAAGTGGTGCTGG	Siehe Hinweis
N404R fw	CCCTTGCCACTTCCAAGAAAACCTCGGCCCCC	Siehe Hinweis
bw	GGGGGCCGAGGTTTTCTTGGAAGTGGCAAGGG	Siehe Hinweis

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

2.11 Verwendete Konstrukte

Konstrukt	Einklonierte cDNA	Vektor	Restriktionsstellen / Herkunft
pAbes-Strep- Syk	Humanes Syk Wildtyp und S297A	pAbes-N- Strep	BamHI / XhoI
pMSCV-Citrin- Syk	Humanes Syk: Wildtyp, S44A, S44E, S202A, S202E, S44+202A, S44+202E, T256V, S295A, S297A, S306A, T317V, Y323F, S297A + Y323F, T371V, T530V	pMSCV- Puro-N-Citrin	BamHI / NotI
pMSCV-Citrin- SLP76	Humanes SLP76 wildtyp und SLP76*	pMSCV- Puro-N-Citrin	BamHI / NotI
pMSCV-Citrin- SLP65	Humanes SLP65	pMSCV- Puro-N-Citrin	Dr. T. Oellerich, Göttingen
pGex-14-3-3γ	Humanes 14-3-3γ	pGex	Dr. S. Beer-Hammer, Düsseldorf

Tabelle 4: Verwendete Konstrukte

2.12 Antikörper

Alle Antikörper wurden zur Westernblot-Analyse (WB) in TBS-T mit 5% BSA und 0,001% Azid in angegebener Konzentration eingesetzt.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
anti-humanes-Syk (4D10)	Maus	SCBT, Santa Cruz, Kalifornien	WB 1:1.000 ; IP: 2 µg/ml
anti-Hühner-SLP65	Kaninchen	T.Kurosaki	WB 1:2.000 ; IP: 1:1.000
anti-PLC-γ2 (Q20)	Kaninchen	SCBT, Santa Cruz, Kalifornien	WB 1:1.000 ; IP: 2 µg/ml
anti-GFP	Maus	Roche, Risch, Schweiz	WB 1:1.000 ; IP: 2 µg/ml
anti-14-3-3γ	Kaninchen	CST, Danvers, Massachusetts	WB 1:1.000
anti-14-3-3-phospho-Bindemotif	Kaninchen	CST, Danvers, Massachusetts	WB 1:1.000
anti-pTyr (4G10)	Maus	Biomol, Hamburg	WB 1:500
anti-GST	Kaninchen	Molecular Probes, Eugene, Oregon	WB 1:1.000
anti-Aktin	Kaninchen	Sigma, St. Louis, Missouri	WB 1:2.000
anti-Sek1	Kaninchen	CST, Danvers, Massachusetts	WB 1:1.000
anti-Coronin1c	Maus	SCBT, Santa Cruz, Kalifornien	WB 1:200
anti-Ubiquitin	Kaninchen	SCBT, Santa Cruz, Kalifornien	WB 1:200
anti-Cin85	Kaninchen	Sigma, St. Louis, Missouri	WB 1:1.000
F(ab') ₂ -Fragment anti-humanes-IgM	Ziege	Dianova, Hamburg	Stimulation von DG-75- und Ramos-Zellen mit 10 µg/ml
anti-Hühner-IgM (Klon M-4)	Maus	Biozol, Eching	Stimulation von DT40-Zellen mit 0,2 – 2 µg/ml
anti-Maus-IgG HRPO-gekoppelt	Ziege	Thermo, Waltham, Massachusetts	Sekundärer Antikörper, 1:10.000 in TBS-T
anti-Kaninchen-IgG HRPO-gekoppelt	Ziege	Thermo, Waltham, Massachusetts	Sekundärer Antikörper, 1:10.000 in TBS-T
F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus-IgM Cy-5-gekoppelt	Esel	Dianova, Hamburg	Bestimmung der Oberflächenexpression von IgM auf DT40-Zellen, 1:1.000

Isotypenkontrolle IgG ₁	Maus	BD, Franklin Lakes, New Jersey	Isotypenkontrolle bei Immunopräzipitationen mit anti-GFP: 2 µg/ml
Isotypenkontrolle IgG _{2A}	Maus	BD, Franklin Lakes, New Jersey	Isotypenkontrolle bei Immunopräzipitationen mit anti-Syk: 2 µg/ml
Isotypenkontrolle Kaninchen polyklonal	Kaninchen	CST, Danvers, Massachusetts	Isotypenkontrolle bei Immunopräzipitationen mit anti-SLP65 und anti-PLC-γ2: 1:10.000

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

2.13 Zelllinien

DT40 (ATCC CRL-2111)

Diese Hühner-B-Lymphozyten-Zelllinie ist durch die Infektion eines *Hyline SC* Huhns mit dem *avian leukosis virus* (ALV) und der Isolierung der Zellen aus einem bursalen Lymphom entstanden (Baba und Humphries 1984). DT40 exprimiert IgM auf der Oberfläche und eignet sich für die Etablierung von *knock-out* Zelllinien (Winding und Berchtold 2001). In dieser Arbeit wurden DT40-wildtyp-Zellen und DT40-Zellen, die entweder Syk oder SLP65 nicht exprimieren, als heterologes Expressionssystem verwendet.

DG-75 (ATCC CRL-2625)

Diese humane B-Lymphozyten-Zelllinie entstammt einem Burkitt-Lymphom, ist EBV-negativ und exprimiert auf der Zelloberfläche IgM (Ben-Bassat et al. 1977). Sie wurde in dieser Arbeit als heterologes Expressionssystem für Syk verwendet.

Ramos (ATCC CRL-1596)

Ramos ist eine weitere humane B-Lymphozyten-Zelllinie, die ebenfalls aus einem Burkitt-Lymphom entstammt, EBV-negativ ist und wiederum IgM auf der Zelloberfläche exprimiert (Klein et al. 1975). Sie wurde in dieser Arbeit für Immunopräzipitationsexperimente von Syk verwendet.

PlatE

Die adhärenzte Zelllinie PlatE basiert auf der Zelllinie HEK293T und wurde mit dem gag-pol- und env-Gen des murinen Leukämievirus MMLV transfiziert (Morita et al. 2000). In dieser Arbeit wurden sie als Helferzelllinie zur Produktion von Retroviren zur retroviralen Transfektion von DT40- und DG-75-Zellen verwendet.

Bakterienzelllinien

E.coli Stamm Top10F ⁻ (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien)	Vermehrung von Plasmid-DNA
E.coli Stamm BL21 (Novagen, Darmstadt)	Expression von GST-Fusionsproteinen

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von cDNA erfolgte nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), das erstmals 1986 von Mullis et al. beschrieben wurde. Die PCRs in dieser Arbeit wurden mit dem Phusion Kit von Finnzyme (Vantaa, Finnland) in dem PCR Mastercycler EP Gradient von Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Dabei wurden stets folgender Standard-PCR-Ansatz und folgendes Standardprotokoll gewählt:

Komponente	Konzentration / Menge
DNA-Vorlage	0,01 µg/µl
5'-Primer	0,5 µM
3'-Primer	0,5 µM
dNTPs	Je 200 µM
Puffer	1x
Phusion-DNA-Polymerase	0,015 U/µl
ddH ₂ O	Ansatz auf 20µl auffüllen

Tabelle 6: PCR-Standard-Ansatz

Funktion	Temperatur und Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C für 30 sec	1x
Denaturierung	98°C für 15 sec	32x
Primer-Anlagerung	Temperatur abhängig vom Primer (siehe 2.10, Seite 21 - 23) für 20 sec	
Polymerisation	72°C für 20 sec je kB des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes	
Abschließende Polymerisation	72°C für 10 min	1x

Tabelle 7: PCR-Standard-Protokoll

3.1.2 Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion

Außer zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten kann die PCR auch zur Mutagenese von einzelnen Basentriplets und daraus folgend zur Punktmutation von Proteinen eingesetzt werden. Dazu benötigt man einen zirkulären DNA-Vektor mit dem zu mutierenden DNA-Abschnitt. Die beiden Primer werden so gewählt, dass das zu mutierende Basentriplet von circa fünfzehn Basenpaaren flankiert wird. Das zu mutierende Basentriplet wird nicht komplementär zur Vorlage gewählt, sondern durch das ge-

wünschte Triplet ausgetauscht. Die flankierenden Basenpaare sorgen dafür, dass sich die Primer dennoch an die DNA anlagern. Die Primer sind dabei direkt komplementär zueinander. Da die Vorlage zur Amplifizierung als zirkuläre DNA vorliegt, wird sie von nur einem Bereich ausgehend komplett amplifiziert, der Bereich des Primers jedoch dabei mutiert. Für den Ansatz zur PCR wurde dabei der gleiche Standard wie oben beschrieben gewählt, jedoch wurde das Cycling-Protokoll angepasst:

Funktion	Temperatur und Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C für 30 sec	1x
Denaturierung	98°C für 15 sec	25x
Primer-Anlagerung	70°C für 30 sec	
Polymerisation	72°C für 15 sec je kB des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes	
Abschließende Polymerisation	72°C für 3 min	1x

Tabelle 8: Mutagenese-PCR-Protokoll

Nach der Mutagenese-PCR wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C mit 20 U des Restriktionsenzym DPNI inkubiert, das die Sequenz GATC schneidet, wenn Adenosin methyliert ist. Die Vorlage aus Bakterienzellen ist methyliert, die amplifizierte DNA jedoch nicht, so dass bei dem Verdau nur die mutierte DNA übrig bleibt. Die resultierende DNA wurde in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.1.8, S.31), ein PCR-Ansatz ohne Phusion-DNA-Polymerase diente als Negativkontrolle.

3.1.3 *Overlab extension* PCR

Eine dritte Anwendungsmöglichkeit der PCR besteht in der Deletion von einzelnen Basenabschnitten der DNA mittels der *overlab extension* PCR, die zur Klonierung der DNA von Syk-B, der kürzeren Isoform von Syk, verwendet wurde. Dabei wird in einer ersten PCR die DNA 5' und 3' des zu deletierenden Bereiches amplifiziert. Die Primer, die an dem zu deletierenden Bereich ansetzen, enthalten dabei auch eine Sequenz, die komplementär zur DNA auf der anderen Seite des zu deletierenden Bereiches liegt, so dass der Primer also diesen Bereich überspannt.

Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm erfolgte dabei wie oben angegeben. Die DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (siehe 3.1.4 und 3.1.5) und eine zweite PCR wurde angeschlossen. Dabei wurden Primer, die den gesamten DNA-Abschnitt umspannen und beide zuvor amplifizierten DNA-Fragmente hinzugegeben. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm erfolgten danach wie in 3.1.1 beschrieben. Die beiden zuvor amplifizierten DNA-

Fragmente lagerten sich so im mittleren Bereich zusammen, so dass nun ein DNA-Fragment entsteht, das der Vorlage entspricht, jedoch nicht den Bereich, den die Primer der ersten PCR überspannt haben, enthält.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenaufteilung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurde 1% Agarose in TAE-Puffer gegeben und in einer Mikrowelle aufgekocht, der Lösung wurde 0,01% Ethidium-Bromid zugesetzt und in eine Form zum Abkühlen und Erstarren gegeben. In freigelassene Beladungstaschen wurde die aufzutrennende DNA vermischt mit DNA-Laufpuffer und ein DNA-Größenstandard pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einer mit TAE gefüllten Gelkammer bei 150 V angelegter Spannung. Das zugegebene Ethidiumbromid interkalierte in die aufgetrennte Doppelstrang-DNA, so dass diese mittels UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden konnte.

3.1.5 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Weiterverwendung der mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden die entsprechenden Bereiche des Agarose-Gels ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel mittels des Wizard® SV Clean-Up Kits von Promega, Madison, Wisconsin nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Die DNA wurde in ddH₂O eluiert und bei -20°C gelagert beziehungsweise weiterverarbeitet.

3.1.6 Klonierung von PCR-Produkten in den pCRII-TOPO-Vektor

Zur Sicherung von PCR-Produkten wurden diese zunächst mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert, aus dem Gel extrahiert und anschließend in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Dazu wurde die extrahierte DNA in 17 µl ddH₂O eluiert und zunächst mit 2 µl Taq-Puffer, 1 µl dNTPs (Zielkonzentration je 500 µM) und 1 U Taq-DNA-Polymerase für 30 min bei 72°C inkubiert. Die Taq-DNA-Polymerase fügt an die 3'-Enden der PCR-Produkte ein zusätzliches Adenosin an. Diese A-Überhänge können dann für die Klonierung in den pCRII-TOPO-Vektor verwendet werden, da dieser an der Insertionsstelle für das zu klonierende DNA-Fragment, die von einer Topoisomerase offengehalten wird, T-Überhänge an den 5'-Enden hat. Für die Klonierung wurde das TOPO® TA Cloning® Kit verwendet. 5,5 µl des DNA-Fragmentes mit A-Überhängen wurde mit 1 µl Salzlösung (Bestandteil des Kits) und 0,5 µl des pCRII-

TOPO-Vektors für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.1.8).

3.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien erfolgte modifiziert nach Hanahan (1983). Dazu wurden diese in 150 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer photometrischen Dichte von OD_{600} 0,45 – 0,55 kultiviert und anschließend für 10 min bei 4°C und 2.000 g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml TFB-I-Puffer aufgelöst und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 6ml eiskaltem TFB-II-Puffer aufgelöst, jeweils 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.8 Transformation von kompetenten Bakterien

100 µl chemisch kompetente E.coli-Top10F⁻-Bakterien wurden mit 10 – 50 ng DNA für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec ausgesetzt, bevor sie für weitere 2 min auf Eis und anschließend mit 800 µl LB-Medium für 30 min bei 37°C und 400 rpm in einem Thermomixer inkubiert wurden. Nach Zentrifugation für 2 min bei 5.000 g wurde das Bakterienpellet in 200 µl LB-Amp- oder LB-Kan-Medium aufgelöst und auf vorgewärmte Bakterienplatten ausgestrichen. Die Bakterienplatten bestanden aus LB-Amp- oder LB-Kan-Medium mit 2% Agar und wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei der Transformation von pCRII-TOPO-Vektoren wurden die Bakterienplatten zusätzlich mit 40 µl X-gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) versetzt. Kommt es zur Ligation des Vektors ohne inseriertes DNA-Fragment, kann auf dem Vektor das Gen für eine Galaktosidase unter IPTG-Stimulation abgelesen werden, welches X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Letzteres sorgt dafür, dass sich die Kolonie von Bakterien blau verfärbt. Wird das zu klonierende DNA-Fragment jedoch in den pCRII-TOPO-Vektor integriert, kann keine Galaktosidase mehr exprimiert werden und die Bakterienkolonie bleibt weiß, so dass zwischen Bakterienklonen mit und ohne kloniertes DNA-Fragment unterschieden werden konnte.

3.1.9 Kulturbedingungen der Bakterien

Einzelne transformierte Bakterienkolonien einer Bakterienplatte wurden in 5 ml LB-Amp oder LB-Kan überführt und in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 300 rpm

über Nacht vermehrt. Zur weiteren Vermehrung des Bakterienklons wurde 1 ml dieser Übernachtskultur in 150 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und erneut über Nacht bei 37°C und 300 rpm inkubiert.

3.1.10 Präparation von Plasmiden

Die Präparation der Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienklonen wurde aus 4 ml beziehungsweise 150 ml einer Übernachtskultur mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep Kit beziehungsweise zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep Kit (beide von Promega, Madison, Wisconsin) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und die DNA in ddH₂O eluiert.

3.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA wurde mit einem Photometer von Eppendorf, Hamburg die Absorption bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Dabei entspricht bei einer Küvette mit 10 mm Schichtdicke eine OD₂₆₀ von 1 in etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml H₂O.

3.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung zur Kontrolle von klonierten und mutierten DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977) durch die Firmen MWG (Ebersberg), StarSEQ (Mainz) und SeqLab (Göttingen).

3.1.13 Restriktionsverdau

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen gespalten, um DNA-Fragmente aus einem Vektor zur weiteren Verwendung herauszuschneiden oder um klonierte Konstrukte zu kontrollieren. Die Restriktion erfolgte dabei in 15 µl Ansätzen mit ein oder zwei Restriktionsenzymen von NEB (Ipswich, Massachusetts) nach Angaben des Herstellers. Die Restriktionsansätze wurden für 1 – 2 h bei 37°C inkubiert, die verdauten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gegebenenfalls wurden aus dem Gel einzelne Fragmente zur Weiterverwendung isoliert.

3.1.14 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren, die mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und nach Agarose-Gelelektrophorese isoliert wurden, erfolgte mit 0,5 µl der T4 DNA-Ligase in 10 µl Reaktionsansätzen über Nacht bei 15°C. Der Vek-

tor wurde vor der Ligation für 30 min mit 10 U einer 5' DNA-Phosphatase (CIP von NEB, Ipswich, Massachusetts) bei 37°C inkubiert, um die Selbstligation des Vektors zu vermeiden. Der Ligationsansatz wurde in kompetente E.coli-Bakterien transformiert, die DNA aus den Bakterienklonen isoliert und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert.

3.1.15 Linearisierung und Ethanol-fällung von Vektoren

Die Linearisierung von zirkulärer Plasmid-DNA zur Elektroporation von eukaryoten Zellen erfolgte in einem Restriktionsansatz mit 350 µl Volumen mit 30 – 40 µg DNA und dem Restriktionsenzym PVUI (NEB, Ipswich, Massachusetts) nach Herstellerangaben über Nacht bei 37°C. Zur Isolierung von linearisierten DNA-Vektoren wurde dem Restriktionsansatz ein Zehntel seines Volumens 5 M NaCl-Lösung und danach das 2,5-fache Volumen an eiskaltem 100% Ethanol zugefügt und danach für 30 min bei -80°C belassen. Die Proben wurden dann bei RT für 10 min mit 16.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet für 15 min bei RT getrocknet und dann in 700 µl PBS-Puffer aufgelöst.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kulturbedingungen

Alle verwendeten nicht-adhären Zellen wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium für die Hühnerzelllinie DT40 enthielt außerdem 1% hitzeinaktiviertes CS. Je nach Teilungsrate und Dichte der Zellen wurden alle ein bis zwei Tage ein Teil der Zellen verworfen und die restlichen Zellen mit neuem Medium verdünnt.

Die Zentrifugation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, für 4 min bei 300 g und RT. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Zellzahl in einer geeignet verdünnten Probe mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.2 Kultivierung von adhären Zellen

Die adhären Zelle PlatE wurde in DMEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und unter Selektionsdruck durch 10

$\mu\text{g/ml}$ Blasticidin und $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zur Verdünnung oder Expansion der Zellen auf weitere Zellkulturschalen wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 2 min bei 37°C inkubiert, so dass sich die adhärennten Zellen lösten. Das Trypsin wurde mittels DMEM-Medium inaktiviert und die Zellen anschließend abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen und gegebenenfalls verdünnt oder auf mehrere Zellkulturschalen expandiert.

3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur längeren Einlagerung wurden circa 1×10^7 Zellen abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml hitzeinaktiviertem FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in Kryo-Röhrchen überführt und bei -140°C eingefroren. Zur erneuten Verwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml des entsprechenden Mediums verdünnt, abzentrifugiert und anschließend in frischem Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen gebracht.

3.2.4 Transfektion durch Elektroporation

Die Elektroporation von DT40- und DG-75-Zellen erfolgte nach Dower et al. (1988). Dazu wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen abzentrifugiert und einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in PBS, das $30 - 40 \mu\text{g}$ des zuvor linearisierten und durch Ethanol-fällung isolierten Transfektionsvektors enthielt, aufgelöst und für 10 min in einer Elektroporationsküvette auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit dem Elektroporationssystem GenePulser von Biorad, München mit 250 V Spannung bei $960 \mu\text{F}$. Die Zellen wurden danach in 12 ml vorgewärmten DT40- beziehungsweise DG-75-Medium aufgenommen und über Nacht kultiviert, bevor weitere 28 ml Medium und zur Selektion der transfizierten Zellklone Puromycin mit einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ zugefügt und die Zellen auf zwei 96-Kammer-Platten aufgeteilt wurden. Nach circa 10 Tagen waren die transfizierten Zellklone sichtbar und konnten auf separate Zellkulturplatten überführt werden. Mittels Westernblot-Analyse (siehe 3.3.3, Seite 40) wurden die Klone auf ihre Expression hin untersucht. Drei Klone wurden ausgewählt und vermischt, um klonale Besonderheiten der Einzelklone (klonale Effekte) zu vermeiden.

3.2.5 Retrovirale Transfektion

Die Retroviren für die Transfektion von DT40- und DG-75-Zellen wurden mit Hilfe der Zelllinie PlatE nach Morita et al. (2000) hergestellt. Dazu wurden die PlatE-Zellen einen Tag vor der Transfektion auf 6 cm Zellkulturplatten aufgeteilt, so dass sie bei der Transfektion eine Dichte von 50 – 70% erreicht haben. Zur Transfektion der PlatE-Zellen wurden nacheinander 200 µl RPMI-Medium, 7,5 µl FuGENE (Roche, Risch, Schweiz), 1,9 µg des retroviralen Expressionsvektors pMSCVpuro und 0,7 µg von phCMV-VSV-G vermischt und für 30 min bei RT inkubiert. Ohne phCMV-VSV-G könnten die resultierenden Retroviren nur Zellen muriner Herkunft infizieren, phCMV-VSV-G sorgt für eine Pseudotypisierung. Das PlatE Medium wurde abgesaugt und 4 ml frisches DT40- beziehungsweise DG-75-Medium auf die PlatE-Zellen gegeben, bevor der Transfektionsansatz tropfenweise dazugegeben wurde. Die PlatE-Zellen wurden dann für 48 h unter Standard-Zellkultur-Bedingungen inkubiert und gaben in dieser Zeit die Retroviren in den Überstand ab. Dieser Überstand wurde dann zur Transfektion der DT40- beziehungsweise DG-75-Zellen verwendet und dafür zunächst steril in eine neue 6 cm Zellkulturschale durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. 1×10^6 der zu transfizierenden Zellen wurden zentrifugiert und das Zellpellet in 1,5 ml frischem Medium aufgenommen und zu den Retroviren gegeben. Zusätzlich wurde Polybrene mit einer Zielkonzentration von 3 µg/ml hinzugefügt und die Zellen für 24 h unter Standard-Zellkultur-Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut zentrifugiert, in 5 ml frischem Medium aufgenommen und für weitere 24 h inkubiert, bevor 1 µg/ml Puromycin zur Selektion der transfizierten Zellen hinzugegeben wurde. Alle beschriebenen Arbeitsschritte mit pseudotypisierten Retroviren wurden nach den S2-Sicherheits- und Arbeitsvorschriften vorgenommen. Die retrovirale Transfektion von Zellen hat den Vorteil, dass dabei keine Zellklone entstehen, sondern stets eine Vielzahl von Zellen transfiziert wird. Klonale Effekte werden somit ausgeschlossen.

3.2.6 Analyse der Citrin-Expression

Zur Messung der Transfektionseffizienz von Citrin- oder GFP-gekoppelten Konstrukten wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, einmal mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde der Farbstoff in den Zellen im Durchflusszytometers FACS-Calibur (BD, Franklin Lakes, New Jersey) mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission bei

500 – 560 nm detektiert. Als Kontrolle dienten untransfizierte DT40- oder DG-75-Zellen. Die erzeugten Daten wurden mittels des Programms FlowJo (Tristar) ausgewertet.

3.2.7 Analyse der Oberflächenexpression von IgM

Zur Analyse der IgM-Expression nach BZR-Stimulus auf der Zelloberfläche von DT40-Zellen wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 400 μ l RPMI ohne Zusätze aufgenommen und mit 2 μ g/ml des anti-IgM-Antikörpers M4, ein muriner IgM-Antikörper, für gewünschte Stimulationszeiten bei 37°C inkubiert und 30 sec vor Ende der Stimulationszeit für 10 min auf Eis abgekühlt, um die Stimulation zu stoppen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, einmal mit 1 ml PBS gewaschen in 500 μ l PBS aufgenommen und mit 0,5 μ l anti-Maus-IgM gekoppelt an den Farbstoff Cy-5 für 10 min auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 1 ml PBS gewaschen und nach Zentrifugation in 500 μ l PBS aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurde der Farbstoff Cy-5 mit einem Laser mit 646 nm Wellenlänge angeregt und die Emission bei 664 nm gemessen. Als Kontrolle dienten DT40-Zellen, die nicht mit Anti-IgM, aber mit Cy-5 inkubiert wurden. Die Daten wurden mittels des Programms FlowJo (Tristar) ausgewertet.

3.2.8 Analyse des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms

Zur Bestimmung des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms wurden 1×10^6 DT40- oder DG-75-Zellen abzentrifugiert und das Pellet in RPMI mit 5% FCS aufgenommen. Zu den Zellen wurde der kalziumabhängige Farbstoff Indo-1-AM mit einer Zielkonzentration von 1 μ M und das Detergens Pluronic F-127 mit einer Zielkonzentration von 0,015% gegeben. Indo-1-AM ist ein ungeladenes Molekül, das die Zellmembran überwinden kann. Intrazellulär wird über unspezifische zytoplasmatische Esterasen eine Esterbindung gespalten und das resultierende geladene Indo-1 verbleibt intrazellulär. Die Zellen wurden bei 30°C und 500 rpm für 25 min in einem Thermocycler inkubiert, bevor 700 μ l RPMI mit 10% FCS zu den Zellen gegeben wurde und die Zellen für weitere 10 min bei 37°C und 500 rpm inkubierten. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und nach Zentrifugation in 700 μ l Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl_2 aufgenommen.

Der BZR-abhängige Kalziumionen-Einstrom wurde an dem Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD, Franklin Lakes, New Jersey) bei RT gemessen. Dafür wurde nach Anregung des Farbstoffs mit einem Laser mit 350 nm Wellenlänge das Verhältnis der Emission von blauem Indo (ohne Kalzium) bei 530 nm zu violetterem Indo (mit Kalzium) bei 405 nm gemessen. Nach Messung des Verhältnisses im unstimulierten Zustand wurden nach 25 sec die DT40-Zellen mit 0,2 - 2 µg/ml Anti-Huhn-IgM (M4) und DG-75-Zellen mit 10 µg/ml F(ab')₂-anti-Human-IgM stimuliert und das Verhältnis 405/530 nm Emission für weitere 3 – 30 min gemessen.

Zur getrennten Betrachtung des Kalziumionen-Einstroms ins Zytosol aus intrazellulären Speichern und aus dem Extrazellulärraum wurde eine *add-back* Messung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen vor der Messung in Krebs-Ringer-Lösung mit 0,5 mM EGTA aufgenommen, um extrazelluläre Kalziumionen zu chelatieren. Nach Stimulation der Zellen und Messung des Kalziumionenflusses aus intrazellulären Speichern wurde nach 5 min Messzeit 1 mM CaCl₂ zu den Zellen gegeben, das nun als extrazelluläres Kalzium in die Zelle strömte und gemessen werden konnte.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo und nach Export der Daten mit Microsoft Excel. Die Beladung der Zellen und die Messung am Durchflusszytometer erfolgte nach einem Protokoll von Dr. Michael Engelke (Engelke et al. 2002).

3.2.9 Stimulation von Zellen

Die zu stimulierenden Zellen wurden abzentrifugiert, in RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und bei mehreren Zelllinien gegebenenfalls angepasst. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und pro Stimulationszeitpunkt in 1 ml RPMI ohne Zusätze aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert, um Einflüsse durch FCS zu minimieren. Für die Stimulation durch den BZR wurden 2 µg/ml Anti-Huhn-IgM (DT40) oder 10 µg/ml F(ab')₂-anti-Human-IgM (DG-75 oder Ramos) hinzugegeben und bis 30 sec vor der gewollten Stimulationszeit bei 37°C inkubiert und dann für 10 min auf Eis abgekühlt, um die Stimulation zu stoppen.

3.2.10 Zelllyse

Zur Lyse von Zellen wurden diese für 4 min bei 4°C und 450 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, circa 20 µl Lysepuffer pro 1x10⁶ Zellen hinzugefügt und für 10 min bei 4°C inkubiert, bevor das Lysat für 10 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert

wurde. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und als geklärtes zelluläres Lysat (CCL) je nach Verwendungszweck entweder mit 1/3 des bestehenden Volumens an 4x Laemmli Puffer für 5 min bei 95°C erhitzt oder weiterverwendet für Immuno- oder Affinitätspräzipitationen (siehe 3.3.6 und 3.3.7, Seite 42 – 43).

3.2.11 Konfokale Laser-Mikroskopie von lebenden Zellen

Die Analyse von DT40- und DG-75-Zellen mittels der konfokalen Laser-Mikroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. M. Engelke.

Um die Lokalisation von Citrin-Syk in DT40- und DG-75-Zellen und von Citrin-SLP76 in DT40-Zellen nach BZR-Stimulation zu bestimmen, wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen mit 1 ml Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und nach Zentrifugation in 200 µl Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl_2 aufgenommen und in einen 4-Kammer-Objektträger gegeben. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 37°C gelagert. Am konfokalen Laser-Mikroskop wurde Citrin mit 514 nm angeregt und die Emission wurde bei 530 – 600 nm detektiert. DT40-Zellen wurden mit 2 µg/ml anti-Huhn-IgM (M4) und DG-75-Zellen mit 10 µg/ml F(ab')_2 -anti-Human-IgM stimuliert und die Lokalisation von Citrin-Syk beziehungsweise Citrin-SLP76 alle 2 min fotografiert.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ. Dafür wurde die Ratio der Farbintensität eines zwei Pixel breiten Rings im Bereich der Zellmembran zur Farbintensität im intrazellulären Bereich bei 30 – 50 Zellen pro Stimulationszeitpunkt gebildet, der Mittelwert errechnet und auf den unstimulierten Zustand der Zelle normiert. Der p-Wert wurde durch Excel mit dem Student-T-Test bestimmt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach der Proteingröße mittels SDS-PAGE wurden die Proben durch Erhitzen auf 95°C für 5 min in Laemmli-Puffer denaturiert und anschließend in die Kammern eines Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gels überführt (Laemmli 1970). Der obere Teil des Gels (Sammelgel) enthielt 4,8% Polyacrylamid und wurde zur Konzentrierung der Probe am Übergang zum unteren Teil des Gels mit 10% Polyacrylamid (Trenngel) verwendet. Für die Elektrophorese wurde in vertikalen Gelkammern (Biorad, München) ein Strom von 10 mA für 30 min zum Sammeln der Probe und für weitere 75 min von 25 mA zum Auftrennen angelegt. Als Größenvergleich wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (7 – 175 kDa, Invit-

rogen, Carlsbad, Kalifornien) verwendet. Die Gele mit den aufgetrennten Proteinen wurden entweder mittels Coomassie gefärbt oder einer Westernblot-Analyse zugeführt.

3.3.2 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung von SDS-PAGE-Gele mit Coomassie wurden diese über Nacht mit 10 ml Coomassie Blue R250 (Roth, Karlsruhe) bei RT inkubiert und anschließend wurde durch Waschen mit Wasser überschüssige Coomassie-Lösung entfernt und das gefärbte Gel fotografiert.

3.3.3 Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse von Proteingemischen wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen in *semi dry* Blot-Kammern von Hoefer, Holliston, Massachusetts übertragen. Dafür wurde eine mit Transferpuffer getränkte Filtermembran auf die Anode gelegt und darauf nacheinander die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und eine weitere Filtermembran mit Transferpuffer geschichtet. Die Kathode wurde auf den beschriebenen Stapel gedrückt und ein Strom von 200 mA und 16 V für 1 h angelegt. Nach dem Proteintransfer wurde die Zellulosemembran für 1 h mit Block-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Proteine zu blockieren, bevor die Membran über Nacht bei 4°C mit einem primären Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T für je 5 min wurde sie mit einem sekundären, an Meerschweinchen-Peroxidase (HRPO) gekoppelten und gegen den primären Antikörper gerichteten Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde weitere drei Mal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen, bevor sie mit ECL-Lösung inkubiert wurde. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase führte bei Inkubation mit ECL zu einer lichtemittierenden Reaktion, die über das Chemi Lux Imager System von Intas (Göttingen) bei einer Beleuchtungszeit von 0,5 – 10 min digital fotografiert wurde. Die densitometrische Auswertung der Western-Blot Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ.

Sollte auf der gleichen Zellulosemembran ein zweites Protein detektiert werden, so wurde die Peroxidase des sekundären Antikörpers durch Inkubation mit 0,01% NaN_3 in TBS-T für 1 h inaktiviert. Die erneute Detektion eines Proteins in der Membran verlief wie bereits beschrieben.

3.3.4 Expression und Isolation von GST-Proteinen

Die Expression von 14-3-3 γ -GST-Fusionsproteinen erfolgte nach Transformation der cDNA von 14-3-3 γ in dem Vektor pGEX, die freundlicherweise von S. Beer-Hammer, Düsseldorf bereitgestellt wurde, in den E.coli-Expressionsstamm BL21. Die resultierenden Klone wurden in eine 5 ml Übernachtskultur überführt und diese mit weiteren 45 ml LB-Amp-Medium bis zu einer photometrischen Bakteriendichte von OD₆₀₀ von circa 0,8 bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die Expression des GST-Fusionsproteins stand unter Kontrolle des tac-Promotors, der über 0,1 mM des Laktose-Analogen IPTG aktiviert wurde. Für die Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurde stündlich 1 ml der Probe abgenommen, 50 μ l direkt mit 15 μ l 4x Laemmli für 5 min auf 95°C erhitzt, der Rest für 5 min bei 4.800 g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Bakterienlysepuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden mittels Ultraschall für 30 sec lysiert, bevor zur zusätzlichen Lyse Triton-X100 mit einer Zielkonzentration von 1% hinzugegeben wurde. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben für 20 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert, der Überstand überführt und für 30 min mit 20 μ l Glutathion-Sepharose, das an GST bindet, bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Proben wurden zwei Mal mit Bakterienlysepuffer und 1% Triton-X100 gewaschen und für 3 min bei 400 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet nach erneuter Zentrifugation in 25 μ l 4x Laemmli für 5 min auf 95°C erhitzt. Durch SDS-PAGE und Färbung des Gels mit Coomassie-Lösung konnte eine optimale Expressionsdauer von drei Stunden ermittelt werden (siehe Abb. 21, Seite 62).

Für die tatsächliche Expression wurden 50 ml einer mit dem Vektor für 14-3-3 γ -GST transformierten Bakterienkultur mit einer photometrischen Dichte von OD₆₀₀ von circa 0,8 für 3 h mit 0,1 mM IPTG inkubiert. Die Bakterien wurden für 15 min bei 3.000 g abzentrifugiert und in 20 ml Bakterienlysepuffer aufgenommen, sechs Mal für 30 sec mit Ultraschall lysiert und anschließend mit 1% Triton-X100 für 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden für 20 min bei 4°C und 6.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Glutathion-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zwei Mal mit 5 ml Lysepuffer und 1% Triton-X100 gewaschen und für 3 min bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer, der 14-3-3 γ -GST von den Bindestellen der Glutathion-Sepharose verdrängt, für 30 min bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und der Überstand für die Far-

Westernblot-Analyse verwendet oder zum Konzentrationsvergleich mit GST und einer BSA-Verdünnungsreihe mit 4x Laemmli für 5 min auf 95°C erhitzt und einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung zugeführt.

3.3.5 Far-Westernblot

Das aufgereinigte 14-3-3 γ -GST-Fusionsprotein wurde zur Far-Westernblot-Analyse der Bindung von 14-3-3 γ an Syk eingesetzt. Dafür wurde Citrin-Syk wt und S297A aus stimulierten und unstimulierten DT40-Zellen, wie in 3.3.6 beschrieben, mit einem Antikörper gegen Citrin immunopräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Westernblot-Membran übertragen. Als Kontrolle der IP dienten unspezifische Antikörper des gleichen Isotyps. Die Membran wurde zum Blocken für 30 min mit 2% BSA in PBS-T bei RT inkubiert und dann mit 1 μ g/ml 14-3-3 γ -GST-Fusionsprotein oder GST-allein in 10 ml PBS-T mit 2% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurden 3 mal für 10 min mit PBS-T gewaschen, für 1 h bei 4°C mit anti-GST-Antikörper (Molecular Probes, Eugene, Oregon, 1:1.000 in 2% BSA / PBS-T) inkubiert, erneut drei Mal für 10 min mit PBS-T gewaschen, für 1 h bei 4°C mit sekundären Antikörper inkubiert und anschließend wie in 3.3.3 beschrieben mit ECL entwickelt.

3.3.6 Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation von Proteinen wurden 2×10^7 unstimulierte oder stimulierte Zellen lysiert und das resultierende geklärte zelluläre Lysat über Nacht mit 2 μ g/ml des Präzipitations-Antikörper und danach für 1 h mit 20 μ l Protein-A/G-Agarose (SCBT, Santa Cruz, Kalifornien) bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Als Kontrolle dienten unspezifische, isotypengleiche Antikörper. Die Proben wurden drei Mal für 3 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und das resultierende Pellet jeweils mit 1ml Lysepuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proben für das *in vitro* Kinase-Experiment (siehe 3.3.9) verwendet oder mit 15 μ l 4x Laemmli Puffer für 5 min bei 95°C erhitzt und einer Westernblot-Analyse zugeführt.

3.3.7 Affinitätspräzipitation mittels Streptaktin-Matrix

Zur Affinitätspräzipitation von STrEP-Tag gekoppeltem Syk aus DT40- oder DG-75-Zellen wurden 3×10^8 Zellen abzentrifugiert, mit 25 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 10 ml RPMI ohne Zusätze für 15 min bei 37°C inkubiert, bevor sie mit 2 μ g/ml (DT40) beziehungsweise 10 μ g/ml (DG-75) anti-IgM stimuliert

wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 5 ml Lysepuffer für 10 min bei 4°C auf einem Roller lysiert und anschließend für 15 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Das geklärte zelluläre Lysat wurde in eine Affinitätspräzipitations-säule (Thermo, Waltham, Massachusetts) überführt und mit 200 µl Strep-Taktin-Matrix für 1 h bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Proben wurden anschließend über die Säule fünf Mal mit 1 ml Lysepuffer und einmal mit 50 µl Elutionspuffer (Desthiobiotin) gewaschen. Die Strep-gekoppelten Proteine und ihre Bindepartner wurden mit 500 µl Elutionspuffer eluiert und mittels Ultrazentrifugationsröhrchen bei 10.000 g und 15°C für circa 15 min auf ein Zielvolumen von 50 µl eingedickt bevor sie mit 18 µl LDS und 7 µl Redox-Agens bei 72°C für 10 min erhitzt wurden. Die Aufreinigung von Strep-gekoppeltem Syk erfolgte nach einem von Dr. Thomas Oellerich etablierten Protokoll (Oellerich et al. 2009).

3.3.8 Bradford-Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in mittels Streptaktin-Matrix aufgereinigten Proben wurde benötigt, um diese für SILAC-Experimente in einer 1:1 Ration zu vermischen. Dazu wurden die Proben nach Bradford (1976) mit Coomassie Färbelösung gefärbt und die Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt und diese durch das Photometer in die Proteinkonzentration umgerechnet.

3.3.9 *In-vitro*-Kinase-Experiment

Zur Bestimmung der Syk-Kinase-Aktivität wurde Syk mittels eines Antikörpers gegen Citrin aus DT40-Zellen, die entweder wildtyp Syk (als Negativkontrolle) oder Citrin-Syk wt oder S297A exprimieren und für 5 min stimuliert wurden, wie beschrieben immunopräzipitiert. Die Protein-A/G-Sepharose wurde dabei zwei Mal mit Lysepuffer und zwei Mal mit Kinasepuffer gewaschen und schließlich in 25 µl Kinasepuffer aufgenommen. Dem immunopräzipitiertem Syk wurde 25 µl ATP-Substrat-Lösungen zugesetzt und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur oder auf Eis (Negativkontrolle) inkubiert und dabei alle 5 min gevortext, bevor 50 µl Stopp-Puffer zugegeben und die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt wurden. Als Substrat diente ein Biotin-gekoppeltes Peptid, das von Syk phosphoryliert werden kann. Je 50 µl der Probe wurden in 4x Laemmli aufgekocht und zur Kontrolle der präzipitierten Menge an Syk einer Westernblot-Analyse mit anti-GFP-Antikörper zugeführt. Die restlichen 50 µl wurden mit 50 µl ddH₂O vermischt, in eine Kammer einer Streptavidin beschichteten

ELISA-Platte gegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Dadurch wurde das Biotin-gekoppelte phosphorylierte Substrat an die ELISA-Platten gekoppelt. Die ELISA-Platte wurde drei Mal mit 200 µl PBS-T je Kammer gewaschen und dann mit 1 µg/ml Anti-Phosphotyrosin in 150 µl PBS-T mit 1% BSA je Kammer für 90 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Kammern mit je 200 µl PBS-T wurden die Proben mit sekundärem Antikörper mit einer Verdünnung von 1:500 in 100 µl PBS-T mit 1% BSA für 30 min bei RT inkubiert und die Kammern anschließend erneut fünf Mal mit je 200 µl PBS-T gewaschen.

Zur Bestimmung der Phosphorylierung der Syk-Substrate und damit zur Bestimmung der Kinase-Aktivität von Syk wurde den Proben 100 µl ABTS Lösung zugesetzt, wodurch eine peroxidaseabhängige Farbstoffreaktion gestartet wurde. Die Absorption wurde in einem ELISA-Auslesegerät nach 1 min bei 405 nm gemessen und der Mittelwert sowie der p-Wert mit dem Students-T-Test in Excel bestimmt.

Die Bestimmung der Kinase-Aktivität von Syk *in vitro* erfolgte nach einem von Dr. Marion Lösing etablierten Protokoll.

3.4 Massenspektrometrische Methoden

Alle massenspektrometrischen Analysen von aufgereinigten Proteinen sind in Kooperation mit der „Bioanalytical Mass Spectrometry“ Gruppe am MPI für Biophysikalische Chemie (Göttingen) unter Leitung von Prof. Dr. Henning Urlaub entstanden.

3.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und *In-Gel*-Verdau von Proteinen

Die durch Affinitätspräzipitation mit Streptaktin-Matrix aufgereinigten Proteine aus DT40- oder DG-75-B-Zellen wurden zunächst mittels eindimensionaler PAGE (1D-PAGE) in einem 4 – 12%-haltigem Polyacrylamid-Gradienten-Gel (NuPAGE Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) aufgetrennt und das Gel über Nacht mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die entsprechende Spalte des Gels wurde ausgeschnitten und in 23 Teile zerschnitten. Jedes Teil wurde mit 10 mM DTT für 55 min bei 56°C reduziert, anschließend mit 55 mM IAA für 20 min bei 26°C alkyliert und schließlich über Nacht bei 37°C mit modifiziertem Trypsin (Promega, Madison, Wisconsin) verdaut. Trypsin spaltet Proteine C-terminal von Arginin und Lysin, so dass jedes Peptid eine positive Ladung am C-Terminus hatte.

3.4.2 Anreicherung von phosphorylierten Peptiden

Eine Schwierigkeit bei der Identifikation von Phosphorylierungsstellen besteht in der geringen Menge von phosphorylierten im Vergleich zu unphosphorylierten Peptiden, so dass vor der eigentlichen Messung zusätzliche Anreicherungsschritte erfolgen müssen (Zhao und Jensen 2009). Die Anreicherung von Phosphopeptiden aus den verdauten Gel-Fragmenten erfolgte nach einem Protokoll von Larsen et al. (2005) über TiO₂ Chromatographie (GL Sciences Inc). Dafür wurden die verdauten Peptide in 20 µl 80% Acetonitril und 5% Trifluoressigsäure mit 200 mg 2,5-Dihydroxybenzoesäure aufgelöst und auf TiO₂-Säulchen geladen, drei Mal mit 20 µl der angegebenen Lösung und fünf Mal mit 20 µl 80% Acetonitril und 5% Trifluoressigsäure gewaschen. Danach wurde die Säule drei Mal mit 20 µl NH₄OH (pH 10,5) inkubiert, die gebundenen Phosphopeptide damit eluiert.

3.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die aus dem Trypsinverdau stammenden Peptide wurden, gegebenenfalls nach Anreicherung der Phosphopeptide, mittels Flüssigkeitschromatographie weiter aufgetrennt. Dafür wurden sie zunächst über eine C18-Vorsäule (1,5 cm, 360 µm äußerer und 150 µm innerer Durchmesser, Reprosil-Pur 120 Å, 5 µm, C18-AG, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen) mit einer Flussrate von 10 µl/min geleitet. Die gebundenen Peptide wurden eluiert und über eine C18-Kapillar-Säule (15 cm, 360 µm äußerer und 75 µm innerer Durchmesser, Reprosil-Pur 120 Å, 5 µm C18-AG, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen) mit einer Flussrate von 300 nl/min mit einem Gradienten von 7,5 – 37,5% Acetonitril in 0,1% Methansäure über 60 min mittels des Nano-flow-LC-Systems 1100 (Agilent, Santa Clara, Kalifornien) geleitet.

3.4.4 Massenspektrometrische Analyse

Die durch HPLC aufgetrennten Peptide wurden in einen LTQ-Orbitrap XL Hybrid Massenspektrometer (Thermo, Waltham, Massachusetts) überführt. Zur Elektrospray-Ionisierung (Fenn et al. 1989) der Peptide wurde eine Spannung von 1,8 kV bei einer Temperatur der Kapillare von 150°C angelegt. Das Massenspektrometer arbeitete im datenabhängigen Modus, so dass automatisch zwischen MS und MS/MS Modus gewechselt wurde. Nach der Bestimmung der Masse/Ladung der Peptide im MS-Modus wurden die fünf Ionen mit der höchsten Intensität isoliert und zur MS/MS-Messung der kollisionsinduzierten Dissoziations-Fragmentierung mit ei-

ner normalisierten Dissoziationsenergie von 37,5% zugeführt. Anschließend wurde erneut die Masse/Ladung der Fragmente bestimmt.

3.4.5 Auswertung der Daten mit MaxQuant und MsQuant

Die von dem Massenspektrometer gelieferten Rohdaten über die Peptide und deren Fragmente wurden zunächst mit der MASCOT-Suchmaschine zur Peptid- und Proteinidentifikation (Version 2.2.04, Matrix Science) den entsprechenden Proteinen zugeordnet. Der internationale Proteinindex *chicken* (Version 3.47) und *human* (Version 3.6) wurde als Sequenz Datenbank verwendet (Kersey et al. 2004). Die MS/MS-Peak-Listen wurden mit dem MASCOT-Server abgeglichen. Dabei wurde die Massentoleranz auf 7 ppm und die MS/MS-Toleranz auf 0,8 Da gesetzt. Als variable Modifikationen wurden oxidiertes Methionin und Cystein-Carbamidomethylierung angegeben. Bei der Phosphorylierungsanalyse wurden die Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierungs-Modifikationen hinzugefügt, so dass die phosphorylierten Peptide erkannt wurden. Außerdem wurden gegebenenfalls die Modifikationen, die durch mittelschwere oder schwere Arginine und Lysine hervorgerufen werden, angegeben, um SILAC Paare zu erkennen. Die minimale Peptidlänge wurde auf sechs Aminosäuren eingestellt.

Die weitere Auswertung der Daten der Interaktomanalyse erfolgte dann mit Hilfe der MaxQuant Software Version 1.0.12.31 (Cox et al. 2009), die Auswertung der Analyse der Phosphorylierungskinetik erfolgte mit dem Programm MsQuant Version 2.0b6 (Schulze und Mann 2004).

4. Ergebnisse

4.1 Expression von Strep-Syk in DT40- und DG-75-B-Lymphozyten

Für eine umfassende massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierung und der Proteininteraktionen von Syk in BZR-stimulierten B-Lymphozyten habe ich die DNA von humanem Syk in den pAbes-STrEP-Expressions-Vektor, der mir freundlicherweise von Dr. T. Oellerich zur Verfügung gestellt wurde, kloniert, so dass die DNA des „OneSTrEP-Tag“ (IBA, Göttingen) N-terminal an Syk gekoppelt wurde (im Folgenden als Strep-Syk bezeichnet). Mittels Elektroporation habe ich Syk-defiziente DT40-B-Zellen mit diesem Vektor rekonstituiert und zum Ausschluss von klonalen Effekten drei unabhängige Klone mit vergleichbarer Expression von Strep-Syk ausgewählt und vermischt.

Die Expression von humanem Syk in DT40 ist vergleichbar mit der Expression von Syk in der humanen B-Zelllinie Ramos (siehe Abb. 6) und die Aktivierung des BZR-Signalweges ist in den rekonstituierten DT40-B-Zellen vergleichbar zu DT40-wildtyp-Zellen, wie ich mittels Westernblot-Analyse und durchflusszytometrischer Bestimmung des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms zeigen konnte (siehe Abb. 7).

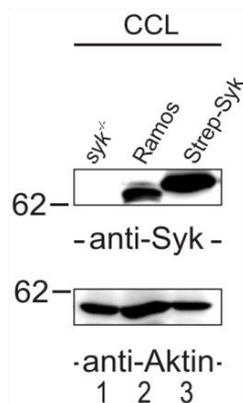


Abb. 6: Expression von Strep-Syk. Syk-defiziente DT40-B-Lymphozyten wurden mittels Elektroporation mit Konstrukten transfiziert, die für humanes Syk mit N-terminalem STrEP-Tag kodieren. Drei unabhängige Klone wurden ausgewählt und vermischt. Die gereinigten zellulären Lysate der untransfizierten Syk-defizienten DT40-Zellen (Reihe 1), der humanen B-Zelllinie Ramos (Reihe 2) und der Transfektanten (Reihe 3) wurden durch anti-Syk-Immunoblot auf ihre Expression von Syk hin untersucht. Als Ladekontrolle wurden die Lysate mit Antikörpern gegen Aktin analysiert. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben.

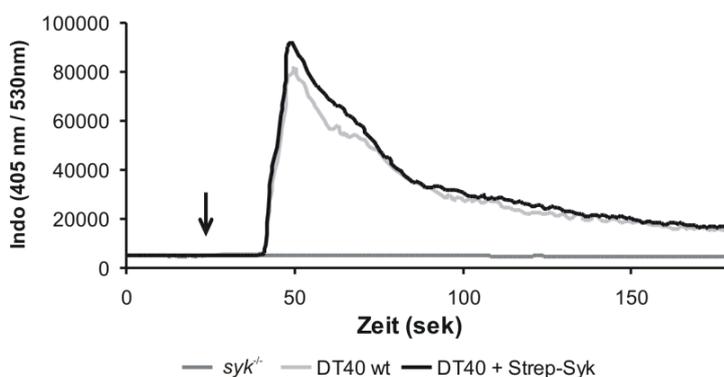


Abb. 7. Transfektion von Strep-Syk stellt den Kalziumionen-Einstrom in Syk-defizienten DT40-B-Zellen wieder her. Die in Abb. 6 beschriebenen Transfektanten wurden mittels Indo-1 und Durchflusszytometrie auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom untersucht. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Auch humane DG-75-B-Zellen habe ich mit Strep-Syk transfiziert und mittels Analyse des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms konnte ich wiederum die vergleichbare Aktivierung des BZR-Signalweges zeigen (siehe Abb. 8).

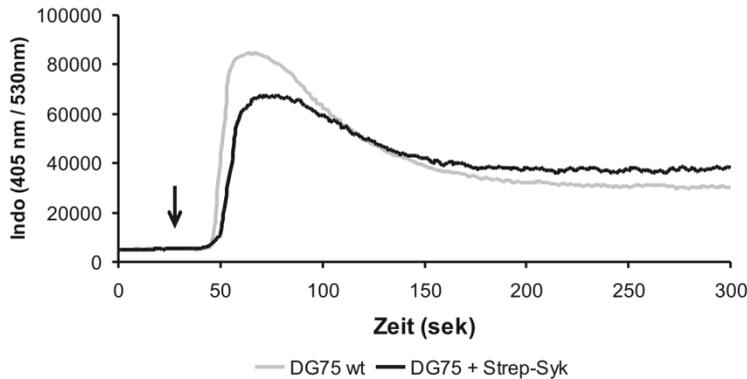


Abb. 8. DG-75-B-Zellen zeigen in An- und Abwesenheit von transfiziertem Strep-Syk einen vergleichbaren Kalziumionen-Einstrom. Humane DG-75-B-Lymphozyten wurden mittels Elektroporation mit Konstrukten transfiziert, die für Strep-Syk kodieren. Drei unabhängige Klone wurden ausgewählt und vermischt. Die Zellen wurden mittels Indo-1 und Durchflusszytometrie auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom untersucht. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zur Isolierung von Syk aus den transfizierten Zellen habe ich diese lysiert und nach einem Protokoll von Dr. T. Oellerich mit Streptaktin-Matrix inkubiert, die über die Interaktion mit dem „OneSTrEP-Tag“ zu einer Affinitätspräzipitation von Strep-Syk führte. Nach Elution mit Desthiobiotin konnte ich durch SDS-Page und anschließender Coomassie-Färbung die spezifische und effektive Aufreinigung von Strep-Syk aus DT40- und DG-75-Zellen zeigen (siehe Abb. 9).

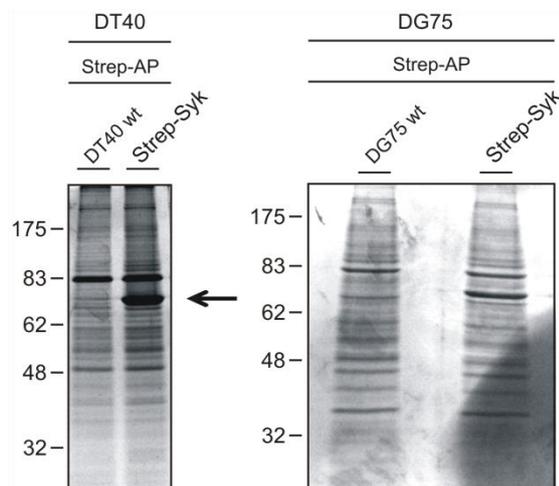


Abb. 9. Strep-Syk lässt sich effektiv aus DT40- und DG-75-B-Zellen isolieren. Die gereinigten zellulären Lysate der beschriebenen transfizierten DT40- (linke Seite) und DG-75- (rechte Seite) B-Zellen wurden mit Streptaktin-Matrix inkubiert und nach fünf Waschschritten wurde Strep-Syk mittels Desthiobiotin eluiert. Die resultierenden Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt. Der Pfeil deutet auf das aufgereinigte Strep-Syk. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben.

Für Syk wurde eine Cbl-abhängige Ubiquitylierung beschrieben (Hong et al. 2002). Ubiquitylierung kann zur proteasomalen Degradation von Proteinen führen (Salomons et al. 2010). Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Proteinmenge von Syk in BZR-stimulierten Zellen habe ich DT40- und DG-75-Zellen für verschiedene Zeiten stimuliert und durch Westernblot-Analyse konnte ich für beide Zelllinien eine konstante Expression von Syk über einen Stimulationszeitraum von 60 Min zeigen

(siehe Abb. 10). Diese Ergebnisse stimmen auch mit Ergebnissen von Kitaura et al. (2007) überein. Eine mögliche Degradation von Syk konnte ich also in diesen Zellen ausschließen.

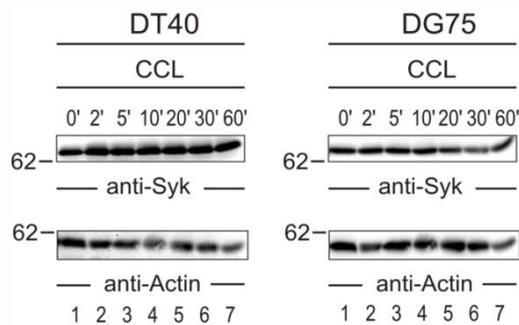


Abb. 10. Syk wird weder in DT40- noch in DG-75-B-Zellen nach BZR-Stimulation abgebaut. DT40- (linke Seite) und DG-75- (rechte Seite) B-Zellen wurden für angegebene Zeiten durch den BZR-Stimuliert und die gereinigten zellulären Lysate durch Immunoblot mit Antikörpern gegen humanes Syk auf den Zeitverlauf der Syk-Expression hin untersucht. Als Ladekontrolle wurden die Lysate mit Antikörpern gegen Aktin analysiert. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.2 Das Phosphorylierungsprofil von Syk in aktivierten B-Zellen

Zur massenspektrometrischen Bestimmung des Phosphorylierungsprofils von Syk in antigenstimulierten B-Zellen habe ich die in 4.1 beschriebenen DT40-Zellen für 1, 2, 3, 5, 10 oder 20 Minuten BZR-stimuliert und aus den zellulären Lysaten Syk wie in 3.3.7 (Seite 42) und 4.1 beschrieben affinitätspräzipitiert. In Zusammenarbeit mit der „Bioanalytical Mass Spectrometry Group“ am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen wurden die eluierten Proteine mittels 1D-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Lösung angefärbt, die Bande bei 70 kDa herausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Nach einer Anreicherung der phosphorylierten Peptide über eine Titaniumdioxid-Säule wurden diese auf einem Orbitrap-Massenspektrometer auf Phosphorylierung hin analysiert. Die kovalente Verknüpfung eines Peptides mit einer Phosphatgruppe führt zu einer definierten Massenänderung des Peptides, welche durch das Massenspektrometer im MS-Modus zunächst global für das Peptid erfasst und nach Fragmentierung des Peptides im MS/MS-Modus einer spezifischen Aminosäure zugeordnet werden konnte.

Insgesamt konnten 32 Phosphorylierungsstellen, darunter 15 phosphorylierte Tyrosin-Reste, elf phosphorylierte Serin-Reste und sechs phosphorylierte Threonin-Reste, in Syk identifiziert werden. Es konnten alle bisher bekannten Phosphorylierungsstellen bestätigt werden (in Abb. 11 schwarz dargestellt) sowie 19 neue Phosphorylierungsstellen (rot dargestellt) gezeigt werden. Eine Phosphorylierungsstelle in der regulatorisch wichtigen Interdomäne B ist Serin 297, das nach einer Stimulationszeit von fünf Minuten die dominante Phosphorylierungsstelle zu sein scheint, da es die größte Anzahl an gefundenen Phosphopeptiden aufweist (siehe Tabelle 9).

Phosphorylierungsstelle	Sequenz	Peptidanzahl
Serin 297	IKSY <u>S</u> FPKGHR	25
Tyrosin 352	EALPMDTEVY <u>E</u> SPYADPEEIRPK	10
Tyrosin 525 / 526	ALRADEN <u>YY</u> K	6
Tyrosin 630 / 631	LRNY <u>YY</u> DVVN	5
Tyrosin 296	<u>S</u> YFSPKPGHR	5

Tabelle 9. Phosphopeptidanzahl nach 5 min BZR-Stimulation. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S. 1553).

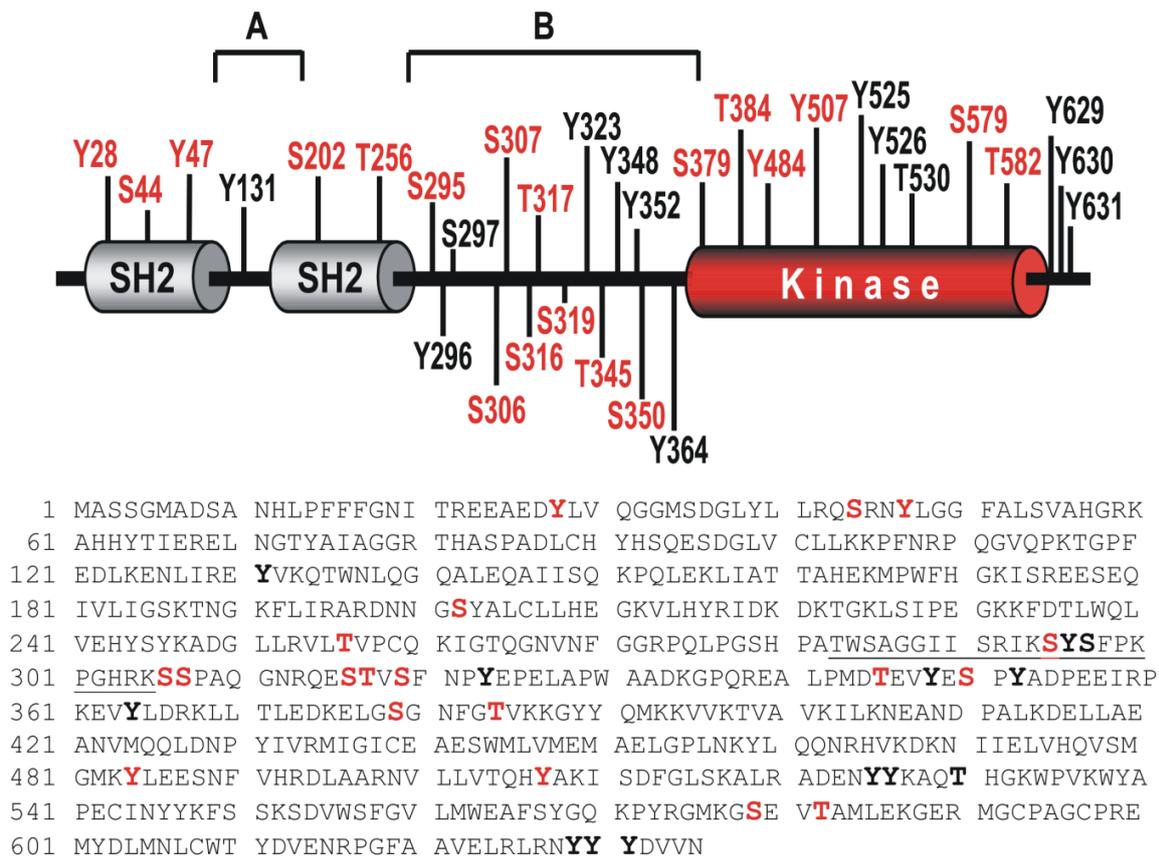


Abb. 11. Das Phosphorylierungsprofil von humanem Syk in BZR-stimulierten DT40-B-Zellen. Strep-Syk wurde aus DT40-B-Zellen, die für 1, 2, 3, 5, 10 oder 20 min durch den BZR stimuliert wurden, mittels Streptaktin isoliert, mit Trypsin verdaut und die resultierenden Phosphopeptide nach TiO_2 -Anreicherung mittels LC-MS/MS Massenspektrometrie analysiert. Der obere Anteil zeigt die Domänen-Struktur von Syk mit der Lokalisation der gefundenen Phosphorylierungsstellen. Der untere Anteil zeigt die Aminosäuresequenz von humanem Syk mit den gefundenen Phosphorylierungsstellen fettgedruckt. Das *linker insert*, das die Isoformen von Syk unterscheidet, ist unterstrichen. Neu gefundene Phosphorylierungsstellen sind in Rot dargestellt. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1552).

Durch Wiederholung der beschriebenen Versuche mit der in 4.1 beschriebenen, transfizierten humanen B-Zelllinien DG-75 konnten, da sich die Aufreinigung als insgesamt weniger effektiv herausstellte, elf der in der Literatur beschriebenen und sechs der in DT40 neu gefundenen Phosphorylierungsstellen bestätigt werden (siehe Abb. 12). Auch Serin 297 konnte erneut als phosphoryliert gezeigt werden. Zusätzlich

wurde Tyrosin 203 als Phosphorylierungsstelle identifiziert, das bei der Analyse der DT40-Zellen nicht auftauchte.

```

1 massgmadsa nhlpffffgni treeaedylv qggmsdglyl lrqSrnylgg falsvahgrk
61 ahhytierel ngtyaiaggr thaspadlch yhsqesdglv clkkpfnrp qgvqpktgpf
121 edlkenlire yvkqtnlqg qaleqaiisq kpqlekliat tahekmpwfh gkisreeseq
181 ivligsktng kflirardnn gSyalcllhe gkvlhyridk dktgklsipe gkkfdtlwql
241 vehysykadg llrvltvpcq kigtqgnvnf ggrpqlpgsh patwsaggii srikSysfpk
301 pghrksspaq gnrqestvsf npYepelapw aadkqpqrea lpmdteYes Yadpeeirp
361 kevYldrkll tledkelgSg nfgTvkkgyy qmkkvvtva vkilkneand palkdellae
421 anvmqqlndp yivrmigice aeswmlvmem aelgplnkyl qqnrhvkdkn iielvhqvsm
481 gmkyleesnf vhrdlaarnv llvtqhyaki sdfglskalr adenyYkaqt hgkwpvkwya
541 pecinyykfs sksdvwsfgv lmweafsygq kpyrgmkgSe vtamlekger mgcpagcpre
601 mydlmnlcwt ydvenrpgfa avelrlrnYY Ydvvn

```

Ser44	Ser202	Tyr203	Ser295	Tyr296	Ser297
Tyr323	Tyr348	Ser350	Tyr352	Tyr364	Ser379
Thr384	Tyr525	Tyr526	Ser579	Tyr629	Tyr630
Tyr631					

Abb. 12. Das Phosphorylierungsprofil von humanem Syk in BZR-Stimulierten DG-75-B-Zellen. Strep-Syk wurde aus DG-75-Zellen, die für 1, 2, 3, 5, 10, 20 min durch den BZR-Stimuliert wurden, mit Streptaktin isoliert und massenspektrometrisch analysiert. In der Aminosäuresequenz von humanem Syk sind die gefundenen Phosphorylierungsstellen fett gedruckt. Das *linker insert* ist unterstrichen. Phosphoryliertes Tyrosin 203, das in DT40 nicht gefundenen wurde, ist in Rot dargestellt. Unter der Sequenz sind die in DG-75 gefundenen Phosphorylierungsstellen zusammengefasst.

4.3 Die BZR-induzierte Phosphorylierungskinetik von Syk

Nach Stimulation eines Rezeptors kommt es häufig zur dynamischen Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen und damit zur Aktivierung und Regulation eines intrazellulären Signalweges (Olsen et al. 2006). Auch beim Signalweg des BZR spielt Phosphorylierung eine entscheidende Rolle, jedoch liegen bisher keine umfassenden massenspektrometrischen Analysen der Phosphorylierungskinetik aller beteiligten Proteine vor (Oellerich et al. 2009).

Zur Untersuchung der Phosphorylierungskinetik von individuellen Phosphorylierungsstellen von Syk wurde ein SILAC-basierter, massenspektrometrischer Versuch durchgeführt. Strep-Syk-exprimierende DT40-Zellen wurden metabolisch markiert, in dem sie in drei verschiedenen Medien für mindestens zehn Zellteilungen kultiviert wurden, die jeweils Arginin und Lysin mit schweren oder leichten Isotopen von Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff in unterschiedlichen Kombinationen enthielten. „Leichtes Medium“ enthielt dabei unmodifiziertes Lysin (+0) und Arginin (+0), „mittelschweres Medium“ enthielt die Kombination aus $^2\text{D}_4$, $^{12}\text{C}_6$, $^{14}\text{N}_2$ -Lysin (+4) und $^{13}\text{C}_6$, $^{14}\text{N}_4$ -Arginin (+6) und „schweres Medium“ $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -Lysin (+8) und $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ -Arginin (+10). Die leichten Zellen blieben unstimuliert, während die mittelschweren

für zwei oder fünf und die schweren Zellen für 10 oder 20 min durch den BZR-Stimuliert wurden. Die Peptide der unterschiedlich markierten Zellen konnten von dem Massenspektrometer auf Grund ihrer unterschiedlichen absoluten molekularen Masse voneinander unterschieden und somit einer der drei Zelllinien, die unterschiedlich stimuliert wurden, zugeordnet werden.

Strep-Syk habe ich aus den Zellen mittels Streptaktin aufgereinigt, die resultierenden Eluate in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt, so dass sich in einer Probe jeweils Syk aus unstimulierten und BZR-stimulierten (2 und 10 beziehungsweise 5 und 20 min) DT40-B-Zellen befanden. Die Proben wurden nach 1D-PAGE mit Trypsin, das Proteine nach Arginin oder Lysin spaltet, verdaut, so dass jedes Peptid mindestens ein Arginin oder Lysin enthält. Die phosphorylierten Peptide wurden wie in 3.4.2 (Seite 45) beschrieben angereichert, mittels LC-MS/MS untersucht und die Daten anschließend mit der MsQuant-Software ausgewertet. Durch Vergleich der Peak-Intensitäten konnte der Verlauf der Phosphorylierung der einzelnen Phosphorylierungsstellen nach BZR-Stimulus bestimmt werden. Durch den Vergleich zum unstimulierten Zustand konnte eine Kinetik über fünf Zeitpunkte ermittelt werden.

Insgesamt konnte so die Phosphorylierungskinetik von 15 Phosphopeptiden über fünf Zeitpunkte (siehe Abb. 13) und die Phosphorylierungskinetik von weiteren elf Phosphopeptiden über jeweils drei der fünf Zeitpunkte ermittelt werden (siehe Abb. 14). In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Bei der Phosphorylierungskinetik der Tyrosine (siehe Abb. 13, oben) fällt auf, dass die Phosphorylierung bei allen Phosphopeptiden bereits nach zwei Minuten ein Maximum erreicht und danach bei den meisten (z.B. Y526) sehr rasch wieder abfällt. Diese Kinetik wird auch als „frühe und rasche Kinetik“ bezeichnet. Bei einigen Phosphorylierungsstellen bleibt die Phosphorylierung jedoch auch über einen längeren Zeitraum bestehen (z.B. Y348 + 352). Dies wird als „frühe und bleibende Kinetik“ bezeichnet wird (Olsen et al. 2006).

Die Phosphorylierungskinetik der Serine und Threonine (siehe Abb. 13, unten) hingegen ist weniger homogen. Serin 297 zeigt eine ähnliche Kinetik wie die meisten Tyrosine mit einem deutlichen Anstieg in der Phosphorylierung nach Stimulation und einem raschen Abfall danach, jedoch wird das Maximum der Phosphorylierung etwas später erreicht. Serin 579 scheint eine noch stärker verzögerte Kinetik zu haben mit einem Anstieg der Phosphorylierung erst nach zehn Minuten (siehe Abb. 13). Dies

wird als „späte Kinetik“ bezeichnet (Olsen et al. 2006). Serin 202 hingegen zeigt einen Rückgang der Phosphorylierung nach Stimulation, wodurch die BZR-abhängige Dephosphorylierung von Syk durch Phosphatasen an definierten Phosphorylierungsstellen anzunehmen ist. Auf Serin 379 scheint der BZR kaum Einfluss zu nehmen, da die Phosphorylierung über den gesamten Stimulationszeitraum konstant bleibt. Syk zeigte also nach BZR-Stimulation eine dynamische und differenzierte Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosin-, Serin- und Threonin-Reste.

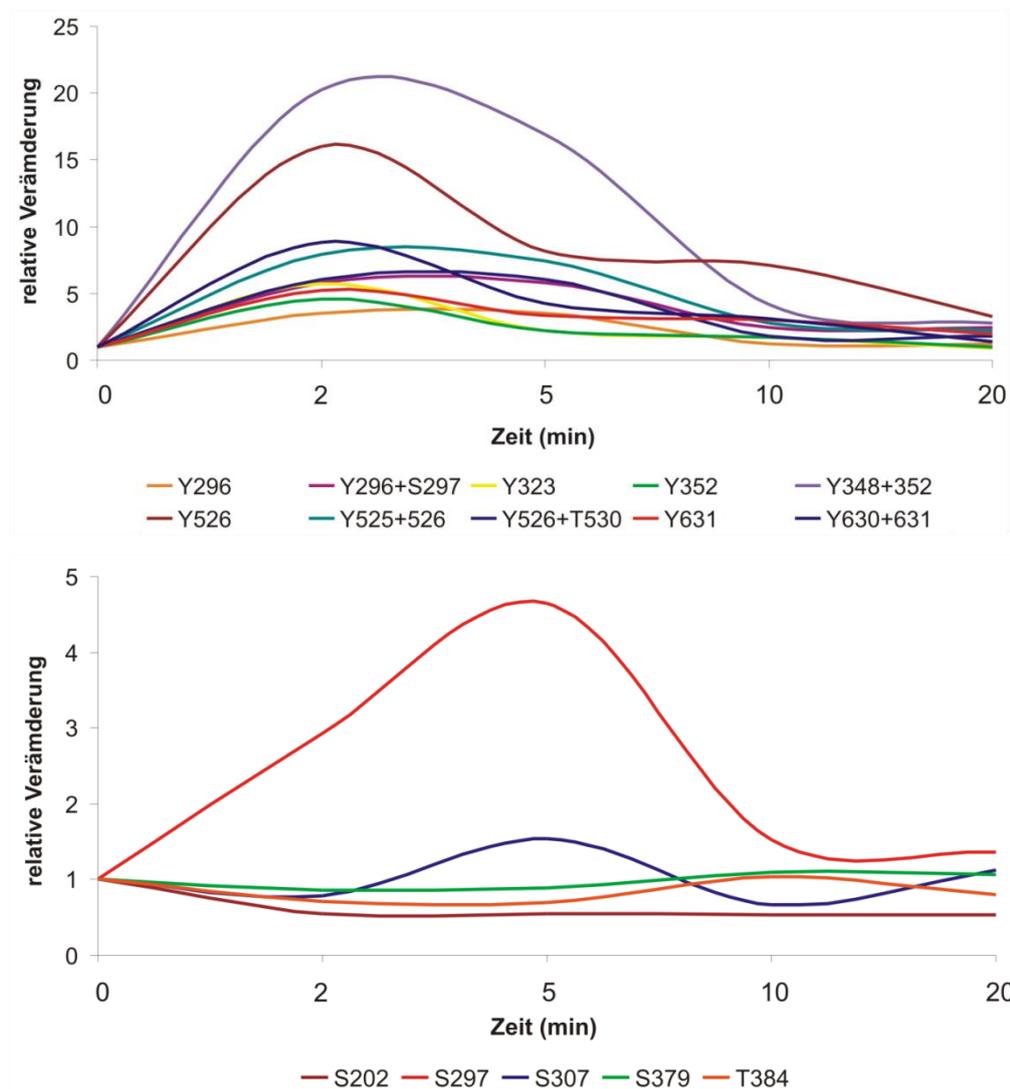


Abb. 13. Die Phosphorylierungskinetik von humanem Syk nach BZR-Stimulation. DT40-B-Zellen, die Strep-Syk exprimieren, wurden in drei verschiedenen SILAC-Medien (leicht, mittelschwer und schwer) kultiviert und dadurch metabolisch markiert. Die Zellen wurden für 0, 2, 10 min beziehungsweise 0, 5, 20 min stimuliert und aus den gereinigten zellulären Lysaten wurde Strep-Syk wie beschrieben isoliert, die Eluate im Verhältnis 1:1:1 vermischt und massenspektrometrisch analysiert. Der Status aus unstimulierten Zellen wurde zur Normalisierung der beiden Messungen verwendet. Die relative Änderung der Phosphorylierung stellt den Vergleich von leichten mit mittelschweren und schweren Phosphopeptiden dar. Der obere Anteil zeigt die Phosphorylierungskinetik der Tyrosine, der untere die der Serine und Threonine. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

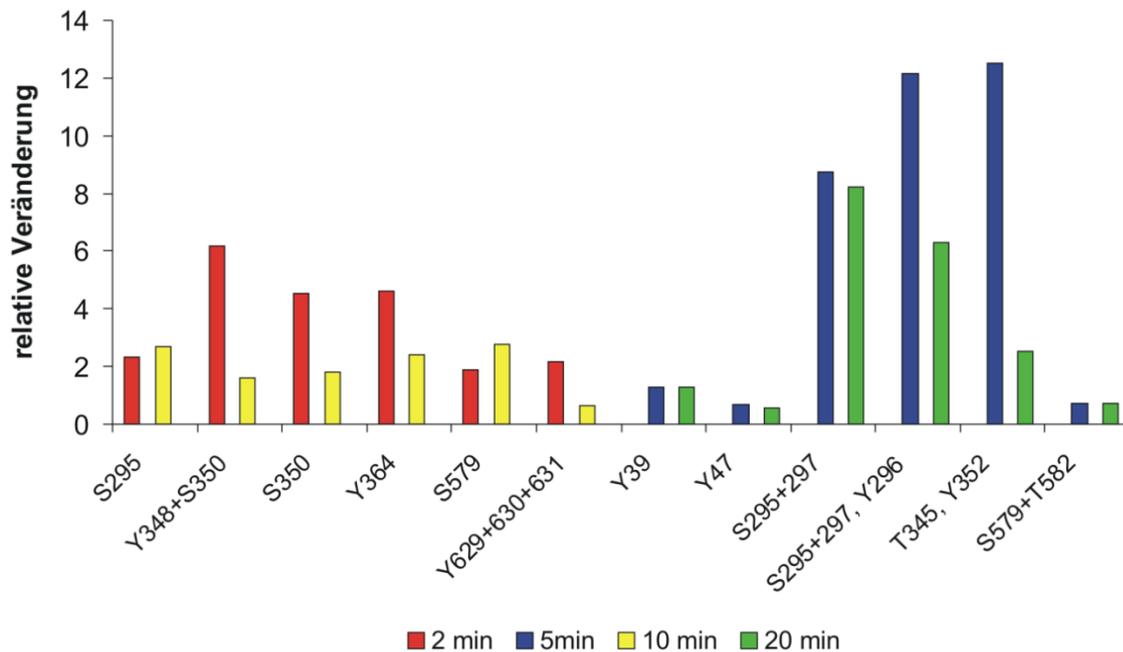


Abb. 14. Kinetik weiterer Phosphorylierungsstellen in humanem Syk nach BZR-Stimulation. Der Versuchsablauf ist identisch wie bereits für Abb. 13 beschrieben. Für einige Phosphorylierungsstellen konnte nur eine unvollständige Phosphorylierungskinetik erstellt werden, da sie nur bei der Messung mit 0, 2 und 10 min Stimulationszeit (linke Seite in Rot und Gelb) oder nur bei der mit 0, 5 und 20 min Stimulationszeit (rechte Seite in Blau und Grün) identifiziert wurden.

Sequenz	Phosphorylierungsstelle	2 min	Std. Abw.	10 min	Normalisiert	Std. Abw.
<i>spleen tyrosine kinase (unphos)</i>		1,000		0,780		
SYSFPGGHR	Y296	3,500	0,670	1,190	1,526	0,230
SYSFPGGHR	S297	2,930	0,620	1,520	1,949	0,550
IKSYSFPGGHR	Y296+S297	5,830	1,440	2,450	3,141	0,570
QESTVSFNPEPELAPWAADKGPQR	Y323	5,730	1,270	1,700	2,179	0,240
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	Y352	4,580	0,740	1,700	2,179	0,270
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	Y348+352	20,280	2,860	4,150	5,321	0,680
ADENYYKAQTHGK	Y526	16,020	2,160	7,130	9,141	2,180
ALRADENYYKAQTHGK	pY525+526	7,920	2,310	2,770	3,551	0,950
ALRADENYYKAQTHGK	Y526+T530	6,080	2,280	1,790	2,295	0,590
LRNYYVDVNV	Y631	5,260	1,740	3,000	3,846	1,160
LRNYYVDVNV	Y630+631	8,820	1,640	3,110	3,987	0,550
IKSYSFPGGHR	S295	2,320	0,350	2,100	2,692	0,430
ELGSGNFGTVK	S379	0,860	0,230	1,100	1,410	0,340
LLTLEDKELGSGNFGTVKK	T384	0,710	0,100	1,040	1,333	0,230
GMKGSEVTAMLEK	S579	1,900	0,600	2,170	2,782	0,690
DNNGSYALCLLHEGK	S202	0,550	0,230	0,530	0,679	0,180
KSSPAQGNR	S307	0,790	0,260	0,670	0,859	0,250
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	Y348+S350	6,190	"---"	1,264	1,620	"---"
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	S350	4,540	0,72	1,396	1,790	0,26
EVYLDK	Y364	4,620	0,85	1,880	2,410	0,44
GMKGSEVTAMLEK	S579	1,900	0,6	1,693	2,170	0,69
LRNYYVDVNV	Y629+630+631	2,180	0,32	0,515	0,660	0,14

Sequenz	Phosphorylierungsstelle	5min	Std. Abw.	20min	Std. Abw.
<i>spleen tyrosine kinase (unphos)</i>		1,000		1,000	
SYSFPGGHR	Y296	3,500	0,670	1,190	0,23
SYSFPGGHR	S297	4,650	0,460	1,360	0,55
IKSYSFPGGHR	Y296+S297	5,830	1,440	2,450	0,57
QESTVSFNPEPELAPWAADKGPQR	Y323	2,180	0,090	0,900	0,17
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	Y352	2,200	0,160	1,000	0,09
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	Y348+352	16,910	1,810	2,760	1,11
ADENYYKAQTHGK	Y526	8,180	2,100	3,290	0,92
ALRADENYYKAQTHGK	Y525+526	7,450	0,280	2,190	0,49
ALRADENYYKAQTHGK	Y526+T530	6,080	2,200	1,790	0,59
LRNYYDVVN	Y631	3,350	0,470	1,920	0,34
LRNYYDVVN	Y630+631	4,240	0,900	1,380	0,18
ELGSGNFGTVK	S379	0,890	0,34	1,060	0,36
LLTLEDKELGSGNFGTVKK	T384	0,690	0,16	0,800	0,11
DNNGSYALCLLHEGK	S202	0,550	0,23	0,530	0,18
KSSPAQGGR	S307	1,540	0,41	1,120	0,41
NYLGGFALSAHGR	Y47	0,690	0,28	0,560	0,3
IKSYSFPGGHR	S295+297	8,730	1,43	8,220	1,7
IKSYSFPGGHR	S295+297, Y296	12,150	2,45	6,280	1,44
EALPMDTEVYESPYADPEEIRPK	T345, Y352	12,530	2,98	2,530	0,7
GMKGSEVTAMLEK	S579+T582	0,710	0,22	0,710	0,27

Tabelle 10. Phosphorylierungskinetik von humanem Syk in BZR-stimulierten DT40-B-Zellen. In dieser Tabelle sind die in Abb. 13 und 13 dargestellten Ergebnisse zusammengefasst. Der obere Anteil zeigt die Daten der Kinetik 0, 2, 10 min. Nach 10 min wurde eine Abweichung der aufgereinigten Syk-Menge festgestellt und deshalb die Kinetik auf diesen Wert normalisiert. Der untere Anteil zeigt die Ergebnisse der Kinetik 0, 5, 20 min. Die phosphorylierte Aminosäure ist fett gedruckt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

4.4 Das Interaktom von Syk in ruhenden und aktivierten B-Zellen

Die Phosphorylierung von bestimmten Tyrosinen, Serinen oder Threoninen ist häufig eine Voraussetzung für die Interaktion mit anderen Proteinen. Für Syk konnte bereits gezeigt werden, dass neben der Kinase-Aktivität auch die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig für den BZR-Signalweg ist (Kulathu et al. 2009).

Mit dem Ziel, neben der Analyse der Phosphorylierung auch das Interaktom von Syk in B-Lymphozyten zu bestimmen, habe ich Strep-Syk aus unstimulierten und stimulierten (1, 2, 5, 10, 20 min) DT40-Zellen, die Strep-Syk exprimieren und in schwerem SILAC-Medium kultiviert wurden, mit Streptaktin-Matrix aufgereinigt. Als Negativkontrolle habe ich die gleiche Aufreinigung mit unstimulierten oder für die oben angegebenen Zeiten stimulierten DT40-Zellen, die wildtyp Syk ohne STREP-Tag exprimieren und in leichtem Medium kultiviert wurden, durchgeführt. Die Eluate wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und nach 1-D Page und Verdau mit Trypsin massenspektrometrisch analysiert und anschließend durch die MaxQuant Software ausgewertet. Dabei

erkennt MaxQuant durch den Massenunterschied die Peptide, in die schweres Arginin oder Lysin integriert ist, identifiziert somit Peptid-Paare, die sich in ihrer Masse genau um die SILAC-Modifizierungen unterscheiden und kann so den aufgereinigten Peptiden der einen Zelle korrespondierende Peptide der anderen Zelle zuordnen.

Waren die beiden Signale des Peptid-Paares von ähnlich starker Intensität, so ist das entsprechende Protein als unspezifischer Hintergrund aufgereinigt worden (siehe Abb. 15 oben). Ist jedoch das schwere Peptid, das aus der Zellkultur mit Strep-Syk stammt, mindestens um den Faktor fünf stärker aufgereinigt als das leichte Peptid aus der Negativkontrolle, so hat das entsprechende Protein als Interaktionsprotein spezifisch an Syk gebunden und ist deshalb in der Probe angereichert (siehe Abb. 15 Mitte). Der Grenzwert von Faktor fünf wird durch die Tatsache unterstützt, dass alle bekannten Interaktionspartner, die durch diese Messungen gefunden wurden, oberhalb dieser Grenze liegen.

In Abbildung 15 ist außerdem das MS-Spektrum eines Peptides von Syk zu sehen. Da Strep-Syk nur in den DT40-Zellen, die in schwerem Medium kultiviert wurden, exprimiert wurde, konnte es somit auch nur aus diesen Zellen aufgereinigt werden. Aus dem Fehlen eines leichten Peptides in dem Spektrum ergibt sich somit, dass die Proteine der DT40-Strep-Syk-Zellen vollständig mit schweren Aminosäuren markiert wurden (siehe Abb. 15 unten).

In unstimulierten B-Lymphozyten assoziiert Syk nur mit wenigen Proteinen (Tabelle 11, oberer Teil). In Übereinstimmung mit der ursprünglichen Entdeckung von Syk als BZR-assoziierte Kinase erscheinen die membrangebundene Form des Immunglobulin M sowie die assoziierten Proteine Ig- α (CD79a) und Ig- β (CD79b) als Interaktionsproteine von Syk bereits in unstimulierten B-Zellen.

Nach BZR-Stimulation erhöht sich die Anzahl der Interaktionsproteine von Syk auf über 20 (Tabelle 11, unterer Teil). Zusätzlich zu bekannten Bindepartnern wie dem BZR, dem Guanosin-Austauschfaktor VAV3 oder dem Adapterprotein SLP65 konnten mehr als 15 neue Bindepartner aus unterschiedlichen funktionellen Kategorien bestimmt werden. Neben der MAP-Kinase Sek1 und dem aus T-Zellen bekannten Adapterprotein RhoH konnten verschiedene Proteine aus der Gruppe des Zytoskeletts wie Aktin, Coronin1c und Dynein und verschiedene Isoformen des Adapterproteins 14-3-3 als Bindepartner von Syk ermittelt werden.

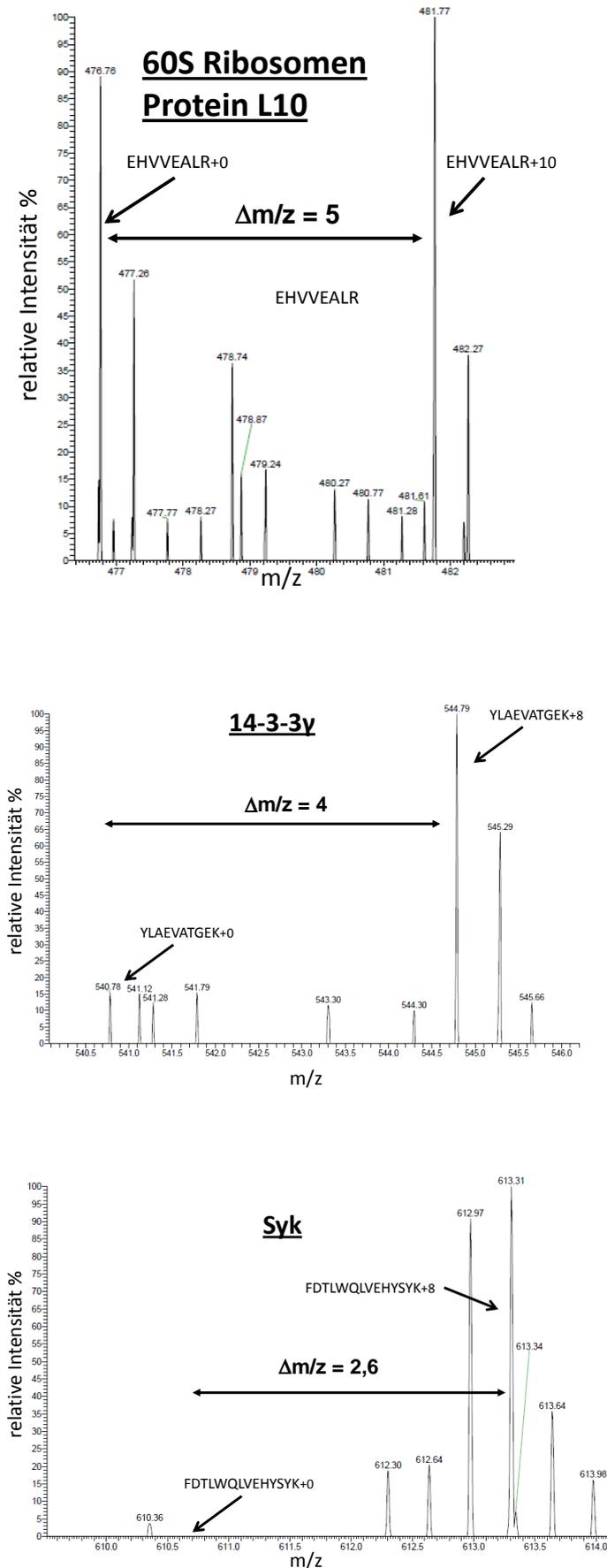


Abb. 15. SILAC-basierte massenspektrometrische Analyse des Interaktionspartners von Syk aus DT40-B-Lymphozyten. Dargestellt sind die MS-Spektren der Peptide des Hintergrundproteins „60S Ribosomen Protein L10“, Ladung = 2 (oben), des Bindepartners von Syk 14-3-3 γ , Ladung = 2 (mitte) und von Syk selbst, Ladung = 3 (unten). Eingezeichnet ist der m/z-Unterschied, der sich aus der Ladung des Peptides und der Anzahl der Arginine und Lysine und damit der schweren Isotope ergibt. Anzumerken ist, dass die meisten Peptide, aufgrund des natürlichen Vorkommens von schweren Isotopen, ein oder zwei zusätzliche schwere Isotope beinhalten und sich somit ein Peak-Triplet ergibt, bei dem der zweite und dritte Peak jeweils um eine atomare Masseneinheit geteilt durch die Ladung des Peptides, verschoben ist.

Bindepertner	IPI	Peptide	Funktion	Referenz
ruhende B-Zellen				
IgM schwere und leichte Kette	00591488	16	Membrangebundenes IgM	(Hutchcroft et al. 1992)
Ig- α (CD79a) / Ig- β (CD79b)	00589784	10	Bestandteil des BZR	(Wienands et al. 1995)
PLK2	00601339	1	Serin-/Threonin-Kinase	(Uckun et al. 2010 b)
Ig-schwere-Kette-Bindeprotein	00590375	8	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
Hsp90 α/β	00596586	136	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
Hsp90 ko-chaperone Cdc37	00582638	26	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
TRAP1	00584168	3	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
aktivierte B-Zellen				
IgM schwere und leichte Kette	00591488	72	membrangebundenes IgM	(Hutchcroft et al. 1992)
Ig- α (CD79a) / Ig- β (CD79b)	00589784	41	Bestandteil des BZR	(Wienands et al. 1995)
SLP65	00601644	17	Adapterprotein	(Abudula et al. 2007)
VAV3	00578220	8	GTP-Austauschfaktor	(Deckert et al. 1996)
p85- β	00575992	3	Untereinheit der PI3K	(Moon et. al 2005)
PLK2	00601339	3	Serin-/Threonin-Kinase	(Uckun et al. 2010 b)
Sek1	00594829	1	MAP-Kinase	diese Arbeit
RhoH	00581726	14	GTP-Bindeprotein	diese Arbeit
TRAP1	00584168	7	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
14-3-3 $\alpha, \gamma, \epsilon, \eta$	00587444	78	Adapterprotein	diese Arbeit, (Paris et al. 2010)
Aktin $\alpha 2$	00579460	10	Zytoskelett	diese Arbeit
Coronin1c	00576513	22	aktinassoziertes Protein	diese Arbeit
Dynein schwere Kette 2	00589956	1	intrazellulärer Transport	diese Arbeit
TOM1L1	00604337	2	intrazellulärer Transport	diese Arbeit
Ubiquitin	00819877	34	Proteinmodifikation	(Rao et al. 2001)
Ig-schwere-Kette-Bindeprotein	00590375	100	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
Hsp 90 α/β	00596586	700	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
Hsp70	00818704	30	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
Hsp90 ko-chaperone Cdc37	00582638	112	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
DNA-J-Homolog B6	00584191	6	Hitzeschockprotein	diese Arbeit
Sec7-Domän- Familie	00571847	2	unbekannt	diese Arbeit
LOC423772	00588286	2	unbekannt	diese Arbeit
Leucinreich mit CH-Domäne 3	00581388	1	unbekannt	diese Arbeit
PH-Domäne enthaltend G4B	00570901	1	unbekannt	diese Arbeit

Tabelle 11. Das B-Zell Interaktom von Syk aus ruhenden und BZR-aktivierten DT40-B-Zellen. Strep-Syk wurde mittels Streptaktin-Matrix aus unstimulierten oder BZR-stimulierten (1, 2, 5, 10, 20 min) DT40-B-Zellen die entweder Strep-Syk oder wildtyp Syk (als Negativkontrolle) exprimieren und in schwerem oder leichtem SILAC-Medium kultiviert wurden, isoliert, die Eluate im Verhältnis 1:1 vermischt und massenspektrometrisch analysiert. Die Tabelle zeigt alle Proteine, die mindestens eine fünffache Anreicherung schwerer gegenüber leichter Peptide zeigten. Pro Zeitpunkt wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1554).

Die Interaktion von Syk mit Sek1, Aktin und Coronin1c konnte ich durch Ko-Immunopräzipitation von Syk aus der humanen B-Zelllinie Ramos mittels Western-blot-Analyse verifizieren (siehe Abb. 16). Für 14-3-3 γ konnte ich die Interaktion durch

Ko-Immunopräzipitation von Syk sowohl aus der humanen B-Zelllinie Ramos und DG-75 als auch aus der Zelllinie DT40 zeigen (siehe Abb. 19, Seite 61).

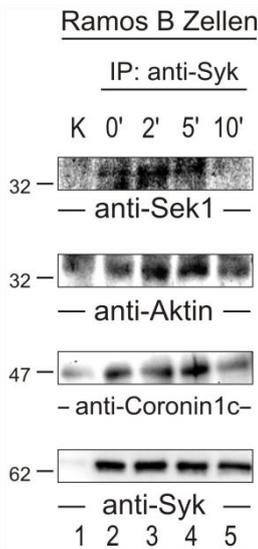


Abb. 16. Immunopräzipitation neuer Syk-Bindepartner aus humanen Ramos-B-Lymphozyten. Ramos-B-Zellen wurden unstimuliert gelassen oder durch den BZR für angegebene Zeiten stimuliert und Syk aus den geklärten zellulären Lysaten immunopräzipitiert und einer Immunblotanalyse mit Antikörpern gegen Sek1, Aktin und Coronin1c zugeführt. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen Syk diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass Syk bereits in unstimulierten B-Zellen mit bestimmten Proteinen interagiert und dass sich dieser Komplex BZR-abhängig zu einem Multiproteinkomplex ausweitet. Dabei passt eine stimulationsabhängige Veränderung des Interaktoms von Syk zu der ermittelten, verstärkten Phosphorylierung von Syk nach BZR-Stimulus.

4.5 14-3-3 γ bindet an phosphoryliertes Serin 297 in humanem Syk

Als neuer Interaktionspartner von Syk wurde 14-3-3 identifiziert. Für diese Gruppe von Adapterproteinen sind viele Funktionen in der Signaltransduktion verschiedener Rezeptorsysteme beschrieben. Sie binden an spezifische Motive mit einem phosphorylierten Serin oder Threonin (Yaffe et al. 1997). Eine Funktion im proximalen BZR-Signalweg war bisher nicht bekannt. Da bei der Phosphorylierungsanalyse neben vielen Tyrosinen auch viele Serine und Threonine als phosphoryliert gefunden wurden, ist zu vermuten, dass 14-3-3 an eines oder mehrere dieser Motive bindet.

Mit Hilfe der Proteinanalyseprogramme von ScanSite (Obenauer et al. 2003) und ELM (Diella et al. 2008) konnte ich sieben potentielle Binde-Motive für 14-3-3 in humanem Syk ermitteln, von denen fünf über verschiedene Säugetierspezies konserviert sind (siehe Abb. 17).

	T256	S295	S297	S306	T317	T371	T530
Human	--DGLLRVLTVP [~] CQ--IS [~] RIKSYSF [~] PKPG [~] H [~] RKSSPAQGN [~] RQEST [~] VSFN--DR [~] KLLTLE [~] DK--YY [~] KAQ [~] THGK [~] W--						
Maus	--DGLLRVLTVP [~] CQ--IS [~] RIKSYSF [~] PKPG [~] H [~] KKPAPPQGS [~] RPE [~] STVSFN--DR [~] SLLTLE [~] DN--YY [~] KAQ [~] THGK [~] W--						
Ratte	--DGLLRVLTVP [~] CQ--IS [~] RIKSYSF [~] PKPG [~] H [~] KKPPPPQGS [~] RPE [~] STVSFN--DR [~] KLLTLE [~] DN--YY [~] KAQ [~] THGK [~] W--						
Schwein	--DGLLRVLTVP [~] CQ--IS [~] RIKSYSF [~] PKPG [~] H [~] RKASSPQGN [~] RPESL [~] VSFN--DR [~] KLLTLE [~] DK--YY [~] KAQ [~] THGK [~] W--						
ScanSite	mittel	mittel	mittel	schwach	nein	nein	schwach
Elm	ja	nein	ja	nein	ja	ja	nein
Phosphoryliert	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja

Abb. 17. In-silico-Suche nach potentiellen 14-3-3-Bindestellen in humanem Syk. Gezeigt ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Syk aus verschiedenen Spezies. Rote Schrift bedeutet Übereinstimmung, graue Schrift Abweichung. Humanes Syk wurde mit den Online-Programmen ScanSite und Elm auf potentielle 14-3-3-Bindemotive untersucht. ScanSite unterscheidet zusätzlich noch zwischen hoch, mittel und niedrig wahrscheinlichen Bindemotiven. Zusätzlich ist der massenspektrometrisch ermittelte Phosphorylierungszustand nach BZR-Stimulation angegeben. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1556).

Mit dem Ziel, die Bedeutung dieser Aminosäuren auf die Bindung von Syk zu untersuchen, habe ich durch zielgerichtete Mutagenese-PCRs Varianten der humanen Syk-DNA hergestellt, die an Stelle des Serins für Alanin beziehungsweise an Stelle des Threonin für Valin kodieren. Die mutierte DNA habe ich an die DNA für den Farbstoff Citrin gekoppelt und retroviral in Syk-defiziente DT40-Zellen transduziert, so dass diese jeweils eine N-terminal Citrin-gekoppelte Variante von Syk stabil exprimieren (im Folgenden als Citrin-Syk bezeichnet). Durch retrovirale Transduktion können klonale Effekte ausgeschlossen werden. Die Vergleichbarkeit der Expression der Syk-Varianten habe ich mittels Durchflusszytometrie überprüft (siehe Abb. 18).

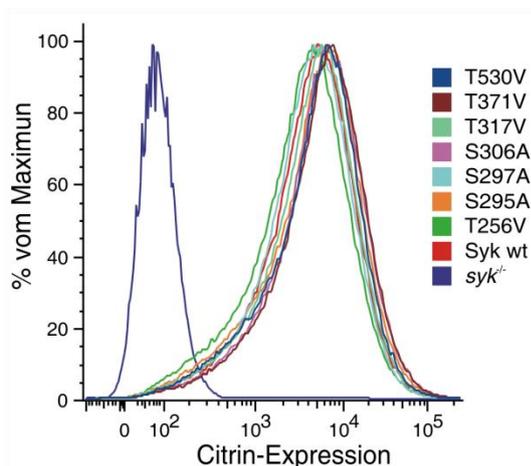


Abb. 18. Expression von Citrin-Syk Varianten in DT40-Zellen. Syk-defiziente DT40-B-Lymphozyten wurden retroviral mit angegebenen Varianten von Citrin-Syk transfiziert. Die resultierenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Citrin-Syk hin analysiert. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1557).

In der massenspektrometrischen Analysen der Syk-Phosphorylierung konnten nur vier der fünf konservierten Serine / Threonine als phosphoryliert gezeigt werden: Threonin 256, Serin 295, Serin 297 und Threonin 530, jedoch nur Threonin 256 und Serin 297 wurden in beiden Suchmaschinen als potentielle Bindemotive erkannt. Da

Serin 297 das am häufigsten gefundene Phosphopeptid nach fünf Minuten BZR-Stimulation darstellt, erfolgten alle weiteren Experimente zunächst mit der S297A Variante von Citrin-Syk.

Durch Ko-Immunopräzipitation von Syk aus DT40-, DG-75- und Ramos-Zellen konnte ich mittels Westernblot-Analyse zeigen, dass 14-3-3 γ durch BZR-Stimulation induzierbar nach fünf Minuten BZR-Stimulation an Syk bindet und dass diese Bindung durch die Mutation von S297A aufgehoben werden kann (siehe Abb. 19).

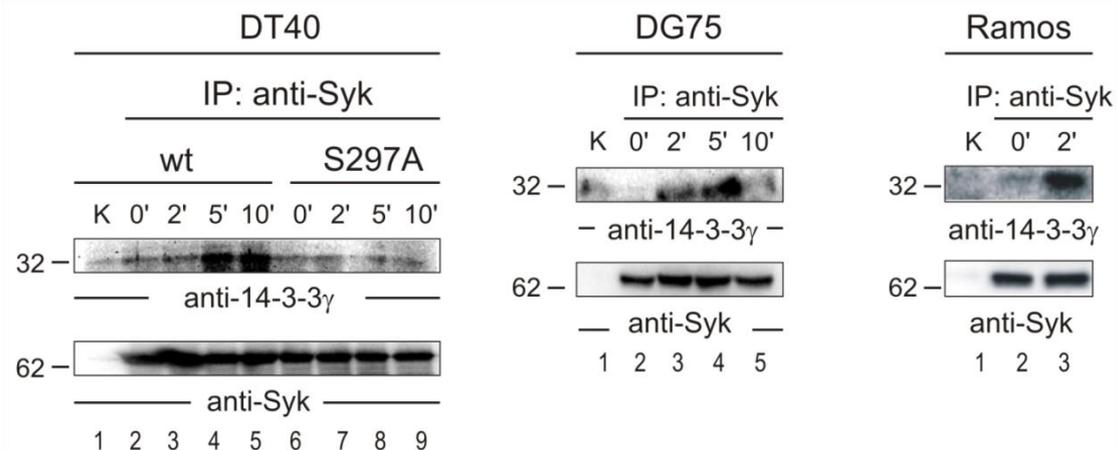


Abb. 19. Interaktion von Syk und 14-3-3 γ . Syk wurde aus DT40-Zellen, die Citrin-Syk wildtyp beziehungsweise die Variante S297A exprimieren (links), aus DG-75-Zellen (Mitte) und aus Ramos-Zellen (rechts), die jeweils unstimuliert belassen oder für angegebene Zeiten durch den BZR stimuliert wurden, immunopräzipitiert und einer Immunblotanalyse mit einem Antikörper gegen 14-3-3 γ zugeführt. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen Syk diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind jeweils repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1556).

Des Weiteren konnte ich durch Westernblot-Analyse von Lysaten aus Syk-defizienten DT40-Zellen, die Citrin-Syk wt oder S297A exprimieren, sowie den humanen Zellen DG-75 und Ramos unter Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen das phosphorylierte Typ-I-Bindemotiv für 14-3-3 (R/KXXpSX), die Existenz eines phosphorylierten 14-3-3-Bindemotivs in Syk in BZR-stimulierten B-Zellen nachweisen (siehe Abb. 20). In Lysaten von Zellen, die die S297A-Variante von Syk exprimieren, konnte kein Signal festgestellt werden. Somit scheint die Aminosäuresequenz um Serin 297 das einzige phosphorylierte Typ-I-Bindemotiv für 14-3-3 in Syk zu sein.

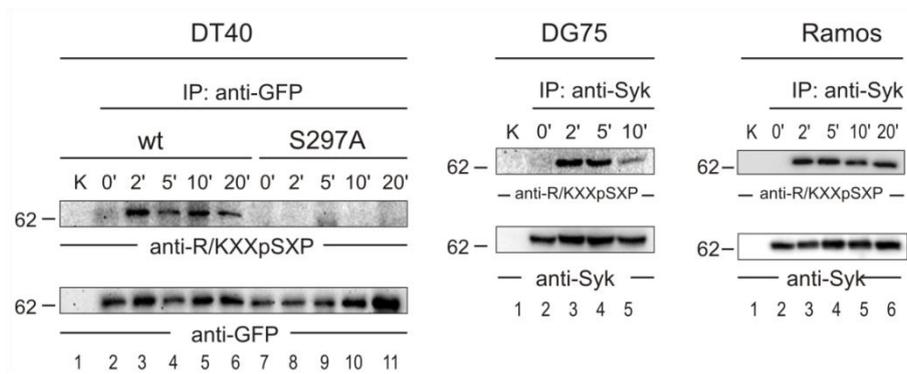


Abb. 20. Die Aminosäuresequenz um Serin 297 ist das einzige phosphorylierte 14-3-3-Bindemotiv in humanem Syk. Syk wurde aus beschriebenen DT40- (links), DG-75- (Mitte) und Ramos-Zellen (rechts), die jeweils unstimuliert belassen oder für angegebene Zeiten durch den BZ stimuliert wurden, immunopräzipitiert und einer Immunblotanalyse mit einem Antikörper gegen das phosphorylierte Typ-I-Bindemotiv für 14-3-3 (R/KXXpSXP) zugeführt. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen Syk und GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind jeweils repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1556).

4.6 14-3-3 γ bindet direkt an phosphoryliertes Serin 297

Als Nächstes sollte mittels Far-Westernblot-Analyse untersucht werden, ob es sich bei der Bindung von 14-3-3 γ an Syk um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Zu diesem Zwecke habe ich das Fusionsprotein von GST-14-3-3 γ und als Negativkontrolle GST aus IPTG-stimulierten Lysaten von BL21 E.coli Bakterien aufgereinigt. Testexpressionen ergaben eine maximale Expression der Proteine nach drei Stunden IPTG-Stimulation (siehe Abb. 21, oberer Abschnitt). Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde eine BSA-Vergleichsreihe verwendet (siehe Abb. 21, unterer Abschnitt).

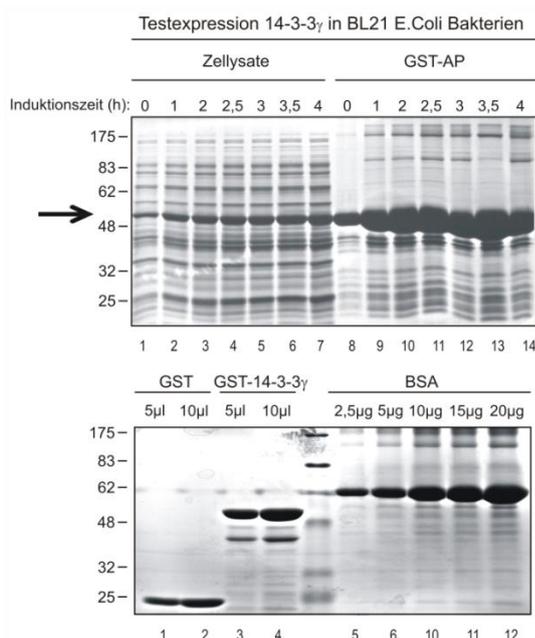


Abb. 21. Testexpression von GST-14-3-3 γ . BL21 E.coli Bakterien wurden mit der DNA von 14-3-3 γ im pGEX-GST-Expressionsvektor transformiert. Die Expression von GST-14-3-3 γ wurde durch die Zugabe von IPTG gestartet und Proben wurden jeweils nach angegebenen Zeiten entnommen. Durch Inkubation mit Glutathion-Matrix konnte GST-14-3-3 γ isoliert werden. Der obere Bildabschnitt zeigt die unaufgereinigten Zellysate (linke Seite) und die aufgereinigten Proben (rechte Seite), die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt wurden. Der Pfeil zeigt auf GST-14-3-3 γ . Der untere Bildabschnitt zeigt aufgereinigtes und eluiertes GST (Spalte 1+2) und GST-14-3-3 γ (Spalte 3+4), das mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt wurde, wobei jeweils 5 beziehungsweise 10 μ l des Eluats aufgetragen wurden. Um die enthaltenen Proteinmenge abzuschätzen wurde eine BSA-Verdünnungsreihe aufgetragen (Spalten 5 – 9). Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben.

Syk wurde von mir aus den in 4.5 beschriebenen DT40-Zellen aufgereinigt und nach Westernblot der Proteine die resultierende Membran mit 10 µg GST-14-3-3γ beziehungsweise GST inkubiert. Durch Entwicklung mit einem Antikörper gegen GST konnte eine direkte und induzierbare Interaktion von Syk mit 14-3-3γ gezeigt werden, die aufgehoben ist, wenn Serin 297 zu Alanin mutiert ist (siehe Abb. 22, oberste Spalte). Eine unspezifische Bindung von GST allein konnte ausgeschlossen werden (siehe Abb. 22, mittlere Spalte).

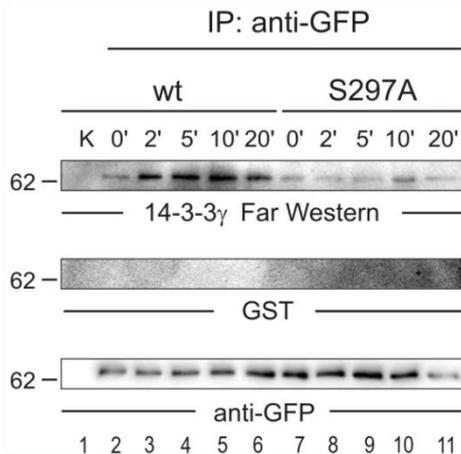


Abb. 22. 14-3-3γ interagiert direkt mit phosphoryliertem Serin 297. Syk wurde aus beschriebenen unstimulierten oder BZR-stimulierten DT40-Zellen immunopräzipitiert, die resultierenden Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Die Blottingmembranen wurden mit gleichen Mengen GST-14-3-3γ (oben) oder GST (Mitte) inkubiert (Far-Westernblot). Anschließend wurden die Membranen mit Antikörpern gegen GST und Peroxidasegekoppeltem sekundären Antikörpern inkubiert und die Bindung mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1556).

Die Mutation eines der anderen sechs Serine beziehungsweise Threonine vermochte die direkte Bindung von 14-3-3γ an Syk nicht aufzuheben, wie mittels Immunopräzipitation von Syk aus den beschriebenen rekonstituierten DT40-Zellen und anschließender Far-Westernblot-Analyse gezeigt werden konnte (siehe Abb. 23). Somit konnte das Motiv KSYpSFP um das phosphorylierte Serin 297 als hauptsächliches Bindemotiv für 14-3-3γ bestimmt werden.

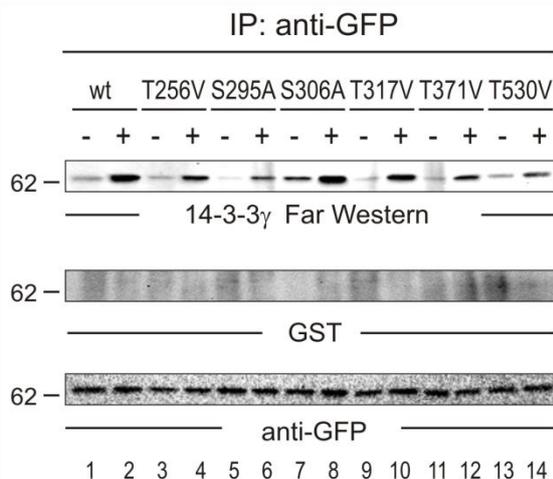


Abb. 23. 14-3-3γ interagiert nur mit phosphoryliertem Serin 297 in humanem Syk. Der in Abb. 22 beschriebene Versuchsaufbau wurde mit den sechs anderen Mutanten von Syk, in denen jeweils ein potentielles Bindemotiv für 14-3-3 mutiert ist, wiederholt. Die Zellen wurden dabei entweder unstimuliert belassen (-) oder für 5 min stimuliert (+). Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1556).

4.7 Das Interaktom von Syk S297A

Mittels eines SILAC-basierten, massenspektrometrischen Versuches wurde quantitativ das Interaktom von wildtypischem Syk und der S297A Variante verglichen, um die Auswirkungen des Austausches von Serin 297 zu Alanin auf das Gesamt-Interaktom von Syk zu zeigen und damit Hinweise auf die Funktion der Bindung von 14-3-3 an Syk zu bekommen.

Dazu habe ich die Syk-Mutante, die für Syk S297A kodiert, an den beschriebenen „OneSTrEP-Tag“ gekoppelt und mittels Elektroporation in Syk-defiziente DT40-B-Zellen transfiziert. Wiederum wurden, um klonale Effekte auszuschließen, drei Klone mit vergleichbarer Expression von Strep-Syk S297A vermischt. Eine vergleichbare Expression von wt und S297A Strep-Syk wurde mittels Immunoblotting und Coomassie-Färbung einer Testaufreinigung gesichert (siehe Abb. 24, unterer Anteil).

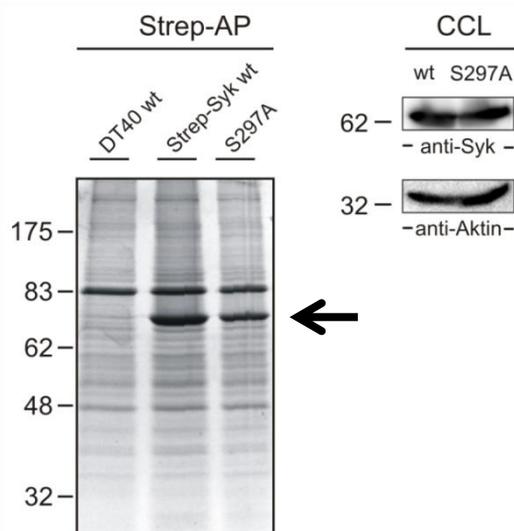


Abb. 24. Expression von Strep-Syk wt und S297A in Syk-defizienten DT40-B-Lymphozyten.

Syk defiziente DT40-Zellen wurden mit Strep-Syk S297A transfiziert, drei unabhängige Klone wurden vermischt und Strep-Syk wurde aus DT40-wildtyp-Zellen und DT40-Zellen, die entweder Strep-Syk wt oder S297A stabil exprimieren, mit Streptaktin-Matrix aufgereinigt. Die resultierenden Eluate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt (linke Seite). Der Pfeil kennzeichnet das aufgereinigte Strep-Syk.

Die gereinigten zellulären Lysate von DT40-Zellen, die stabil Strep-Syk wt beziehungsweise S297A exprimieren, wurden durch Immunoblot mit Antikörpern gegen humanes Syk auf ihre Expression von Syk hin untersucht. Als Ladekontrolle wurden die Lysate mit Antikörpern gegen Aktin analysiert (rechte Seite).

Die beschriebenen DT40-Zellen, die Strep-Syk S297A exprimieren, wurden in schwerem Medium und die Strep-Syk-wildtyp-exprimierenden in leichtem Medium kultiviert. Nach fünf Minuten BZR-Stimulation habe ich Strep-Syk aus den geklärten zellulären Lysaten mittels Streptaktin-Matrix aufgereinigt und die Eluate im Verhältnis 1:1 vermischt. Die Proben wurden massenspektrometrisch analysiert und durch MaxQuant ausgewertet. Nun ergaben sich Unterschiede in der Intensität der schweren und leichten Peptide nur bei Proteinen, die durch die Punktmutation verstärkt oder vermindert aufgereinigt wurden. Ratios der Intensitäten von <1 bedeuten dabei eine schwächere Assoziation und Ratios >1 eine verstärkte Assoziation des entsprechenden Bindepartners mit der Syk S297A-Variante. Es zeigte sich, dass der S297A Aus-

tausch zu einem fast kompletten Verlust der Bindung von 14-3-3 γ und ϵ führt. Darüber hinaus zeigten die Daten, dass Ig- β und Ubiquitin um den Faktor zwei effizienter mit der S97A-Variante aufgereinigt wurden (siehe Abb. 25).

Insgesamt bestätigt dieser Versuch also die bedeutsame Rolle von Serin 297 für die Bindung von 14-3-3 an Syk und deutet darauf hin, dass dieser Komplex die Bindung von Ubiquitin und Ig- β an Syk inhibiert.

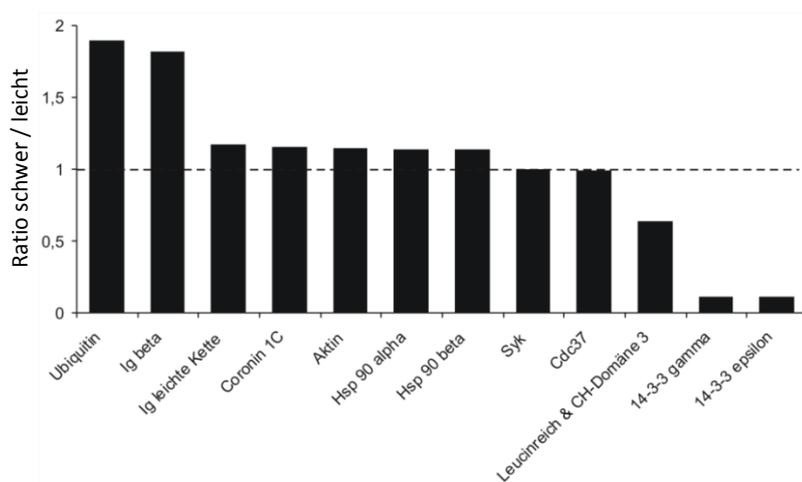


Abb. 25. Das Interaktom von Syk S297A. Die in Abb. 25 beschriebenen Zellen wurden in leichtem oder schwerem SILAC-Medium kultiviert und Strep-Syk wt oder die S297A-Variante wurde mittels Streptaktinmatrix aufgereinigt. Die resultierenden Eluate wurden 1:1 gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Durch den Vergleich von korrespondierenden schweren und leichten Peptiden konnten die Interaktome relativ verglichen werden. Die Ratio von schweren zu leichten Peptiden gibt an, wie sich das Interaktom von Syk S297A im Vergleich zu Syk wildtyp zusammensetzt. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1556).

4.8 14-3-3 inhibiert die Bildung des Kalzium-Initiations-Komplexes

Zur Untersuchung der Bedeutung der Bindung von 14-3-3 an Syk auf den BZR-Signalweg wurde der Einfluss auf den Kalzium-Initiations-Komplex untersucht. Dazu habe ich SLP65 und PLC- γ 2 aus DT40-Zellen, die entweder die wildtyp oder S297A Citrin-Syk exprimieren, immunopräzipitiert und mittels Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin auf ihre Phosphorylierung untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl SLP65 (Abb. 26, links) als auch PLC- γ 2 (Abb. 26, rechts) in der Abwesenheit der Bindung von 14-3-3 an Syk stärker phosphoryliert werden. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde in der Abwesenheit der Bindung von 14-3-3 an Syk ein Phosphoprotein mit einem PLC- γ 2-ähnlichem Molekulargewicht stärker mit SLP65 kopräzipitiert.

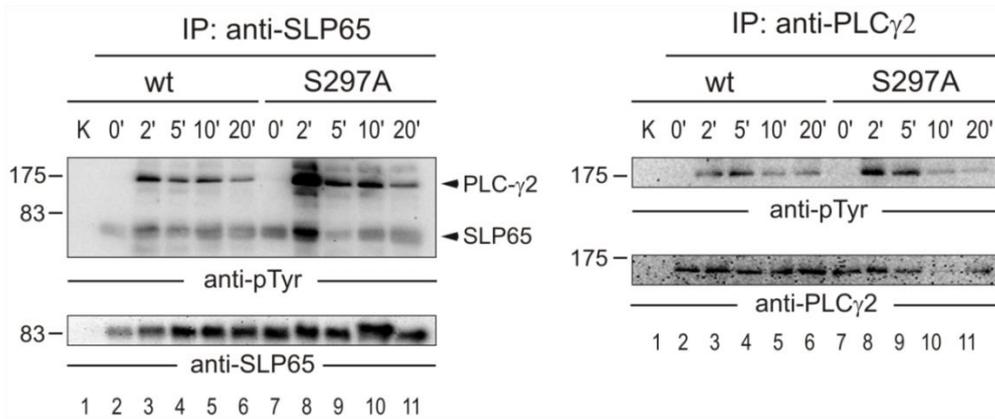


Abb. 26. Die Entstehung des Kalzium-Initiations-Komplexes ist verstärkt bei Abwesenheit der 14-3-3-Bindung an Syk. Die beschriebenen DT40-Zellen, die stabil Citrin-Syk wt oder S297A exprimieren, wurden unstimuliert belassen oder für angegebene Zeiten durch den BZR stimuliert. SLP65 (linke Seite) beziehungsweise PLC- γ 2 (rechte Seite) wurden immunopräzipitiert und einer Immunblotanalyse mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin zugeführt. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen SLP65 beziehungsweise PLC- γ 2 dienten als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1557).

Diese Daten weisen darauf hin, dass der Kalzium-Initiations-Komplex in den Zellen, die die S297A-Variante von Syk exprimieren, effizienter gebildet wird. Entsprechend habe ich in diesen Zellen bei einer durchflusszytometrischen Analyse der zytosolischen Kalziumionenkonzentration festgestellt, dass diese Zellen nach BZR-Stimulation deutlich mehr Kalziumionen mobilisieren, als Zellen, die wildtypisches Syk exprimieren (siehe Abb. 27). Während der Kalziumionen-Einstrom nach drei Minuten in Syk wildtyp-exprimierenden Zellen fast auf den Ruhewert absinkt, ist in Syk S297A-exprimierenden Zellen auch noch nach circa 15 Minuten (siehe Abb. 27) und sogar noch nach 30 Minuten (siehe Abb. 35, Seite 73) ein Signal deutlich über dem Basalwert nachzuweisen.

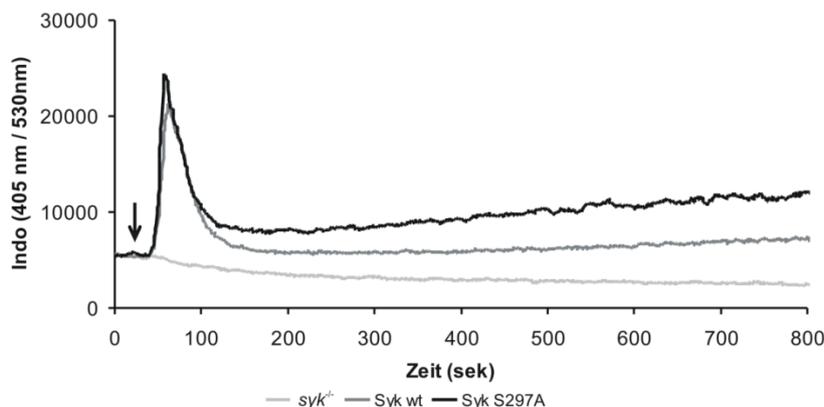


Abb. 27. 14-3-3 inhibiert den BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom. Die beschriebenen Zellen wurden mittels des kalziumabhängigen Farbstoffs Indo-1 und mittels Durchflusszytometrie auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom untersucht. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1557).

Mit dem Ziel zu untersuchen, ob die Unterschiede im Kalziumionen-Signal auf verschiedene Kalziumionenströme über die Plasmamembran zurückzuführen sind, habe ich eine Kalziumionen-Fluss-Analyse in Abwesenheit von Kalziumionen im Puffer durchgeführt. Dabei bestanden kaum Unterschiede im BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom aus intrazellulären Speichern (siehe Abb. 28). Nach Zugabe von Kalziumionen wurde jedoch ein deutlich stärkeres Signal in den Zellen beobachtet, welche die S297A-Variante von Syk exprimieren. Dies deutet darauf hin, dass vornehmlich der Kalziumionen-Einstrom aus dem Extrazellulärraum durch 14-3-3 reguliert wird.

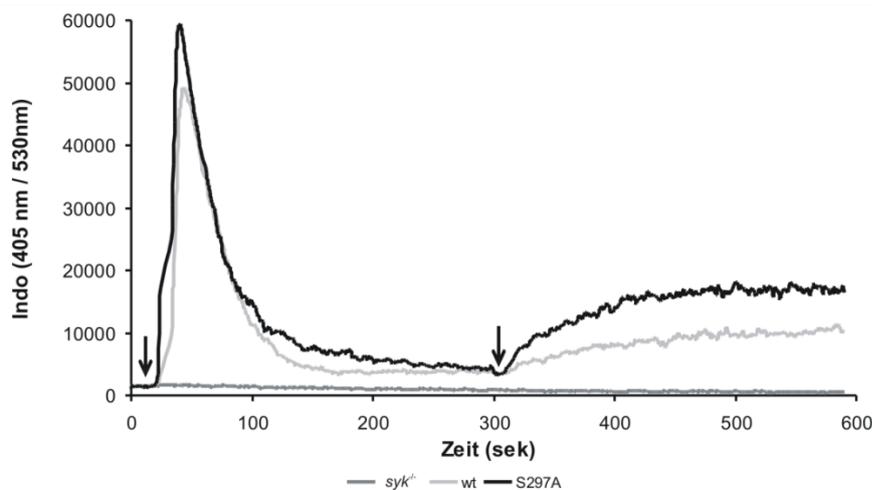


Abb. 28. 14-3-3 inhibiert vornehmlich den extrazellulären Anteil des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms. Die beschriebenen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom untersucht. Um zwischen dem Kalziumionen-Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum und dem Extrazellulärraum zu unterscheiden, wurden extrazelluläre Kalziumionen durch die Zugabe von EGTA chelatiert. Nach fünf min wurden Kalziumionen zu den Proben hinzugegeben. Der linke Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation, der rechte Pfeil kennzeichnet die Zugabe von Kalziumionen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Das Bindemotiv für 14-3-3 um Serin 297 liegt in einem Bereich der Interdomäne B, dem sogenannten *linker insert*, der in einer kürzeren Isoform von Syk (Syk-B) nicht enthalten ist (Rowley et al. 1995). Über Durchflusszytometrie konnte ich zeigen, dass das *linker insert* essentiell für die Mobilisation von Kalziumionen ist, da die kurze Isoform von Syk fast keine BZR-vermittelte Kalziumionenmobilisierung zeigt (siehe Abb. 29). Gleiche Expression der Varianten wurde über Durchflusszytometrie bestätigt.

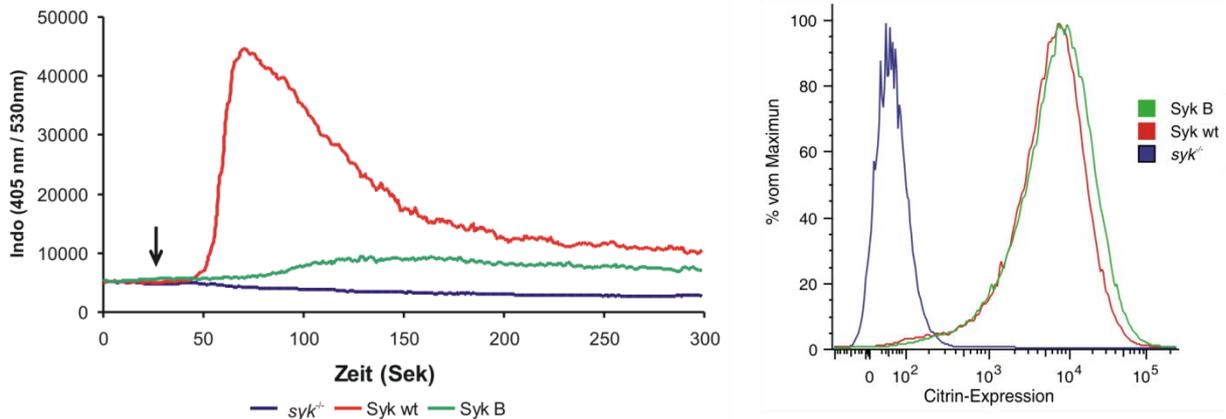


Abb. 29. Das linker insert ist essentiell für die Funktion von Syk. Syk-defiziente DT40-B-Lymphozyten, die Citrin-Syk wildtyp oder Citrin-Syk Isoform B exprimieren, wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expressionsstärke von Citrin-Syk (rechts) und auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom untersucht (links). Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.9 14-3-3 inhibiert die Phosphorylierung und Rekrutierung von Syk

Die Aktivität von Syk im frühen BZR-Signalweg wird einerseits über die Rekrutierung von Syk zur Plasmamembran und andererseits über die Phosphorylierung bestimmter Tyrosine in Syk reguliert (Tsang et al. 2008). Zur Plasmamembranrekrutierung von Syk ist bekannt, dass Syk nach BZR-Stimulation an die Membran in BZR-Mikrokluster rekrutiert wird, die dann miteinander verschmelzen und das sogenannte *Cap* bilden, aus dem Syk, nachdem es insgesamt circa zwanzig Minuten an der Membran verweilt, internalisiert wird (Ma et al. 2001).

In Zusammenarbeit mit Dr. M. Engelke konnte durch konfokale Laser-Mikroskopie lebender DT40- und DG-75-Zellen, die Citrin-Syk wildtyp oder die S297A-Variante exprimieren, der zeitliche Verlauf der Plasmamembranrekrutierung von Syk nach BZR-Stimulation bestätigt werden. In beiden Zellsystemen wurde dabei eine verstärkte und verlängerte Rekrutierung von Citrin-Syk S297A an die Plasmamembran beobachtet (siehe Abb. 30 und 31). Die quantitative Auswertung der Signalverteilung zwischen Plasmamembran und Zytosol von 30 – 50 Zellen pro Zelllinie und Zeitpunkt mit dem Programm ImageJ (siehe 3.2.11, Seite 39) bestätigte, dass die S297A Variante signifikant effizienter an die Plasmamembran rekrutiert wird ($p < 0,01$ für jeden Zeitpunkt).

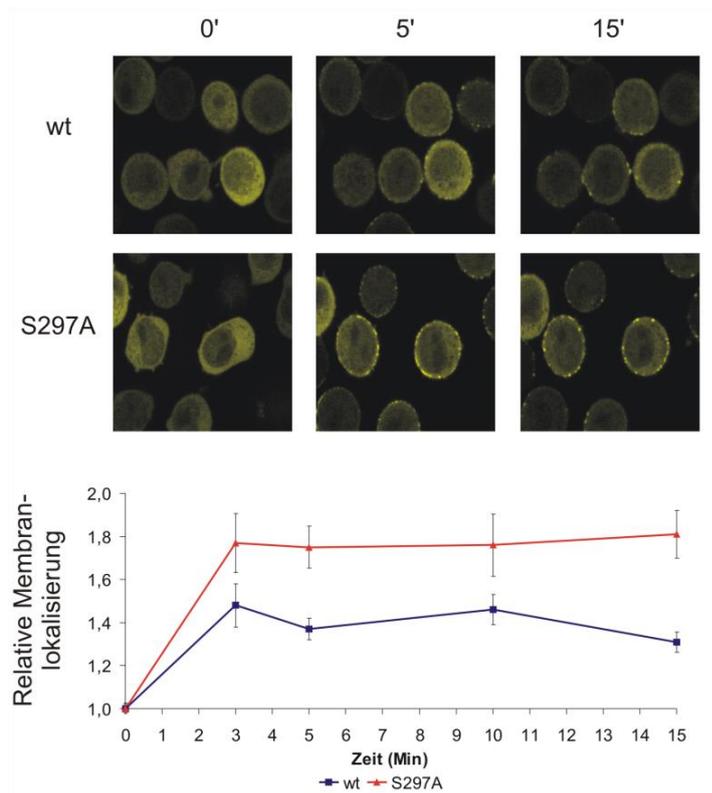


Abb. 30. 14-3-3 inhibiert die Rekrutierung von Syk an die Plasmamembran in DT40-Zellen. Die subzelluläre Lokalisation von Citrin-Syk wt und S297A wurde mittels konfokaler Laser-Mikroskopie in ruhenden und BZR-stimulierten (3, 5, 10 und 15 min) DT40-Zellen untersucht. Repräsentative Bilder sind im oberen Abschnitt zu sehen. Mindestens 50 Zellen pro Zeitpunkt von Bildern aus fünf unabhängigen Messungen wurden mit ImageJ auf die Citrin-Signalintensität an der Plasmamembran und im Zytosol hin analysiert. Die dargestellten Werte (unten) stellen die relative Plasmamembranlokalisierung von Syk dar, errechnet als Mittelwert der Ratios der an der Membran und im Zytosol gemessenen Signalintensitäten normalisiert auf unstimulierte Zelle. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an. Der p-Wert ist für jeden Zeitpunkt $<0,01$. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1558).

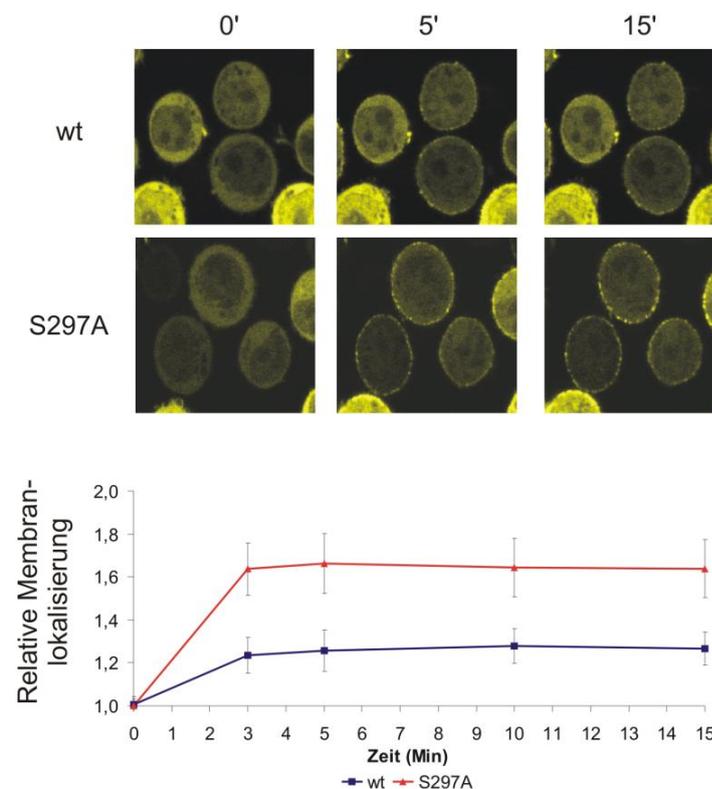


Abb. 31. Die Bindung von 14-3-3 an Syk inhibiert die Rekrutierung von Syk an die Plasmamembran auch in humanen DG-75-Zellen. Die subzelluläre Lokalisation von Citrin-Syk wildtyp und S297A wurde in ruhenden und BZR-stimulierten (3, 5, 10 und 15 min) humanen DG-75-Zellen untersucht und quantifiziert wie in Abb. 30 beschrieben. Repräsentative Bilder aus fünf unabhängigen Messungen sind im oberen Abschnitt zu sehen, die statistische Auswertung der Quantifizierung von mindestens 30 Zellen pro Zeitpunkt ist im unteren Abschnitt zu sehen. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall an. Der p-Wert ist für jeden Zeitpunkt $<0,01$. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1559).

Die verstärkte Membranlokalisierung von Syk wäre dabei prinzipiell auch durch eine unterschiedliche Expression des BZR oder durch eine veränderte Kinetik in der Internalisierung des Rezeptors nach BZR-Stimulation zu erklären, jedoch konnte ich

diese Möglichkeiten durch Markierung des BZR mit farbstoffgekoppelten Antikörpern und anschließender Durchflusszytometrie ausschließen (siehe Abb. 32). Somit ist von einem verstärkten Rekrutierungsmechanismus von Syk an die Plasmamembran auszugehen, beispielsweise und passend zu den in Abbildung 25 (Seite 65) dargestellten Ergebnissen über eine verstärkte Interaktion mit Ig- β .

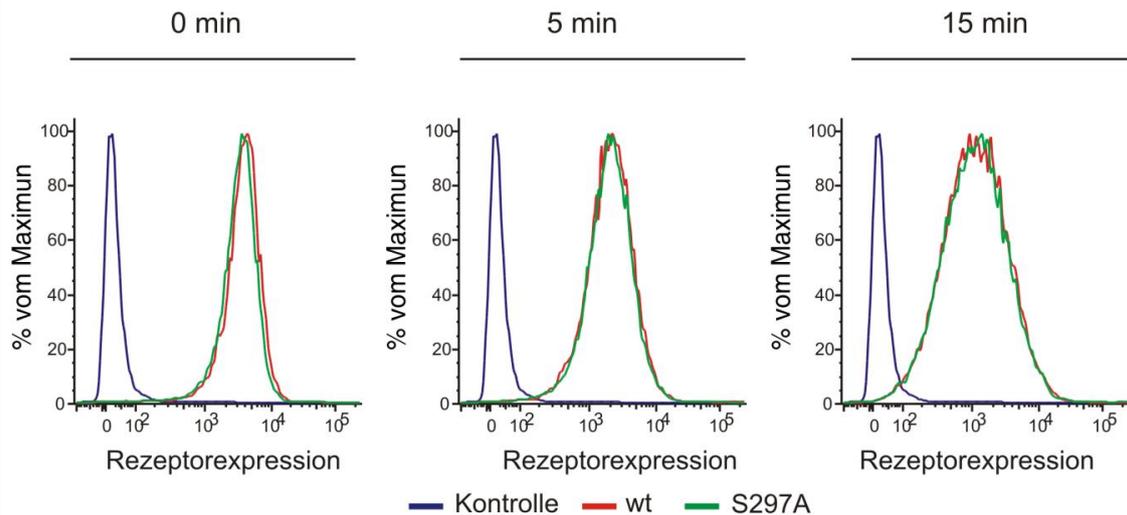


Abb. 32. Die Internalisierung des BZR wird durch die Bindung von 14-3-3 an Syk nicht beeinflusst. DT40-Zellen, die stabil Citrin-Syk wt oder S297A exprimieren, wurden für angegebene Zeiten BZR-stimuliert und mit einem Cy-5-gekoppelten Antikörper, der gegen den Stimulations-Antikörper gerichtet ist, gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Intensität von Cy-5 auf der Zelloberfläche untersucht. Als Kontrolle wurden DT40-Zellen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Neben der Rekrutierung an die Plasmamembran ist auch die Phosphorylierung für die Regulation der Funktion von Syk wichtig. Deshalb habe ich, um den Einfluss von 14-3-3 auf die Phosphorylierung zu ermitteln, Citrin-Syk wt und die S297A-Variante aus DT40-B-Zellen nach BZR-Stimulation immunopräzipitiert und die Syk-Phosphorylierung mittels Westernblot und phosphotyrosinspezifischen Antikörpern untersucht. Die Inaktivierung der 14-3-3-Bindestelle in Syk führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von Syk nach zwei und fünf Minuten BZR-Stimulation. Durch die densitometrische Auswertung durch das Programm ImageJ konnte der Unterschied auf circa 40% quantifiziert werden (Siehe Abb. 33).

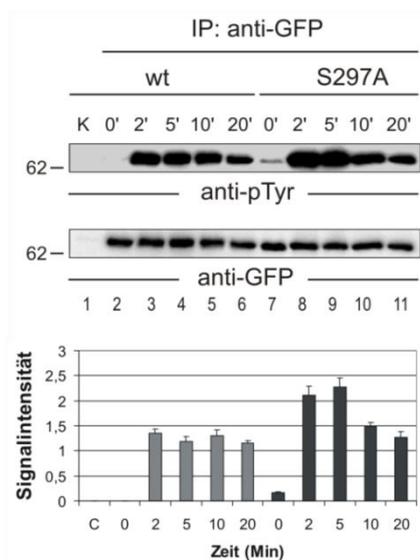


Abb. 33. Die 14-3-3-Bindung an Syk inhibiert die Phosphorylierung von Syk. Die beschriebenen DT40-Zellen, die stabil Citrin-Syk wt oder S297A exprimieren, wurden unstimuliert belassen oder für angegebene Zeiten durch den BZR stimuliert. Syk wurde immunopräzipitiert und einer Immunblotanalyse mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosin-Reste zugeführt. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Der Immunoblot wurde einer densitometrischen Analyse zugeführt. Die Balken geben die Signalintensität der Banden an, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Modifiziert nach Bohnenberger et al. (2011, S.1558).

Die Veränderungen im Phosphorylierungsstatus könnten die Kinase-Aktivität von Syk beeinflussen, so dass neben der veränderten zellulären Lokalisation der S297A Mutante auch eine verstärkte Kinase-Aktivität zu einer verstärkten Aktivierung von Syk-Substraten führen könnte. Deshalb habe ich Citrin-Syk wildtyp und S297A aus DT40-B-Zellen, die für fünf Minuten BZR-stimuliert wurden, immunopräzipitiert und einem *in-vitro*-Kinase-Experiment nach einem Protokoll von M. Lösing zugeführt. Dabei habe ich präzipitiertes Syk für 15 Minuten bei 37°C und als Negativkontrolle auf Eis mit einem synthetischen, Biotin-gekoppeltem Peptid, das von Syk phosphoryliert werden kann, inkubiert. Das Peptid konnte mit einer Streptavidin-beschichteten ELISA-Platte immobilisiert und nacheinander mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin und einem peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper inkubiert werden. Durch Zugabe von ABTS wurde eine peroxidaseabhängige Farbreaktion gestartet und die Absorption mittels eines ELISA-Auslesegerätes gemessen. Ich konnte zeigen, dass das Peptid von Syk phosphoryliert wird, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0.3$, $n=5$) zwischen wildtyp und S297A in der Syk-abhängigen Phosphorylierung des Peptides gezeigt werden (siehe Abb. 34). Mittels Westernblot konnte ich einen Unterschied in der Menge an immunopräzipitiertem Syk ausschließen (siehe Abb. 34 links oben). Da Syk eine starke Tendenz zur Autoaktivierung *in vitro* zeigt, ist es jedoch möglich, dass bei der gewählten Phosphorylierungszeit von 15 Minuten geringe Unterschiede eventuell nicht erfasst wurden, so dass eine Wiederholung der Versuche mit unterschiedlichen Phosphorylierungszeiten weitere Erkenntnisse bringen könnte.

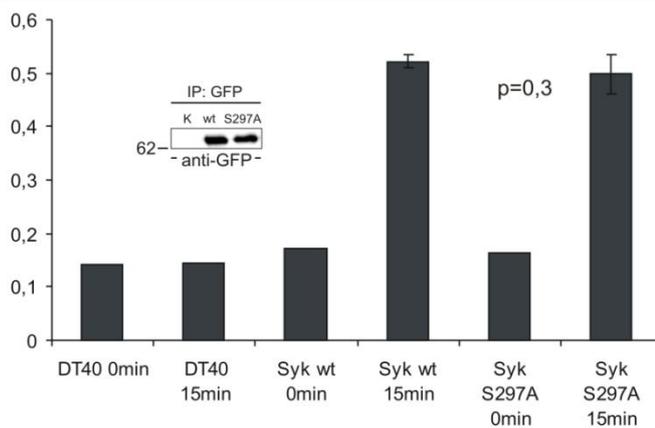


Abb. 34. Die Kinase-Aktivität von Syk wird durch die Interaktion mit 14-3-3 nicht signifikant verändert. Citrin-Syk wt oder S297A wurde aus DT40-B-Zellen, die für fünf min durch den BZR stimuliert wurden, immunopräzipitiert und mit einem Biotin-gekoppelten Peptid, das von Syk phosphoryliert werden kann, für 15 min bei 37°C oder auf Eis (als Negativkontrolle) inkubiert. Das Peptid wurde mittels einer Streptaktin-beschichteten ELISA-Platte immobilisiert und mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin und einem sekundären, Peroxidase-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Durch Zugabe von ABTS wurde eine Peroxidase abhängige Farbreaktion induziert und die Absorption mittels eines ELISA-Auslesegerätes bestimmt. Als Kontrolle dienten DT40-Zellen, die kein Citrin-Syk exprimieren. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus fünf unabhängigen Messungen an. Mittels Immunoblot wurde die Effizienz der Immunopräzipitation überprüft (links oben).

4.10 Cbl und 14-3-3 inhibieren Syk unabhängig voneinander

Neben der Inhibition von Syk durch 14-3-3 ist die Inhibition durch die Bindung von Cbl an das durch Lyn phosphorylierte Tyrosin 323 in Syk beschrieben (Hong et al. 2002). Zum Vergleich der Inhibition des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom durch die beiden Mechanismen habe ich Syk-defiziente DT40-B-Zellen mit Citrin-Syk wildtyp, S297A, Y323F und S297A+Y323F retroviral rekonstituiert. Eine vergleichbare Expression von Syk konnte ich mittels Durchflusszytometrie zeigen (Abb. 35, rechts). Die Analyse des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms ergab, dass die Einzelmutanten von Syk einen vergleichbaren und jeweils stärkeren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom als die Citrin-Syk wildtyp-exprimierenden Zellen zeigten. Dabei war der Kalziumionen-Einstrom jeweils initial nur etwas stärker als in Citrin-Syk wildtyp-exprimierenden Zellen, hielt jedoch im weiteren Verlauf für mehr als 30 Minuten an, während der Kalziumionen-Einstrom der Citrin-Syk wildtyp exprimierenden Zellen annähernd auf den Ruhewert zurück ging (siehe Abb. 35, links). Beide Mechanismen scheinen also vergleichbar in der Bedeutsamkeit für den BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom zu sein. Die Doppelmutante von Syk zeigte einen sehr viel deutlicheren Anstieg im initialen Kalziumionenfluss, der dann direkt in ein Plateau von Kalziumionen-Einstrom überging, das auch nach 30 Minuten noch nicht endete. 14-3-3 und Cbl scheinen also Syk in unabhängiger und additiver Weise zu hemmen.

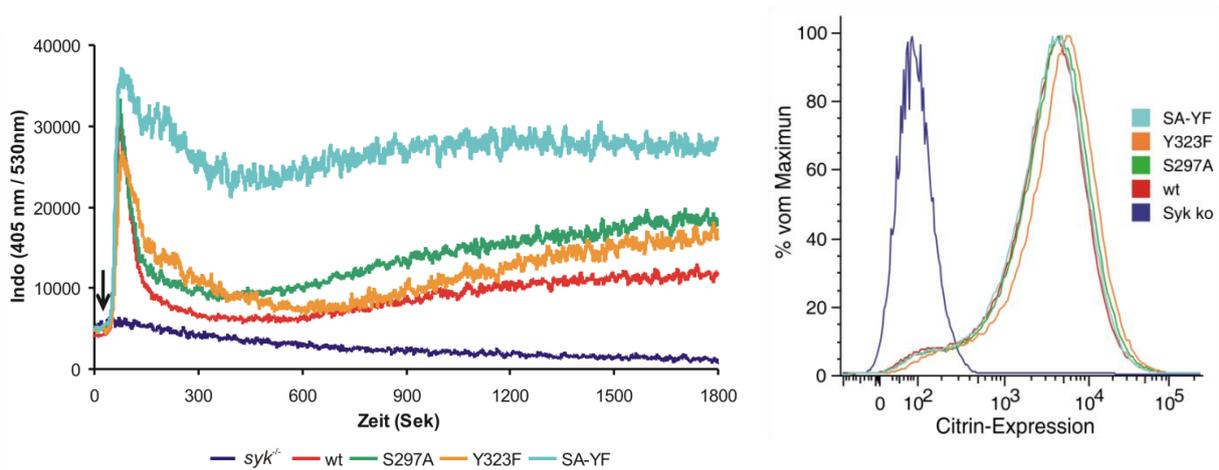


Abb. 35. Vergleich der Syk-Inhibition durch 14-3-3 und Cbl. Syk-defiziente DT40-Zellen wurden retroviral mit Konstrukten, die für die angegebenen Varianten von Citrin-Syk kodieren, transfiziert. SA-YF steht für die Doppelmutante S297A und Y323F. Die resultierenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Citrin-Syk hin analysiert (rechts) und mittels Durchflusszytometrie auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom untersucht (links). Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente

Die massenspektrometrische Analyse von Syk S297A ergab, dass S297A im Vergleich zum wildtyp stärker ubiquitinyliert wird. Dieses Ergebnis konnte ich mittels Immunopräzipitation von Citrin-Syk aus den beschriebenen BZR-aktivierten DT40-Zellen und anschließender Westernblot-Analyse verifizieren (siehe Abb. 36).

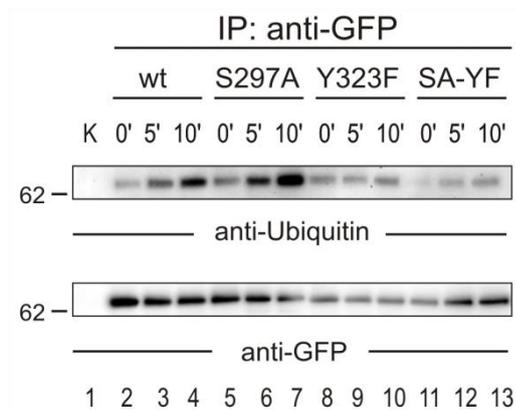


Abb. 36. Die Bindung von 14-3-3 an Syk inhibiert die Ubiquitinylierung von Syk. Aus beschriebenen unstimulierten oder BZR-stimulierten DT40-Zellen wurde Citrin-Syk immunopräzipitiert und einer Immunoblotanalyse mit einem Antikörper gegen Ubiquitin zugeführt. Als Immunopräzipitationskontrolle dienten isotypengleiche Antikörper. Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.11 Serinphosphorylierung beeinflusst die SH2-Domänen von Syk

In der Bindetasche von SH2-Domänen befindet sich die funktionell wichtige Sequenz F/Y L I/L R, im Folgenden als FLIR-Motiv bezeichnet (Waksman et al. 1993). In unmittelbarer Nachbarschaft dazu befindet sich in der N-terminalen SH2-Domäne von Syk Serin 44, das massenspektrometrisch als phosphoryliert identifiziert wurde (siehe Abb. 37).

N-terminale SH2-Domäne

ffgnitreeaedylvqggmsdgly**yllrqs**rnylggfalsvahgrka
 hhytierelngtyaiaggrthaspadlchyhsqesdglvcllkkpf

C-terminale SH2-Domäne

wfhgkisreeseqivligsktngk**flir**ardnng**s**yalcllhegkv
 lhyridkdktgklsipegkfdtlwqlvehysykadgllrvltvpc

Abb. 37. Aminosäure-Sequenz der N- und C-Terminalen SH2-Domäne von Syk. Die N-Terminale SH2-Domäne (oben) von Syk enthält in direkter Nachbarschaft zum YLLR-Motif (Fett gedruckt) das phosphorylierte Serin 44 (in Rot). In der Nähe des FLIR-Motives der C-terminalen SH2-Domäne befindet sich das nach BZR-Stimulation dephosphorylierte Serin 202.

Die C-terminale SH2-Domäne enthält das Motiv FLIR ohne ein benachbartes Serin, jedoch wird aus der Struktur ersichtlich, dass die SH2-Domäne eine zusätzliche Schleife enthält, die Serin 202 in unmittelbare Nähe zur Bindetasche der SH2-Domäne bringt (siehe Abb. 38). Dieses Serin wurde als Phosphorylierungsstelle identifiziert, die nach BZR-Stimulation dephosphoryliert wird (siehe Abb. 13, Seite 53).

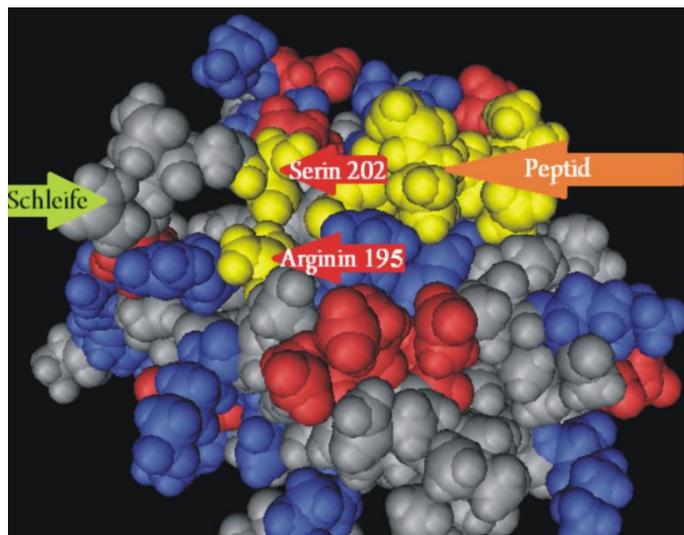


Abb. 38. Serin 202 liegt in der Struktur der C-Terminalen SH2-Domäne von Syk dem FLIR-Motiv benachbart. Die Abb. zeigt die dreidimensionale Struktur der C-Terminalen SH2-Domäne von Syk gebunden an ein tyrosinphosphoryliertes Phosphopeptid (in Gelb, durch orangenen Pfeil markiert). Außerdem sind in Gelb Serin 202 und Arginin 195, das zum FLIR-Motiv gehört, dargestellt und durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Mit einem grünen Pfeil ist die Schleife markiert, die Serin 202 in die Nähe von Arginin 195 bringt.

Mit dem Ziel, die Funktion dieser den SH2 Bindetaschen benachbarten Serinen zu untersuchen, habe ich DT40-Zellen retroviral mit Citrin-Syk Varianten, bei denen jeweils S44, S202 oder beide gegen Alanin oder negativ-geladenes Glutamat ersetzt wurde, rekonstituiert. Die Expression wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Analyse des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms ergab, dass die Mutation eines oder beider Serine zu Alanin eine leichte Reduktion im Kalziumionen-Einstrom führt, während die Mutation von S202 zu Glutamat den Kalziumionen-Einstrom wei-

testgehend und die Mutation von S44 oder beider Serine zu Glutamat vollständig verhindert (siehe Abb. 39).

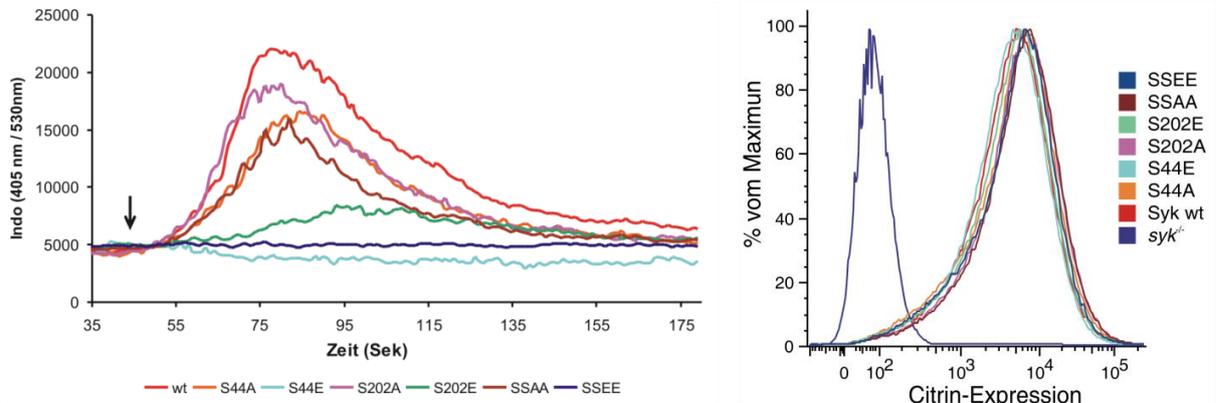


Abb. 39. Einfluss der Serine in den SH2-Domänen von Syk auf den BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom. Syk-defiziente DT40-Zellen wurden retroviral mit angegebenen Varianten von Citrin-Syk transfiziert und die resultierenden Zellen auf die Expression von Citrin-Syk (rechts) und auf ihren BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom hin untersucht (links). Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Ein Serin in vergleichbarer Position findet sich bei der überwiegenden Zahl der SH2-Domänen, somit wäre ein genereller Regulationsmechanismus von SH2-Domänen denkbar (siehe Abb. 40).

FER 2241	AQ	E	L	L	KK	-----	Q	L	F	L	V	R	E	S	H	G	K								
FES FPS 2242	VA	E	L	L	LVH	-----	S	L	F	L	V	R	E	S	Q	G	K								
BCAR3 SH2D3B NSP2 8412	VS	E	N	L	VQR	-----	D	E	F	L	V	R	D	S	L	S	S								
SH2D3C NSP3 10044	VS	E	T	L	VQR	-----	N	E	F	L	I	R	D	S	L	T	S								
SH2D3A NSP1 10045	KA	E	A	L	L	QQ	-----	D	E	F	L	V	R	A	G	S	R								
SHC1 SHCA 6464	EA	E	A	L	L	QL	-----	N	E	F	L	V	R	E	S	T	T								
SHC4 RaLP 399694	AA	E	S	L	L	VK	-----	D	E	F	L	V	R	E	S	A	T								
SHC2 SHCB SCK 25759	AA	E	R	M	L	RA	-----	D	E	F	L	V	R	D	S	V	T								
SHC3 SHCC NSHC 53358	EA	E	G	L	L	EK	-----	D	E	F	L	V	R	K	S	T	N								
APS 10603	AA	E	Q	L	V	L	A	G	G	P	---	R	N	H	L	F	V	I	R	C	S	E	T	R	
SH2B 25970	AA	E	Q	L	V	L	T	G	G	T	---	G	S	H	V	F	L	V	R	C	S	E	T	R	
LNK 10019	AA	E	Q	L	V	Q	L	Q	G	P	---	D	A	H	V	E	L	V	R	C	S	E	T	R	
CHN2 RhoGAP3 1124	QA	D	E	L	L	G	---	V	E	F	A	I	L	R	E	S	Q	R	Q						
CHN1 RhoGAP2 1123	AA	D	Q	L	L	I	V	---	A	E	F	E	Y	L	I	R	E	S	Q	R	Q				
RASA1_N RASGAP_N 5921	IA	D	E	R	L	R	Q	A	---	G	K	S	E	Y	L	I	R	E	S	D	R	R			
PLCG2_N 5336	EA	E	K	L	Q	E	Y	C	M	E	T	G	G	K	D	E	F	L	V	R	E	S	E	T	F
PLCG1_N 5335	IA	E	R	L	T	E	Y	C	I	E	T	G	A	D	D	S	E	L	V	R	E	S	E	T	F
RASA1_C RASGAP_C 5921	EA	Y	N	L	L	M	T	V	---	G	Q	V	C	S	F	L	V	R	P	S	D	N	T		
SHIP1 INPP5D 3635	KA	E	E	L	L	S	R	T	---	G	K	G	T	S	F	L	V	R	A	S	E	S	I		
SHIP2 INPPL1 3636	AA	D	E	L	L	A	R	A	---	G	R	D	S	F	L	V	R	D	S	E	S	V			

Abb. 40. Die meisten SH2-Domänen haben ein dem FLIR-Motiv benachbartes Serin. Zu sehen ist ein Vergleich verschiedener SH2-Domänen. Dem FLIR-Motiv (in Blau, Grün und Rot) benachbart liegt in der überwiegenden Anzahl der Fälle ein Serin (in Grau). Modifiziert nach Liu et al. (2006, supplementäre Daten, S. 1).

4.12 Prolinreiche Motive koppeln SLP65 über Cin85 an Syk

Die Rolle von SLP65 als direktes Substrat von Syk und als zentrales Element des Kalzium-Initiations-Komplexes konnte mehrfach gezeigt werden (Engelke et al. 2007). Unklar blieb jedoch, in welcher Weise SLP65 an die Phosphorylierung von Syk gekoppelt wird. Oellerich et al. (2011) konnten zeigen, dass das Adapterprotein

Cin85 mit seinen SH3-Domänen an Motive mit der Konsensussequenz PXPXR (Kurakin et al. 2003) in SLP65 bindet und dass diese Interaktion essentiell für die Rekrutierung und Phosphorylierung von SLP65 und die Bildung des Kalzium-Initiations-Komplexes ist.

Das Adapterprotein SLP76 erfüllt in T-Zellen eine Aufgabe, die der von SLP65 in B-Zellen entspricht und hat einen ähnlichen Aufbau wie SLP65 (Koretzky et al. 2006). Jedoch finden sich in SLP76 keine der in SLP65 vorhandenen SH3-Bindemotive. Durch einen Vergleich der Proteinsequenz der beiden Proteine konnte ich drei Stellen in SLP76 ausfindig machen, die den Prolinmotiven in SLP65 ähnlich sind. Durch insgesamt fünf Punktmutationen konnte ich die Motive in SLP76 konstruieren (siehe Abb. 41).

huSLP65	38 ^K KLKVKAK ^P PSV ^P PRDYASE ^E ₅₅	236 ^S PPPAAP ^S PLPRAGKKPT ^T ₂₅₃	301 ^K QIHQK ^P IPLPR ^F TEGGN ^N ₃₁₈
huSLP76	79 ^R SIFTRK ^P QVPR ^F PEETE ^E ₉₆	326 ^Q RPLPQ ^P ALLPMSNTFP ^F ₃₄₃	393 ^A EGRNF ^P LPLPNKPRPPS ^S ₄₁₀
huSLP76*	79 ^R SIFTR ^P QVPR ^F PEETE ^E ₉₆	326 ^Q RPLPQ ^P APLPR ^S SNTFP ^F ₃₄₃	393 ^A EGRNF ^P LPLPR ^R KPRPPS ^S ₄₁₀

Abb. 41. Vergleich der drei prolinreichen Motive von SLP65, SLP76 und mutiertem SLP76*. Konservierte Proline und Arginine sind fett dargestellt, die atypischen Prolin-Arginin-Motive jeweils eingerahmt. Die durch Mutagenese eingefügten Proline und Arginine, welche die drei CIN85 Bindemotive in SLP76* wiederherstellen, sind jeweils rot markiert. Modifiziert nach Oellerich et al. (2011, S.3630).

Durch retrovirale Rekonstitution von SLP65-defizienten DT40-Zellen mit Citrin-gekoppeltem SLP65, SLP76 wildtyp und mutiertem SLP76 (im Folgenden als SLP76* bezeichnet) konnte ich mittels Ko-Immunopräzipitation und anschließender Westernblot-Analyse zeigen, dass Cin85 sowohl an SLP65, als auch an SLP76*, nicht jedoch an SLP76 wildtyp bindet (Abb. 42).

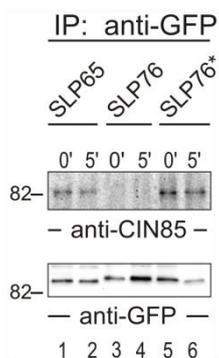


Abb. 42. SLP76* bindet an CIN85. SLP65-defiziente DT40-B-Lymphozyten wurden retroviral mit Citrin-markierten Versionen von wildtyp SLP65, wildtyp SLP76 und mutiertem SLP76* rekonstituiert. Die resultierenden Zellen wurden unstimuliert belassen oder für fünf min durch den BZR stimuliert und SLP65 beziehungsweise SLP76 wurde aus den Zellen durch Immunpräzipitation mittels eines Antikörpers gegen GFP isoliert. Die resultierenden Proben wurden durch Immunoblot mit Antikörpern gegen Cin85 untersucht. Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Oellerich et al. (2011, S.3630).

Mittels Westernblot-Analyse von immunopräzipitiertem SLP65 beziehungsweise SLP76 über das gekoppelte Citrin und mittels durchflusszytometrischer Analyse des Kalziumionen-Einstroms konnte ich des Weiteren zeigen, dass SLP76 wildtyp auf

einen BZR-Reiz hin weder phosphoryliert wird, noch dass es zu einem Kalziumionen-Einstrom kommt, hingegen SLP76* nach BZR-Stimulation phosphoryliert wird und einen Kalziumionen-Einstrom ermöglicht (siehe Abb. 43 und 44).

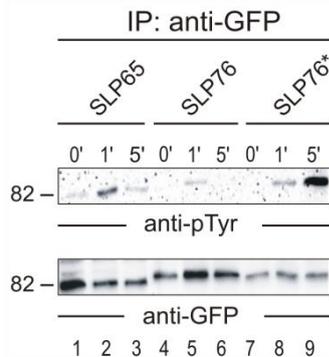


Abb. 43. SLP76* wird BZR-abhängig phosphoryliert. Die beschriebenen Zellen wurden unstimuliert belassen oder für angegebene Zeiten durch den BZR stimuliert und SLP65 beziehungsweise SLP76 wurde aus den Zellen immunopräzipitiert. Die resultierenden Proben wurden durch Immunoblot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Tyrosin untersucht. Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP diente als Ladekontrolle. Relative molekulare Massen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Modifiziert nach Oellerich et al. (2011, S.3630).

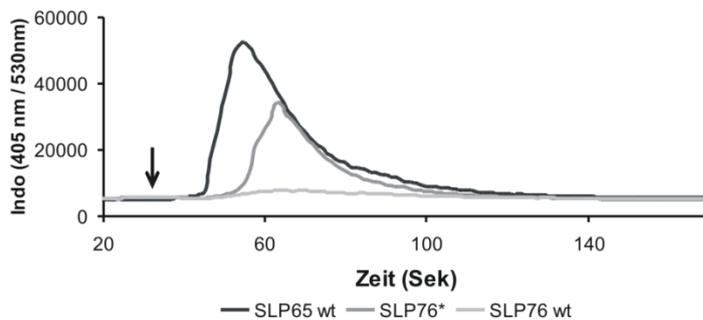


Abb. 44. SLP76* stellt den BZR abhängigen Kalziumionen-Einstrom in SLP65 defizienten DT40-B-Zellen wieder her. In den beschriebenen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie der BZR-abhängige Kalziumionen-Einstrom untersucht. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der BZR-Stimulation. Modifiziert nach Oellerich et al. (2011, S.3630).

In Zusammenarbeit mit Dr. M. Engelke konnte mittels konfokaler Laser-Mikroskopie des Weiteren gezeigt werden, dass SLP76* in BZR aktivierten B-Zellen an die Plasmamembran rekrutiert wird, während SLP76 wildtyp im Zytoplasma verbleibt (siehe Abb. 45).

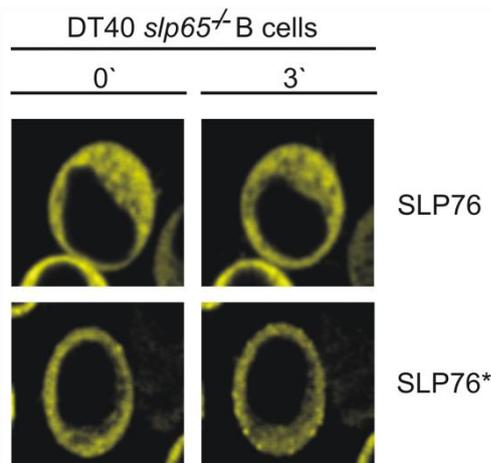


Abb. 45. Durch die Herstellung von CIN85-Bindemotiven kann SLP76* BZR-abhängig an die Membran rekrutiert werden. Die subzelluläre Lokalisation von Citrin gekoppeltem SLP76 und SLP76* wurde mittels konfokaler Laser-Mikroskopie in ruhenden und BZR-stimulierten (3 min) DT40-B-Zellen untersucht. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Messungen. Modifiziert nach Oellerich et al. (2011, S.3630).

Insgesamt konnte ich also mit fünf Punktmutationen eine Interaktion zwischen SLP76 und Cin85 ermöglichen, die ausreichend ist, SLP76 in BZR-aktivierten B-Zellen an die Plasmamembran zu rekrutieren und dort die Funktion von SLP65 zu erfüllen.

5. Diskussion

Die Beschreibung intrazellulärer Signalwege und ihrer Regulation hat sich zu einem zentralen Thema in der Erforschung zellulärer Funktionen entwickelt. Für das Verständnis der zahlreichen Aufgaben von Syk-abhängigen Signalwegen während der physiologischen Entwicklung und Aktivierung hämatopoetischer Zellen und ihrer malignen Transformation ist eine umfassende Kenntnis über die Regulation und Funktion von Syk nötig. Ziel dieser Studie war die Analyse der Phosphorylierungskinetik und des Interaktoms von Syk in Antigen-Rezeptor-stimulierten B-Lymphozyten und die Erforschung ihrer Bedeutung für die Regulation von Syk im BZR-Signalweg.

5.1 Die Phosphorylierungskinetik und das Interaktom von Syk

Mit der massenspektrometrischen Analyse der Phosphopeptide von affinitätspräzipitiertem humanem Syk aus Antigen-Rezeptor-stimulierten B-Lymphozyten konnten insgesamt 16 phosphorylierte Tyrosine, elf phosphorylierte Serine und sechs phosphorylierte Threonine gezeigt werden. Neben den 13 in B-Zellen bekannten Phosphorylierungsstellen (Geahlen 2009, Paris et al. 2010, Uckun et al. 2010 b) konnten 20 weitere als phosphoryliert identifiziert werden. Anzumerken sei, dass fast die Hälfte der gefundenen Phosphorylierungsstellen in der Interdomäne B liegen, die bereits als wichtig für die Regulation von Syk beschrieben wurde (Simon et al. 2005).

Für 26 dieser Phosphopeptide konnte mit Hilfe des SILAC-Verfahrens eine BZR-abhängige Kinetik der Phosphorylierung gemessen werden. Dabei konnten die Phosphorylierungsstellen anhand ihrer Kinetik in vier Gruppen eingeteilt werden (Olsen et al. 2006): frühe, späte, dephosphorylierte und konstante Phosphorylierungsstellen. Alle gefundenen Tyrosine zeigten dabei einen starken Anstieg der Phosphorylierung schon nach zwei Minuten und sind damit der ersten Gruppe zuzuordnen, was der beschriebenen Schlüsselrolle bei der Aktivierung von Syk durch die Phosphorylierung an Tyrosinen durch Lyn oder Syk selbst entspricht (Keshvara et al. 1998, Tsang et al. 2008). Die stärkste Veränderung der Phosphorylierung nach BZR-Stimulation zeigte das doppelt-phosphorylierte Phosphopeptid mit Tyrosin 348 und Tyrosin 352 in der regulatorischen Interdomäne B und das Phosphopeptid mit Tyrosin 526 in der katalytischen Domäne von Syk. Die Phosphorylierung der entsprechenden Peptide änderte sich zwei Minuten nach Stimulation um mehr als den Faktor zehn. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der bereits beschriebenen Wichtig-

keit dieser Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung von Syk (Simon et al. 2005). Ein mehr als fünffacher Anstieg der Phosphorylierung wurde an dem aktivatorisch wirksamen Tyrosin 525 und dem inhibitorisch wirksamen Tyrosin 323 gemessen. Auch die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen für die Funktion und Regulation von Syk ist mehrfach beschrieben worden (Zhang et al. 1998, Hong et al. 2002).

Eine ähnliche Kinetik und einen ebenfalls fünffachen Anstieg der Phosphorylierung konnte für Serin 297 gezeigt werden, dessen Bedeutung bisher unklar war. Die Phosphorylierung erfolgt etwas verzögert mit einem Maximum nach fünf Minuten.

Die Phosphorylierung der meisten anderen Serine und Threonine erfolgte ebenfalls etwas verzögert. Serin 579 zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung noch nach zehn Minuten und ordnet sich damit der zweiten Gruppe zu. Für Serin 202 konnte eine BZR-abhängige Dephosphorylierung gezeigt werden, es gehört damit der dritten Gruppe an. Serin 379 scheint durch den BZR nicht beeinflusst zu werden. Insgesamt zeigt sich also, dass die Phosphorylierung von Syk nach BZR-Stimulation nicht nur sehr ausgeprägt, sondern auch differenziert ist.

Einige der Phosphopeptide konnten sowohl als einfach als auch als doppelt phosphorylierte Varianten identifiziert werden, wodurch die Existenz von verschiedenen phosphorylierten Gruppen von Syk zu vermuten ist.

Durch die Analyse des Phosphorylierungsprofils von Syk in Antigen-Rezeptor-stimulierten humanen DG-75-B-Lymphozyten konnten viele der in DT40-Zellen gefundenen Phosphorylierungsstellen bestätigt werden, jedoch konnten insgesamt nur 17 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Eine Erklärung für die Differenz könnten speziesabhängige Unterschiede sein. Jedoch wurden bei der Aufreinigung von Strep-Syk aus DG-75-Zellen insgesamt weniger Peptide gewonnen, so dass vermutlich einige Phosphopeptide nicht vom Massenspektrometer erfasst werden konnten.

Durch die massenspektrometrische Analyse des Interaktoms von Syk aus ruhenden und BZR-stimulierten B-Zellen konnten über 25 Bindepartner von Syk bestimmt werden. Der größte Teil davon zeigte eine durch Stimulation induzierbare Bindung an Syk, konstitutive Bindepartner wie zum Beispiel der BZR sprechen für die These eines tonisch-aktiven BZR-Signalweges. Für die gefundenen neuen Interaktionspartner von Syk wurden zum Teil sehr unterschiedliche Funktionen in anderen Zellsystemen

beschrieben. Sek1 könnte als MAP-Kinase eine Verbindung zu Jnk und p38 (Moriguchi et al. 1995) darstellen, RhoH wurde als Adapterprotein in T-Zellen beschrieben (Li et al. 2002) und für TOM1L1 wurden Funktionen bei der ubiquitinabhängigen Endozytose des Wachstumsfaktorrezeptors beschrieben (Franco et al. 2006). Verschiedene Bindepartner aus der Gruppe des Zytoskeletts wie Aktin, Coronin1c (Rosentreter et al. 2007) und Dynein legen eine Regulation des Zytoskeletts durch Syk nahe. Als eine weitere Gruppe von Bindepartnern nach Stimulation konnten verschiedene Isoformen der Familie von 14-3-3-Adapterproteinen, die an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt sind (Aitken 2006), gezeigt werden.

Für Syk wurden in verschiedenen zellulären Kontexten und nach Stimulation verschiedenster Rezeptoren weitere Bindepartner beschrieben. Die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl, für die gezeigt wurde, dass sie an phosphoryliertes Tyrosin 323 bindet (Yankee et al. 1999), konnte in diesem Experiment nicht als Bindepartner identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die p85-Untereinheit der PI3K ebenfalls und mit höherer Affinität an Tyrosin 323 bindet (Moon et al. 2005), so dass es zu einer Verdrängung von Cbl gekommen sein könnte. Des Weiteren wurde eine Interaktion von Syk mit der γ 1-Isoform der Phospholipase C (PLC) beschrieben (Groesch et al. 2006), welche in DT40-Zellen nicht exprimiert wird. Eine Interaktion von Syk mit anderen Isoformen der PLC konnte in diesem Versuchsaufbau nicht gezeigt werden.

Insgesamt konnte durch die SILAC-basierte Analyse des Interaktoms von Syk in unstimulierten und BZR-stimulierten B-Zellen gezeigt werden, dass Syk in einem Netzwerk von Proteinen agiert, das viele Bereiche der zellulären Funktion beeinflusst. Es ist anzunehmen, dass die Basis der Organisation dieses Proteinnetzwerkes zumindest zum Teil in der komplexen und dynamischen Phosphorylierung von Syk nach BZR-Stimulation liegt.

Da weitere Bindepartner von Syk in anderen zellulären Systemen und nach Aktivierung anderer Syk-abhängiger Rezeptoren gefunden wurden, ist anzunehmen, dass das Interaktom von Syk abhängig ist vom jeweiligen zellulären Kontext und vom aktivierten Rezeptor. Mit dem beschriebenen Versuchsaufbau ist die Erforschung dieser Interaktome und auch die Phosphorylierungskinetik von Syk in anderen Syk-abhängigen Signalwegen möglich und, wie für den BZR-Signalweg gezeigt, ein effektiver Weg zu einem größeren Verständnis der Regulation dieser Signalwege.

5.2 Die Inhibition von Syk durch 14-3-3

14-3-3-Proteine, die als BZR-abhängige Interaktionspartner gefunden wurden, sind eine hochkonservierte Familie von sieben 30 kDa großen Adapterproteinen (Aitken 2006). Nach der Entdeckung 1965 (Moore und McGregor 1965) rückte diese Proteingruppe in den Interessensfokus der Forschung, als gezeigt werden konnte, dass sie an spezifische Bindemotive mit einem phosphorylierten Serin oder Threonin binden können (Muslin et al. 1996), wobei verschiedene Motive beschrieben wurden (Yaffe et al. 1997). Die beiden wichtigsten sind dabei das Typ-I-Motiv mit der Konsensussequenz R/KSXpSXP und das Typ-II-Motiv mit der Konsensussequenz RXF/YpSXP. Seither konnte für eine Vielzahl zellulärer Funktionen wie Zellzykluskontrolle, Apoptose und Signaltransduktion eine wichtige regulatorische Rolle von 14-3-3 gezeigt werden (Aitken 2006). Eine Rolle im proximalen BZR-Signalweg war bisher jedoch unbekannt.

Mittels Ko-Immunopräzipitation und Far-Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass nach BZR-Aktivierung 14-3-3 γ direkt an phosphoryliertes Serin 297, das massenspektrometrisch als eines der Hauptziele BZR-abhängiger Phosphorylierung identifiziert wurde, bindet. Die Umgebung von Serin 297 stimmt dabei genau mit dem Typ-I-Bindemotiv für 14-3-3-Moleküle überein.

Durch den massenspektrometrischen Vergleich der Interaktome von Strep-Syk wt und S297A konnte des Weiteren gezeigt werden, dass neben 14-3-3 γ auch 14-3-3 ϵ an Serin 297 bindet und dass 14-3-3 der einzige relevante Bindepartner von Serin 297 ist. Außerdem konnte eine verstärkte Bindung von Syk an Ig- β und eine stärkere Ubiquitylierung von 14-3-3-bindedefizientem Syk gezeigt werden. Die Inhibition der Bindung von Syk an Ig- β durch 14-3-3 könnte auch die Funktion von Syk insgesamt hemmen, da die Bindung der Tandem-SH2-Domäne an phosphorylierte ITAM-Motive wie die in Ig- β zur Aktivierung von Syk führt (Tsang et al. 2008). Über die Ubiquitylierung, die ebenfalls durch 14-3-3 gehemmt zu werden scheint, ist ein inhibitorischer Effekt beschrieben (Rao et al. 2001).

Durch Analyse der Phosphorylierung und Bildung des Kalzium-Initiations-Komplexes sowie durch Analyse des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms in DT40-Zellen, welche die S297A Variante von Syk exprimieren, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bindung von 14-3-3 an Syk insgesamt inhibierend auf den BZR-Signalweg wirkt. Insgesamt überwiegt also die negative Regulation von Syk durch 14-3-3 durch

die Reduktion der Bindung von Syk an Ig- β die theoretisch denkbare positive Regulation durch die Verminderung der Ubiquitylierung von Syk.

Beim Kalziumionen-Einstrom ist zu beachten, dass vor allem der Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum gehemmt wird. Dieser erfolgt nach dem Einstrom aus intrazellulären Speichern über die Aktivierung von IP3-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum durch sogenannte *store operated Kalzium channels* (Engelke et al. 2007), die neben einer stärkeren Aktivierung des Kalzium-Initiations-Komplexes ebenfalls durch Syk beeinflusst werden könnten.

Eine Beeinflussung der Syk-Aktivität hat über den BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom hinaus vermutlich weitreichende Folgen für den gesamten BZR-Signalweg. In dieser Studie konnte auf diese Aspekte nicht näher eingegangen werden, es wäre jedoch interessant zu wissen, inwiefern die Bindung von 14-3-3 an Syk die Aktivierung von MAP-Kinasen wie Erk oder NF- κ B oder die Aktivierung der antiapoptotischen Kinase Akt beeinflusst. Ebenfalls interessant wäre es zu wissen, welchen Einfluss die 14-3-3-bindedefiziente Syk-Variante auf die Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen *in vivo* hat.

Durch die computergestützte Analyse der Sequenz von Syk konnten sechs weitere potentielle Bindemotive für 14-3-3 in Syk gefunden werden. In fünf dieser Motive konnte ein phosphoryliertes Serin oder Threonin massenspektrometrisch identifiziert werden, jedoch konnte durch Mutationsanalysen kein Einfluss dieser potentiellen Motive auf die Bindung von 14-3-3 an Syk gezeigt werden. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass 14-3-3, nach dem es an Serin 297 gebunden hat, hierarchisch auch an eines oder mehrere der anderen potentiellen Bindemotive bindet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mutation von Serin 297 zu Alanin ausreichend ist, um sowohl die Bindung zu 14-3-3 aufzuheben, als auch die Funktion von Syk im BZR-Signalweg zu verändern.

Das Bindemotiv für 14-3-3 liegt in einem Bereich der Interdomäne B, dem sogenannten *linker insert*, das in einer kürzeren Isoform von Syk (Syk-B), nicht exprimiert wird (Rowley et al. 1995). Unterschiede dieser beiden Isoformen konnten bereits für verschiedene Signalwege gezeigt werden (Latour et al. 1998). Syk-B wird verstärkt im Knochenmark (Latour et al. 1996) und Brustkrebszellen (Wang L et al. 2003) exprimiert, was vermuten lässt, dass die Abwesenheit der 14-3-3-Bindung an Syk sowohl bei der Entwicklung von hämatopoietischen Zellen als auch von Syk-abhängigen Ma-

lignomen eine Rolle spielt. Der BZR-abhängige Kalziumionen-Einstrom in B-Zellen, die Syk-B exprimieren, ist drastisch verringert. Es wurde bereits vermutet, dass das *linker insert* als eine Art Gelenkregion in Syk agiert, die für die Änderung der geschlossenen und inaktiven Form in die geöffnete und aktive Form zuständig ist (Lator et al. 1998). Die Interaktion mit 14-3-3 in diesem Bereich könnte die Gelenkfunktion stören und auf diesem Weg die Funktion von Syk beeinflussen. In dem Homolog von Syk in T-Zellen Zap70 fehlt ebenfalls das in Syk gefundene Motiv für die Bindung von 14-3-3, wodurch eine Unterscheidung der Regulation von Syk und Zap70 möglich wäre.

Vorstellbar wäre, dass durch die Bindung von 14-3-3 die Kinase-Aktivität von Syk inhibiert wird, womit die Inhibition der Phosphorylierung von SLP65 und PLC- γ 2 erklärt werden könnte. Jedoch konnte durch ein ELISA-basiertes *in vitro* Experiment kein Unterschied in der Kinase-Aktivität von wildtyp zu S297A Syk gezeigt werden.

Deshalb erscheint die Erklärung, dass 14-3-3 die Aktivität von Syk im BZR-Signalweg über die Beeinflussung der subzellulären Lokalisation und damit der Verfügbarkeit von Substraten von Syk inhibiert, naheliegender. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass durch Mutation von Serin 297 zu Alanin die Membranrekrutierung von Syk deutlich verstärkt und verlängert wird. Ein Modell wäre, dass Syk nach BZR-Stimulation über Ig- α und Ig- β an die Plasmamembran rekrutiert und dort an Serin 297 phosphoryliert wird, wodurch 14-3-3 an Syk binden und es von der Plasmamembran sequestrieren kann. Diese Art der Regulation wurde auch für andere Signalproteine wie Gab2 beschrieben (Brummer et al. 2008). Da durch reverse Proteomik gezeigt werden konnte, dass S297A Syk stärker an Ig- β bindet, ist denkbar, dass 14-3-3 die Interaktion von Syk und Ig- β stört.

Mit diesem Modell wäre auch der Zusammenhang der 14-3-3- und der Cbl-abhängigen Hemmung von Syk zu erklären. Das Ausmaß der 14-3-3-abhängigen Hemmung der BZR-abhängigen Kalziumionen-Mobilisierung ist mit der Cbl-abhängigen Inhibition vergleichbar. Werden beide Inhibitionsmechanismen durch Mutation von Serin 297 und Tyrosin 323 ausgeschaltet, kommt es zur Addition der Effekte. Das deutet daraufhin, dass beide Mechanismen prinzipiell unabhängig voneinander sind. Jedoch zeigt die S297A Mutante eine stärkere BZR abhängige Ubiquitylierung. Dieser Effekt scheint der inhibitorischen Funktion von Serin 297 zu widersprechen, da die Ubiquitylierung als inhibitorisch für Syk beschrieben wurde

(Rao et al. 2001). Jedoch hat Cbl durch die stärkere und längere Rekrutierung von Syk S297A an die Plasmamembran auch verstärkten Substratzugang zu Syk. Der Effekt der S297A Mutation bedeutet insgesamt eine Verstärkung des proximalen BZR-Signalweges, somit ist davon auszugehen, dass quantitativ der Effekt der stärkeren Membranlokalisierung die verstärkte Hemmung durch Cbl überwiegt.

Insgesamt stellt die Assoziation von Syk mit 14-3-3 die erste beschriebene serinabhängige Inhibition von Syk dar.

Während der Fertigstellung dieser Arbeit berichten Paris et al. (2010), dass murines Syk an Serin 291 (entspricht Serin 297 in humanem Syk) durch die Protein-Kinase C (PKC) BZR-abhängig phosphoryliert wird. Die in dieser Arbeit ermittelte Bindung von 14-3-3 an Syk und die nachfolgende Inhibition der Syk-Funktion im BZR-Signalweg würde zu der beschriebenen inhibitorischen Funktion der PKC im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife passen (Sidorenko et al. 1996).

Paris et al. (2010) zeigten jedoch, dass eine Mutation von Serin 291 zu Alanin zu einer verminderten Assoziation von Syk mit dem Chaperon-Protein Prohibition und zu einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT in BZR-stimulierten DT40-Zellen führt. Eine Interaktion von 14-3-3 mit dem phosphorylierten Serin 291 konnte für 14-3-3 in dieser Studie nicht gezeigt werden. Prinzipiell wäre es möglich, dass für das beschriebene Serin ein Unterschied in der Regulierung von murinem und humanem Syk besteht, der auch erklären könnte, warum Prohibitin in den in dieser Arbeit durchgeführten SILAC-Experimenten des Interaktoms von humanem Syk nur als unspezifisches Hintergrundprotein auftaucht. Jedoch ist dies bei dem evolutionär-konservierten Typ-I-Bindemotives unwahrscheinlich. Weitere vergleichende Experimente müssten erfolgen, um einen Unterschied sicher auszuschließen.

Abbildung 46 zeigt ein mögliches Modell, wie 14-3-3 die Aktivität von Syk im BZR-Signalweg nach den Ergebnissen dieser Arbeit regulieren könnte.

Da 14-3-3-Proteine ubiquitär exprimiert werden (Aitken 2006), ist generell vorstellbar, dass sie auch in anderen Zellen als der B-Zelle nach Rezeptorstimulation an Syk binden und so Syk inhibieren können. Die Erforschung der Funktionen der 14-3-3-Bindung an Syk in anderen Zellsystemen könnte dies belegen. Die weitere Erforschung der Regulation von Syk durch 14-3-3 in maligne transformierten B-Zellen

könnte Hinweise auf die Pathogenese von B-Zell-Lymphomen liefern. Es wäre beispielsweise interessant zu wissen, ob Mutationen von Serin 297 in Lymphomen vorliegen.

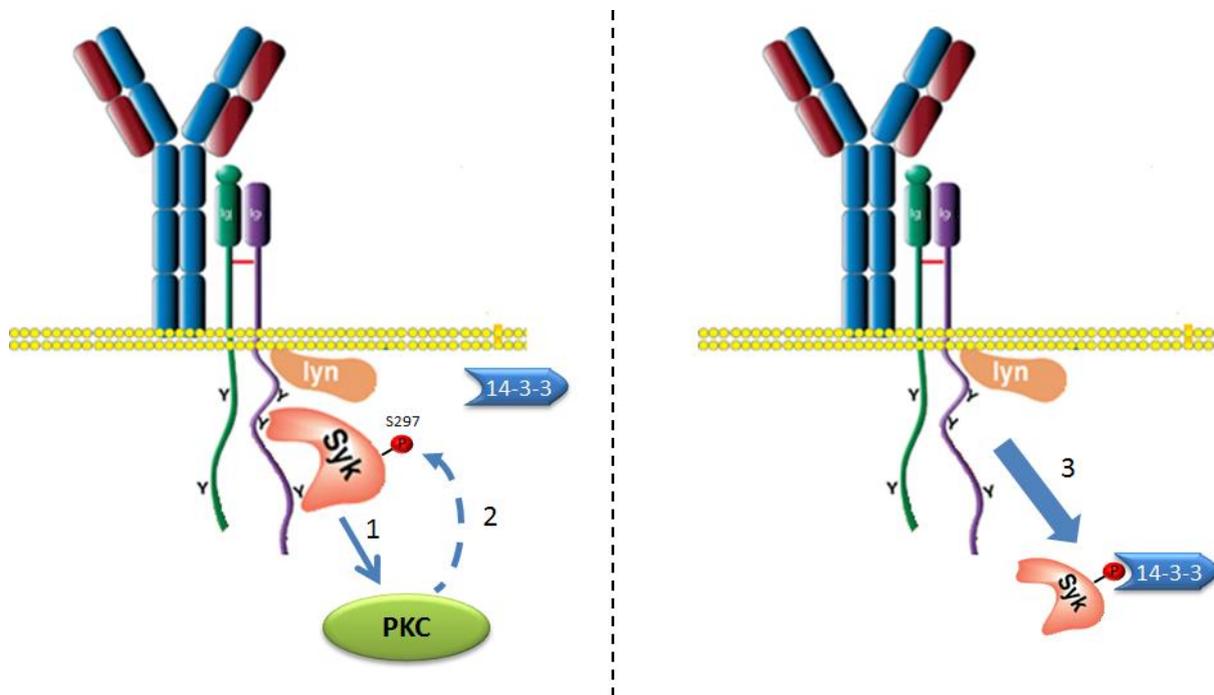


Abb. 46. Modell. Die Abbildung zeigt ein mögliches Modell, wie die Funktion von Syk nach Aktivierung des BZR durch 14-3-3 gehemmt werden könnte. Syk bindet nach Aktivierung des BZR mit der Tandem-SH2-Domäne an die Tyrosine in den ITAM-Motiven von Ig-α und Ig-β und wird dadurch aktiviert. Über die Aktivierung der PLC-γ kommt es unter anderem auch zur Aktivierung der PKC (linke Seite, 1). Die PKC phosphoryliert darauf hin Syk an Serin 297 (linke Seite, 2). Das phosphorylierte Serin 297 und die umliegenden Aminosäuren in Syk stellen ein Typ-I-Bindemotiv für 14-3-3 dar, das nun an Syk bindet und damit die Interaktion von Syk mit Ig-β stört, so dass Syk vom aktivierten BZR dissoziiert, also von 14-3-3 sequestriert wird (rechte Seite, 3). Modifiziert nach Wang LD und Clark (2003, S.412).

5.3 Serinabhängige Beeinflussung der SH2-Domänen von Syk

Die massenspektrometrische Analyse der Phosphorylierung von Syk ergab, dass Syk insgesamt an 16 Tyrosinen und 17 Serinen und Threoninen phosphoryliert wird. Es ist anzunehmen, dass nicht nur Serin 297 wichtig für die Funktion und Regulation von Syk ist. Vier der gefundenen Phosphorylierungsstellen befinden sich in den SH2-Domänen von Syk. Die Bindetasche der SH2-Domäne enthält dabei das funktionell essentielle Motiv F/Y L I/L R, im Folgenden als FLIR-Motiv bezeichnet (Waksman et al. 1993). Die N-terminale SH2-Domäne von Syk enthält direkt benachbart zu diesem Motiv das als phosphoryliert gefundene Serin 44. Das FLIR-Motiv der C-terminalen

SH2-Domäne wird durch eine Schleife in der Tertiärstruktur von Serin 202, das ebenfalls als phosphoryliert gefunden wurde, flankiert.

Es ist vorstellbar, dass eine negative Ladung durch eine Phosphatgruppe an dieser Stelle die Interaktion der SH2-Domäne mit einem Phospho-Tyrosin-Motiv hemmt. Tatsächlich konnte durch gezielte Mutagenese dieser Serin-Reste zu negativ geladenem Glutamat eine weitestgehende (S202E) beziehungsweise vollständige Supprimierung des BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstroms erreicht werden, vermutlich über eine Inhibition der Interaktion von Syk mit phosphorylierten ITAM-Motiven. Jedoch wurde auch durch die Mutation der Serine zu Alanin der Kalziumionen-Einstrom jeweils verringert. Es bleibt zu vermuten, dass das unphosphorylierte Serin an dieser Stelle die Interaktion der SH2-Domäne mit dem phosphoryliertem Tyrosin unterstützt, die Interaktion jedoch durch Phosphorylierung unterbrochen wird.

Für Serin 202 wurde eine BZR-abhängige Dephosphorylierung gezeigt. Möglich wäre, dass die Phosphorylierung von Serin 202 Syk in einen inaktiven Zustand versetzt, der durch BZR-Stimulation aufgehoben wird. Denkbar wäre auch die Regulation der BZR-Antwort in unterschiedlichen B-Zell-Subtypen durch den Phosphorylierungszustand von Serin 202. Weitere Experimente müssten jedoch folgen, um diese Annahmen zu überprüfen.

Ein Vergleich von SH2-Domänen verschiedener Proteine zeigt, dass sich bei der überwiegenden Anzahl aller FLIR-Motive ein Serin in vergleichbarer Position befindet. Für SLP65 konnte das entsprechende Serin 471 auch als späte Phosphorylierungsstelle gezeigt werden (Oellerich et al. 2009). Eine weitere Erforschung der Bedeutung der Serine in den SH2-Domänen von Syk könnte das Verständnis über die Regulation von SH2-Domänen generell verbessern.

5.4 Cin85 koppelt SLP65 an Syk

SLP65 stellt eines der Hauptsubstrate von Syk dar und ist über die Rekrutierung der Phospholipase PLC- γ 2 und der Tyrosin-Kinase Btk essentiell für die Bildung des Kalzium-Initiations-Komplexes und den folgenden BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom. Unklar ist, wie SLP65 an die Phosphorylierung durch Syk gekoppelt wird. Neben der wichtigen Rolle des N-terminalen Leucin-Zippers (Köhler et al. 2005) und der SH2-Domäne (Abudula et al. 2007) von SLP65 konnten Oellerich et al. (2011) die Bedeutung der Bindung von Cin85 an prolinreiche SH3-Bindemotiven für die

Phosphorylierung und Rekrutierung von SLP65 und die Bildung des Kalzium-Initiations-Komplexes zeigen.

Prinzipiell ergeben sich zwei Möglichkeiten, wie Cin85 die Rekrutierung und Phosphorylierung von SLP65 beeinflusst. Entweder ist Cin85 über die Bindung seiner drei SH3-Domänen an die drei prolinreichen Motive wichtig für die Struktur von SLP65 oder Cin85 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von SLP65 und bringt es über weitere, bisher unbekannte Interaktionen in die Nähe des BZR und von Syk.

Zur Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten wurde ein Vergleich der Funktion von SLP65 zu SLP76 durchgeführt. SLP76 erfüllt in T-Zellen eine ähnliche Aufgabe wie SLP65 in B-Zellen, jedoch ist der Rekrutierungsmechanismus an die Plasmamembran für SLP76 über das Transmembranprotein LAT weitestgehend geklärt (Koretzky et al. 2006). SLP76 kann die Funktion von SLP65 als zentrales Element des Kalzium-Initiations-Komplexes in B-Zellen nicht übernehmen, wenn nicht gleichzeitig LAT exprimiert wird (Wong et al. 2000).

In SLP76 finden sich keine SH3-Bindemotive, die denen von SLP65 entsprechen, jedoch konnten alle drei in SLP65 enthaltenden Motive über insgesamt fünf Punktmutationen in SLP76 an vergleichbaren Stellen konstruiert werden. Es zeigte sich, dass das mutierte SLP76 (im Folgenden als SLP76* bezeichnet) an Cin85 binden und durch Syk phosphoryliert werden kann. Anders als SLP76 kann SLP76* so auch den BZR-abhängigen Kalziumionen-Einstrom in SLP65-defizienten DT40-B-Zellen wiederherstellen. Auch kann SLP76* BZR-abhängig an die Plasmamembran rekrutiert werden, während SP76 im Zytoplasma verbleibt.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass Cin85, neben einer weiterhin möglichen Beeinflussung der Struktur von SLP65, eine BZR-abhängig Kopplung von SLP-Adapterproteinen an die Phosphorylierung durch Syk bewirkt.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen der Phosphorylierungskinetik und des Interaktoms von Syk neue regulatorische Elemente im BZR-Signalweg zu finden.

Es ist gelungen, 33 Phosphorylierungsstellen und die BZR-abhängige Kinetik von 25 dieser Stellen zu bestimmen, wobei die einzelnen Phosphorylierungsstellen eine differenzierte Kinetik aufweisen. Eine der am häufigsten nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen ist Serin 297, das einen starken BZR-abhängigen Anstieg der Phosphorylierung zeitlich etwas nach dem Großteil der Tyrosine zeigt.

Durch die Analyse des Interaktoms konnte gezeigt werden, dass Syk in einem Netzwerk von über 25 Interaktionspartnern unterschiedlichster Funktion agiert. Damit stellt diese Arbeit eine Datenbank an Phosphorylierungsstellen und Bindepartnern von Syk dar, die zur Generierung neuer Hypothesen über die Funktionsweisen von Syk genutzt werden kann.

Eine neu gefundene Gruppe von Interaktionspartnern ist die 14-3-3-Familie von Adapterproteinen. Durch gezielte Mutation potentieller 14-3-3-Bindemotive, die gefundene Phosphoserine und Phosphothreonine enthalten, konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 γ nach BZR-Stimulation direkt an Phosphoserin 297 bindet. Dieser Komplex reduziert die Rekrutierung von Syk an die Plasmamembran, inhibiert dadurch den proximalen BZR-Signalweg und stellt damit die erste beschriebene serinabhängige Inhibition von Syk dar. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten leisten somit einen Beitrag zum Verständnis der Regulation von Syk im BZR-Signalweg und wegen der ubiquitären Expression von 14-3-3 ist davon auszugehen, dass auch in weiteren Zell- und Rezeptorsystemen eine vergleichbare Inhibition von Syk stattfindet.

Durch die Mutation von als phosphoryliert gefundenen Serinen in den SH2-Domänen von Syk konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es weitere Serin-abhängige Regulationsmechanismen von Syk geben könnte. Da die mutierten Serine in vergleichbarer Position in einer Vielzahl von SH2-Domänen vorliegen, könnte es sich um einen generellen Mechanismus handeln.

7. Literaturverzeichnis

- Abbas A, Lichtmann A, Pillai S: Cellular and Molecular Immunology. 6. Auflage. Elsevier Saunders, Philadelphia 2007
- Abudula A, Grabbe A, Brechmann M, Polaschegg C, Herrmann N, Goldbeck I, Dittmann K, Wienands J (2007): SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk. *J Biol Chem* 282, 29059-29066
- Adams J (2003): Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* 42, 601-607
- Aitken A (2006): 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* 16, 162-172
- Arias-Palomo E, Recuero-Checa M, Bustelo X, Llorca O (2007): 3D structure of Syk kinase determined by single-particle electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1774, 1493-1499
- Arias-Palomo E, Recuero-Checa M, Bustelo X, Llorca O (2009): Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1794, 1211-1217
- Baba T, Humphries E (1984): Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines. *Virology* 135, 181-188
- Ben-Bassat H, Goldblum N, Mitrani S, Goldblum T, Yoffey J, Cohen M, Bentwich Z, Ramot B, Klein E, Klein G (1977): Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer* 19, 27-33
- Bohnenberger H, Oellerich T, Engelke M, Hsiao H, Urlaub H, Wienands J (2011): Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells. *Eur J Immunol* 41, 1550-1562
- Brack C, Hiramata M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S (1978): A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1-14
- Bradford M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brummer T, Larance M, Herrera Abreu M, Lyons R, Timpson P, Emmerich C, Fleuren E, Lehrbach G, Schramek D, Guilhaus M, James D, Daly R (2008): Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 terminates signalling by the Gab2 docking protein. *EMBO J* 27, 2305-2316
- Brunati A, Donella-Deana A, Ruzzene M, Marin O, Pinna L (1995): Site specificity of p72syk protein tyrosine kinase: efficient phosphorylation of motifs recognized by Src homology 2 domains of the Src family. *FEBS Lett.* 367, 149-152
- Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholomé K, Burger M, Chevalier N, Vallat L, Timmer J, Gribben J, Jumaa H, Veelken H, Dierks C, Zirlik K (2009): Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 69, 5424-5432

- Campbell M, Sefton B (1992): Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 12, 2315-2321
- Chan A, Iwashima M, Turck C, Weiss A (1992): ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-662.
- Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig T, Habermann T, Kutok J, Shipp M (2008): SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111, 2230-2237
- Cheng A, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen J, Pawson T (1995): Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303-306
- Chiu C, Dalton M, Ishiai M, Kurosaki T, Chan A (2002): BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J* 21, 6461-6472
- Choudhary C, Mann M (2010): Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 427-439
- Cook R, Wu C, Kang Y, Han J (2007): The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* 4, 253-259
- Cooper N (1985): The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* 37, 151-216
- Coughlin J, Stang S, Dower N, Stone J (2005): RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J Immunol* 175, 7179-7184
- Cox J, Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372
- Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen J, Mann M (2009): A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4, 698-705
- Crabtree G, Olson E (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109, 67-79
- Davies D, Cohen G (1996): Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7-12
- Deckert M, Tartare-Deckert S, Couture C, Mustelin T, Altman A (1996): Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* 5, 591-604
- DeFranco A, Chan V, Lowell C (1998): Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function. *Semin Immunol* 10, 299-307
- Deindl S, Kadlecsek T, Brdicka T, Cao X, Weiss A, Kuriyan J (2007): Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 129, 735-746.
- Diella F, Haslam N, Chica C, Budd A, Michael S, Brown N, Trave G, Gibson T (2008): Understanding eukaryotic linear motifs and their role in cell signaling and regulation. *Front Biosci* 13, 6580-6603

- Dower W, Miller J, Ragsdale C (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-45
- Engelke M, Friedrich O, Budde P, Schäfer C, Niemann U, Zitt C, Jüngling E, Rocks O, Lückhoff A, Frey J (2002): Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett* 523, 193-199
- Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B, Wienands J (2007): Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* 218, 235-246
- Falasca M, Logan S, Lehto V, Baccante G, Lemmon M, Schlessinger J (1998): Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17, 414-422
- Fearon D, Locksley R (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53
- Fenn J, Mann M, Meng C, Wong S, Whitehouse C (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71
- Flaswinkel H, Reth M (1994): Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J* 13, 83-89
- Foletta V, Segal D, Cohen D (1998): Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63, 139-152
- Franco M, Furstoss O, Simon V, Benistant C, Hong W, Roche, Risch, Schweiz S (2006): The adaptor protein Tom1L1 is a negative regulator of Src mitogenic signaling induced by growth factors. *Mol Cell Biol* 26, 1932-1947
- Friedberg J, Sharman J, Sweetenham J, Johnston P, Vose J, Lacasce A, Schaefer-Cuttillo J, De Vos S, Sinha R, Leonard J, Cripe L, Gregory S, Sterba M, Lowe A, Levy R, Shipp M (2010): Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115, 2578-2585
- Fu C, Turck C, Kurosaki T, Chan A (1998): BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, 93-103
- Furlong M, Mahrenholz A, Kim K, Ashendel C, Harrison M, Geahlen R (1997): Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim Biophys Acta* 1355, 177-190
- Geahlen R (2009): Syk and pTyr'd: Signaling through the B cell antigen receptor. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1115-1127
- Goitsuka R, Fujimura Y, Mamada H, Umeda A, Morimura T, Uetsuka K, Doi K, Tsuji S, Kitamura D (1998): BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* 161, 5804-5808
- Goodnow C, Cyster J, Hartley S, Bell S, Cooke M, Healy J, Akkaraju S, Rathmell J, Pogue S, Shokat K (1995): Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol* 59, 279-368
- Goodnow C, Vinuesa C, Randall L, Mackay F, Brink R (2010): Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 11, 681-688

- Groesch T, Zhou F, Mattila S, Geahlen R, Post C (2006): Structural basis for the requirement of two phosphotyrosine residues in signaling mediated by Syk tyrosine kinase. *J Mol Biol* 356, 1222-1236
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80
- Hong J, Yankee T, Harrison M, Geahlen R (2002): Regulation of signaling in B cells through the phosphorylation of Syk on linker region tyrosines. A mechanism for negative signaling by the Lyn tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277, 31703-31714
- Huse M, Kuriyan J (2002): The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282.
- Hutchcroft J, Harrison M, Geahlen R (1992): Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *J Biol Chem* 267, 8613-8619
- Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U (1991): Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389-392
- Janeway C, Medzhitov R (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216
- Karakawa W, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann W (1988): Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 56, 1090-1095
- Kersey P, Duarte J, Williams A, Karavidopoulou Y, Birney E, Apweiler R (2004): The International Protein Index: An integrated database for proteomics experiments. *Proteomics* 4, 1985-1988
- Keshvara L, Isaacson C, Yankee T, Sarac R, Harrison M, Geahlen R (1998): Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *J Immunol* 161, 5276-5283
- Kitaura Y, Jang I, Wang Y, Han Y, Inazu T, Cadera E, Schlissel M, Hardy R, Gu H (2007): Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b. *Immunity* 26, 567-578
- Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin J, Mumford D (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5, 319-34
- Köhler F, Storch B, Kulathu Y, Herzog S, Kuppig S, Reth M, Jumaa H (2005): A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP65. *Nat Immunol* 6, 204-210
- Koretzky G, Abtahian F, Silverman M (2006): SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6, 67-78
- Kulathu Y, Hobeika E, Turchinovich G, Reth M (2008): The kinase Syk as an adaptor controlling sustained Calcium signalling and B-cell development. *EMBO J* 27, 1333-1344

- Kulathu Y, G Roth, Karlsruhe G, Reth M (2009): Autoinhibition and adapter function of Syk. *Immunol Rev* 232, 286-299
- Kurakin A, Wu S, Bredeisen D (2003): Atypical recognition consensus of CIN85/SETA/Ruk SH3-Domains revealed by target-assisted iterative screening. *J Biol Chem* 278, 34102-34109
- Kurosaki T, Takata M, Yamanashi Y, Inazu T, Taniguchi T, Yamamoto T, Yamamura H (1994): Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* 179, 1725-1729
- Kurosaki T, Johnson S, Pao L, Sada K, Yamamura H, Cambier J (1995): Role of the Syk autophosphorylation site and SH2-Domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 182, 1815-1823
- Kurosaki T, Maeda A, Ishiai M, Hashimoto A, Inabe K, Takata M (2000): Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells. *Immunol Rev* 176, 19-29
- Laemmli U (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lam K, Kühn R, Rajewsky K (1997): In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-83
- Larsen M, Thingholm T, Jensen O, Roepstorff P, Jørgensen T (2005): Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 4, 873-486
- Latour S, Chow L, Veillette A (1996): Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271, 22782-22790
- Latour S, Zhang J, Siraganian R, Veillette A (1998): A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *EMBO J* 17, 2584-2595
- Li X, Bu X, Lu B, Avraham H, Flavell R, Lim B (2002): The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* 22, 1158-1171
- Liu B, Jablonowski K, Raina M, Arcé M, Pawson T, Nash P (2006): The human and mouse complement of SH2-Domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol Cell* 22, 851-868
- Löffert D, Schaal S, Ehlich A, Hardy R, Zou Y, Müller W, Rajewsky K (1994): Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting. *Immunol Rev* 137, 135-53
- Ma H, Yankee T, Hu J, Asai D, Harrison M, Geahlen R (2001): Visualization of Syk-antigen receptor interactions using green fluorescent protein: differential roles for Syk and Lyn in the regulation of receptor capping and internalization. *J Immunol* 166, 1507-1516
- Marshall A, Niirio H, Yun T, Clark E (2000): Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev* 176, 30-46

- McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L (2011): Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 12, 24-34
- Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz V (2010): The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10, 387-402
- Moon K, Post C, Durden D, Zhou Q, De P, Harrison M, Geahlen R (2005): Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 280, 1543-1551
- Moore B und McGregor D (1965): Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem* 240: 1647-1653
- Moriguchi T, Kawasaki H, Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E (1995): Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinases. Existence of novel activators. *J Biol Chem* 270, 12969-12972
- Morita S, Kojima T, Kitamura T (2000): Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273
- Murphy K, Travers P, Walport M: *Janesway's Immunobiology*. 7. Auflage. Garland Science, New York 2008
- Muslin A, Tanner J, Allen P, Shaw A (1996): Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889-897
- Obenauer J, Cantley L, Yaffe M (2003): Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31, 3635-3641
- Oellerich T, Grønborg M, Neumann K, Hsiao HH, Urlaub H, Wienands J (2009): SLP65 phosphorylation dynamics reveals a functional basis for signal integration by receptor-proximal adaptor proteins. *Mol Cell Proteomics* 8, 1738-1750
- Oellerich T, Bremes V, Neumann K, Bohnenberger H, Dittmann K, Hsiao HH, Engelke M, Schnyder T, Batista F, Urlaub H, Wienands J (2011): The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85. *EMBO J* 30, 3620-3634
- Olsen J, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006): Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648
- Ong S, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D, Steen H, Pandey A, Mann M (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386
- Paris L, Hu J, Galan J, Ong S, Martin V, Ma H, Tao W, Harrison M, Geahlen R (2010): Regulation of Syk by phosphorylation on serine in the linker insert. *J Biol Chem* 285, 39844-39854

- Perkins D, Pappin D, Creasy D, Cottrell J (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567
- Pogue S, Kurosaki T, Bolen J, Herbst R (2000): B cell antigen receptor-induced activation of Akt promotes B cell survival and is dependent on Syk kinase. *J Immunol* 165, 1300-1306
- Rao N, Ghosh A, Ota S, Zhou P, Reddi A, Hakezi K, Druker B, Wu J, Band H (2001): The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J* 20, 7085-7095
- Reth M (1989): Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384
- Rinehart J, Maksimova Y, Tanis J, Stone K, Hodson C, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo C, Forbush B, Joiner C, Gulcicek E, Gallagher P, Lifton R (2009): Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell* 138, 525-536
- Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel W, Zürn C, Reth M (2002): Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell* 10, 1057-1069
- Rosentreter A, Hofmann A, Xavier CP, Stumpf M, Noegel AA, Clemen C (2007): Coronin 3 involvement in F-Aktin-dependent processes at the cell cortex. *Exp Cell Res* 313, 878-895
- Rowland S, DePersis C, Torres R, Pelanda R (2010): Ras activation of Erk restores impaired tonic BZR signaling and rescues immature B cell differentiation. *J Exp Med* 207, 607-621
- Rowley R, Bolen J, Fargnoli J (1995): Molecular cloning of rodent p72Syk. Evidence of alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 270, 12659-12664
- Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H (2001): Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem* 130, 177-186
- Sadygov R, Cociorva D, Yates J (2004): Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. *Nat Methods* 1, 195-202
- Saito K, Scharenberg A, Kinet J (2001): Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *J Biol Chem* 276, 16201-16206
- Salomons F, Acs K, Dantuma N (2010): Illuminating the ubiquitin/proteasome system. *Exp Cell Res* 316, 1289-1295
- Sanchez M, Misulovin Z, Burkhardt AL, Mahajan S, Costa T, Franke R, Bolen J, Nussenzweig M (1993): Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *J Exp Med* 178, 1049-1055
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467
- Saouaf S, Mahajan S, Rowley R, Kut S, Fargnoli J, Burkhardt A, Tsukada S, Witte O, Bolen J (1994): Temporal differences in the activation of three classes of non-

- transmembrane protein tyrosine kinases following B-cell antigen receptor surface engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9524-9528.
- Schulze W, Mann (2004): A novel proteomic screen for peptide-protein interactions. *J Biol Chem* 279, 10756-64
- Scigelova M, Makarov A (2006): Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6, 16-21
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J, Mann M (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856-2860
- Shinohara H, Kurosaki T (2009): Comprehending the complex connection between PKC β , TAK1, and IKK in BZR signaling. *Immunol Rev* 232, 300-318
- Sidorenko S, Law C, Klaus S, Chandran K, Takata M, Kurosaki T, Clark E (1996): Protein kinase C μ (PKC μ) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity* 5, 353-363
- Simon M, Vanes L, Geahlen R, Tybulewicz V (2005): Distinct roles for the linker region tyrosines of Syk in Fc ϵ RI signaling in primary mast cells. *J Biol Chem* 280, 4510-4517
- Sohn H, Tolar P, Jin T, Thermo, Waltham, Massachusetts S (2006): Fluorescence resonance energy transfer in living cells reveals dynamic membrane changes in the initiation of B cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8143-8148
- Stavnezer J, Guikema JE Schrader CE (2008): Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26, 261-292
- Steen H, Mann M (2004): The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699-711
- Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T, Yamamura H, Kurosaki T (1994): Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca $^{2+}$ mobilization through distinct pathways. *EMBO J* 13, 1341-1349
- Tonegawa S, Brack C, Hozumi N, Pirrotta V (1978): Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42, 921-31
- Tsang E, Giannetti A, Shaw D, Dinh M, Tse J, Gandhi S, Ho H, Wang S, Papp E, Bradshaw J (2008): Molecular mechanism of the Syk activation switch. *J Biol Chem* 283, 32650-32659
- Tsubata T, Wienands J (2001): B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol* 20, 675-678
- Turner M, Mee P, Costello P, Williams O, Price A, Duddy L, Furlong M, Geahlen R, Tybulewicz V (1995): Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298-302
- Uckun F, Ek R, Jan S, Chen C, Qazi S (2010 a): Targeting SYK kinase-dependent anti-apoptotic resistance pathway in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells with a potent SYK inhibitory pentapeptide mimic. *Br J Haematol* 149, 508-517

- Uckun F, Ozer Z, Qazi S, Tuel-Ahlgren L, Mao C (2010 b): Polo-like-kinase 1 (PLK1) as a molecular target to overcome SYK-mediated resistance of B-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells to oxidative stress. *Br J Haematol* 148, 714-725
- von Behring E, Kitasato S (1890): Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschr* 16, 1145-1148
- Waksman G, Shoelson S, Pant N, Cowburn D, Kuriyan J (1993): Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2-Domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72, 779-790
- Walther T, Mann M (2010): Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol* 190, 491-500
- Wang L, Duke L, Zhang P, Arlinghaus R, Symmans W, Sahin A, Mendez R, Dai J (2003): Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res* 63, 4724-4730
- Wang LD, Clark M (2003): B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology* 110, 411-420
- Weiel J, Ahn N, Seger R, Krebs E (1990): Communication between protein tyrosine and protein serine/threonine phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 24, 182-195
- Wienands J (2000): The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 245, 53-76
- Wienands J, Freuler F, Baumann G (1995): Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2-Domains of Syk. *Int Immunol* 7, 1701-1708
- Wienands J, Schweikert J, Wollscheid B, Jumaa H, Nielsen P, Reth M (1998): SLP65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* 188, 791-795
- Winding P, Berchtold M (2001): The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J Immunol Methods* 249, 1-16
- Witze E, Old W, Resing K, Ahn N (2007): Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods* 4, 798-806
- Wong J, Ishiai M, Kurosaki T, Chan A (2000): Functional complementation of BLNK by SLP76 and LAT linker proteins. *J Biol Chem* 275, 33116-33122
- Yaffe M, Rittinger K, Volinia S, Caron P, Aitken A, Leffers H, Gamblin S, Smerdon S, Cantley L (1997): The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-71
- Yanagi S, Inatome R, Takano T, Yamamura H (2001): Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 495-498
- Yankee T, Keshvara L, Sawasdikosol S, Harrison M, Geahlen R (1999): Inhibition of signaling through the B cell antigen receptor by the protooncogene product, c-

- cbl, requires Syk tyrosine 317 and the c-Cbl phosphotyrosine-binding domain. *J Immunol* 163, 5827-5835
- Zhang J, Kimura T, Siraganian R (1998) Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity. *J Immunol* 161, 4366-4374
- Zhao Y, Jensen O (2009): Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9, 4632-4641
- Zioncheck T, Harrison M, Geahlen R (1986): Purification and characterization of a protein-tyrosine kinase from bovine thymus. *J Biol Chem* 261, 15637-15643
- Zioncheck T, Harrison M, Isaacson C, Geahlen R (1988): Generation of an active protein-tyrosine kinase from lymphocytes by proteolysis. *J Biol Chem* 263, 19195-19202

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Wienands, der mir diese Promotion ermöglicht hat, für sein großes Vertrauen, das er in mich und meine Arbeit gesetzt hat und für die Freiheiten, die er mir bei der Erarbeitung dieses Projektes gelassen hat.

Dr. Michael Engelke möchte ich dafür danken, dass ich ihn stets um Rat fragen konnte, und insbesondere für die Zusammenarbeit bei der konfokalen Mikroskopie. Für die technische Unterstützung im Labor gilt mein Dank Ines Heine und Gabriele Sonntag.

Für die Überlassung von Vektoren und Antikörpern möchte ich mich bei Dr. Manfred Jücker vom UKE Hamburg, bei Dr. Deborah Yablonski vom Technion-Israel Institute of Technology Haifa, Israel, bei Dr. Sandra Beer-Hammer vom Universitätsklinikum Düsseldorf und bei Dr. Tomohiro Kurosaki vom National Institute of Infectious Diseases Tokyo, Japan bedanken.

Diese Arbeit ist in Kooperation mit der „Bioanalytical Mass Spectrometry Group“ am MPI für biophysikalische Chemie entstanden. Für die gelungene Zusammenarbeit und die Ermöglichung der massenspektrometrischen Messungen möchte ich Prof. Dr. Henning Urlaub als Leiter der Gruppe und Dr. He-Hsuan Hsiao für die Unterstützung bei der Aufreinigung von Phosphopeptiden danken. Vielen Dank auch für die technische Unterstützung bei der Durchführung der massenspektrometrischen Messungen an Uwe Plessmann, Monika Raabe und Johanna Lehne.

Schließlich möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit der letzten Jahre bei Herrn Dr. Thomas Oellerich bedanken.

Die Erstellung dieser Arbeit wurde durch das Stipendium A des Stipendienprogrammes innerhalb der "Gö4med" des Universitätsklinikums Göttingen gefördert.